



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

Москва, 11–12 октября 2013 г.

Тезисы докладов

А.А. Айзенштадт¹, А.С. Хрупина¹, С.А. Смирнова¹,
А.Б. Смолянинов¹, М.П. Самойлович²,
В.Б. Климович²

**Иммуномодулирующее действие
мультипотентных мезенхимальных стромальных
клеток на лимфоциты, активированные
аллергеном**

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

² Российский научный центр радиологии
и хирургических технологий, Санкт-Петербург
aizendt@gmail.com

A.A. Ayzenshtadt¹, A.S. Khrupina¹, S.A. Smirnova¹,
A.B. Smolyaninov¹, M.P. Samoilovich²,
V.B. Klimovich²

**Immunomodulatory effect of mesenchymal stem
cells on allergen activated lymphocytes**

Известно, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) способны оказывать супрессивное действие на функциональную активность Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток и естественных киллеров (NK). Эти свойства позволяют рассматривать ММСК в качестве возможного средства клеточной терапии иммунопатологических состояний, в том числе аллергических реакций. Характер действия ММСК на лимфоидные клетки, участвующие в аллергических реакциях, остается мало известным.

Цель работы состояла в исследовании влияния аллогенных ММСК на стимулированные аллергенами лимфоциты пациентов, страдающих аллергией.

Материал и методы. ММСК были получены из пупочного канатика при неосложненных родах (при наличии подписанного информированного согласия) в соответствии с принятыми протоколами. Из крови пациентов с пищевой моноаллергией на градиенте фикола выделяли лейкоцитарную фракцию. Клетки суспендировали в концентрации 5 млн/мл в ростовой среде RPMI с 10% фетальной бычьей сыворотки, добавляли раствор аллергена и вносили в лунки 6-луночного планшета, содержащего культуру ММСК в состоянии 70% конfluence. Сокультивирование клеток в присутствии аллергена проводили в течение 3 сут. Контролями служили лимфоциты тех же пациентов, интактные, или инкубированные с аллергеном в отсутствие ММСК. Поверхностные лимфоцитарные маркеры выявляли

с помощью меченных флуорохромами антител на проточном цитофлуориметре FC500 Beckman Coulter. Содержание IgE, IL10 и IL4 в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты. При инкубации лейкоцитов с аллергенами процентное содержание популяций В-(CD19⁺) и Т-(CD3⁺) лимфоцитов, а также Т-хелперов (CD3⁺, CD4⁺) и Т-цитотоксических клеток (CD3⁺, CD8⁺) соответствовало контрольным значениям и не изменялось в присутствии ММСК. В то же время культивирование лейкоцитов с аллергеном увеличивало фракцию активированных Т-лимфоцитов (CD45⁺, CD3⁺, HLA-DR⁺), которая при этом достигала 17–19%. При сокультивировании стимулированных аллергеном лейкоцитов с ММСК количество активированных Т-лимфоцитов не превышало 5%, что соответствовало значениям, характерным для лимфоцитов, не активированных аллергеном. Присутствие ММСК при инкубации лейкоцитов с аллергеном вызывало повышение секреции противовоспалительного цитокина — IL-10 и одновременно снижение продукции IL4 и эффекторной молекулы аллергического иммунного ответа — IgE. Описанную систему можно рассматривать как модель для изучения влияния ММСК на эффекторное звено аллергических реакций.

А.В. Аксененко, И.И. Еремин, П.С. Еремин,
Т.С. Чаузова, Н.Л. Лазарева, Ю.А. Жгутов,
А.А. Пулин, К.В. Котенко

**Повышение приживления и выживаемости
полнослойных кожных трансплантатов
с помощью стромально-васкулярной фракции
жировой ткани**

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
cd105@mail.ru

A.V. Aksenenko, I.I. Eremin, P.S. Eremin, T.S. Chauzova,
N.L. Lazareva, Yu.A. Zhgutov, A.A. Pulin, K.V. Kotenko

**Increasing engraftment and survival
of full-thickness skin grafts with use
of stromal-vascular fraction derived
from adipose tissue**

Местные лучевые поражения (МЛП) развиваются преимущественно при инцидентах с источниками ионизирующего излучения или являются осложнениями лучевой терапии. К одним из наиболее часто встречаемых отдаленных последствий МЛП относят

незаживающие, устойчивые к стандартной терапии трофические язвы, что приводит к длительному процессу реабилитации и значительно снижает качество жизни таких пациентов. Основной стратегией лечения поражений является хирургическая обработка. При этом из-за анатомических особенностей области поражения, а также соматического статуса больного, такое лечение не всегда возможно. Вместе с тем, некрэктомия с последующей пластикой дефекта аутооттрансплантатом или его аналогом на сегодняшний момент является самым удачным вариантом лечения. Использование полнослойных кожных лоскутов лимитировано возможными осложнениями, зачастую связанными с отторжением и некрозом аутооттрансплантата в связи с его недостаточной васкуляризацией. Следовательно, данный вид лечения невозможен при наличии больших кожных дефектов. Учитывая доказанную в многочисленных исследованиях высокую эффективность применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани для восстановления васкуляризации, снижения воспалительных реакций и активации регенеративных процессов, нами был предложен инновационный способ ускорения приживления полнослойных ишемизированных кожных лоскутов.

Пяти пациентам с МЛП была выполнена операции некрэктомии с пластикой дефекта полнослойным кожным лоскутом. На 7–10 сут. после операции наблюдалось изменение цвета трансплантата и несостоятельность швов. Всем пациентам была выполнена шприцевая липосакция в объеме 50–100 мл с последующим выделением СВФ. Сразу после получения СВФ (30–120 млн клеток) проводилось введение клеток по всей площади ишемизированного трансплантированного лоскута и в области фиксации к здоровым тканям. На 7 сут. после обкалывания трансплантата СВФ наблюдалось восстановление кровоснабжения лоскута, что сопровождалось восстановлением физиологичной окраски. Все трансплантаты полностью прижились в течение последующего месяца. Осложнений связанных с процедурой липосакции или введением СВФ отмечено не было.

Полученные результаты могут являться основой для создания протокола клинических исследований по оценке эффективности и безопасности введения СВФ для оптимизации приживления полнослойных кожных лоскутов.

С.А. Барков¹, И.И. Еремин², С.Б. Ставицкий³,
И.В. Щуров²

Опыт клинического применения аллогенных ММСК в ранний послеоперационный период у собак с вторичными неврологическими нарушениями при компрессии спинного мозга в грудно-поясничном отделе

¹Инновационная ветеринарная клиника РУДН, Москва

²ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

³Центр ветеринарной клеточной медицины, Москва
cd105@mail.ru

S.A. Barkov, I.I. Eremin, S.B. Stavitskiy, I.V. Schurov

The experience of clinical use of allogeneic MSCs in the early postoperative period in dogs with neurological disorders secondary spinal cord compression in the thoraco-lumbar region

Неврологические расстройства, связанные с компрессией спинного мозга, вызванной дегенеративными изменениями межпозвонковых дисков, являются частой причиной потери опороспособности на тазовые конечности у собак хондродистрофичных пород. Наиболее частым местом поражения является грудно-поясничный отдел позвоночника. Нередко происходит вытеснение изменённого ядра диска в позвоночный канал (тип Хансен 1), где оно сдавливает спинной мозг, вызывая его ишемию, с дальнейшим развитием отека и маляции. Считается, что в компрессированном спинном мозге происходят два патологических процесса: маляция и демиелинизация, возникающие в процессе сдавливания самого вещества мозга и компрессии вентральной позвоночной артерии и вен. Повреждения, характерные для данной ситуации, разделяются на метаболические, ведущие к образованию свободных кислородных радикалов и приводящих к перекисному окислению липидов внутри клеточных мембран и, в результате, нарушению их целостности. Это приводит к накоплению арахидоновой кислоты и кальция, которые являются цитотоксичными. Запускается саморазрушительный процесс миеломалации, которая является восходящей, по направлению к головному мозгу, и приводящей к гибели организма.

В зависимости от степени повреждения спинного мозга клинически различают 7 стадий неврологических расстройств: 1 стадия — локальная боль; 2 стадия — атаксия тазовых конечностей; 3 стадия — потеря опороспособности, присутствуют произвольные движения; 4 стадия — полный парез (произвольные движения отсутствуют); 5 стадия — параплегия с задержкой мочеиспускания; 6 стадия — параплегия, полная потеря болевой чувствительности; 7 стадия — миеломалация, часто сопровождающаяся гипертермией и бессознательным состоянием.

На современном уровне перед врачами-ветеринарами стоит задача не только вовремя диагностировать заболевание и провести хирургическую декомпрессию спинного мозга, но и остановить процесс миеломалации, вызванный ишемическими и воспалительными процессами в спинном мозге, и ускорить регенерацию нервной ткани, что приведет к быстрейшему выздоровлению пациента.

Представляем наблюдение клинических случаев двух собак в возрасте 5 и 6 лет с вторичной

компрессией спинного мозга, вызванной пролапсом межпозвоночного диска по типу Хансен 1. У обоих животных была констатирована 6 степень неврологических расстройств, т.е. были выявлены полное отсутствие опороспособности, рефлексов и глубокой болевой чувствительности на протяжении более 24 ч. Место компрессии определяли при помощи проведения компьютерной томографии. Зона локализации в одном случае находилась между первым и вторым поясничным позвонками, во втором случае — между последним грудным (13-м) и первым поясничным позвонками. В обоих случаях вещество диска занимало более 40% диаметра позвоночного отверстия. Общим собакам была выполнена декомпрессия в виде щадящей гемиламинэктомии с удалением фрагментов выпавшего диска. На 7–14-е сутки после операции была проведена субокципитальная пункция и инъекция 5 млн аллогенных ММСК в краиниальную цистерну между 1 шейным позвонком и затылочным гребнем. До введения клеток проводили забор спинномозговой жидкости для определения биохимических показателей и клеточного состава по следующим параметрам: цвет, общее количество белка, число лейкоцитов, лейкоцитарная формула, количество эритроцитов, наличие чужеродных клеток. Контрольный забор спинномозговой жидкости проводили через неделю после введения клеток, при этом не отмечали повышения плотности и изменения клеточного состава, указывающего на воспалительные реакции. Клинически наблюдали восстановление болевой чувствительности на 7 в первом и 9 сут. во втором случае после введения клеток, рефлексов — на 12 и 15 сут., опороспособности — на 14 и 18 сут. соответственно.

Обсуждение. Степень неврологических расстройств характеризуется развитием сильнейшего отека спинного мозга с признаками маляции. Механическая декомпрессия позволяет только прекратить воздействие на ткань мозга компрессирующего фактора в виде выпавшего вещества межпозвоночного диска, но не остановить развитие процесса миеломалации в спинном мозге. Нельзя исключить, что введение ММСК позволяет модулировать процессы воспаления и иммунного ответа.

Выводы: введение аллогенных ММСК в спинномозговой канал при дегенеративных изменениях спинного мозга, вызванных компрессией веществом межпозвоночного диска, безопасно для животных. При клинической картине, соответствующей шестой степени неврологических расстройств, когда прогноз неблагоприятный в 95%, в обоих наблюдаемых случаях отмечалось полное восстановление глубокой болевой чувствительности и двигательных функций. Необходимо проведение дальнейших клинических исследований для определения показаний к применению, дозы и кратности введения клеточных продуктов.

Л.Н. Бельская, Н.И. Лисяный

Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на развитие экспериментальной глиомы у крыс

ГУ «Институт нейрохирургии им. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев, Украина
adsq@ukr.net

L.N. Belskay, N.I. Lisyany

The influence mesenchymal stromal cells adipose tissue on development of rats' experimental glioma

Интерес к изучению влияния мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) из различных источников на развитие опухоли обусловлен способностью данных клеток к миграции и интеграции в опухолевый очаг, что позволяет рассматривать их как потенциальный транспортер в генной терапии опухолей, в том числе и опухолей ЦНС. Вместе с тем, вопрос непосредственного влияния ММСК на развитие опухоли и ее гистоструктуру остается дискуссионным. На данном этапе исследований на различных экспериментальных моделях показаны все три возможных варианта влияния: стимулировать, не оказывать никакого влияния или ингибировать рост опухолей различного гистогенеза.

В связи с этим целью данной работы было: исследовать влияние ММСК жировой ткани крыс на развитие экспериментальной перививной злокачественной глиомы крыс (штамм 101.8).

Материал и методы. Исследования проведены на белых крысах разведения вивария ГУ «Институт нейрохирургии им. А.П. Ромоданова НАМН Украины». Клетки стромальной фракции жировой ткани крыс получали путем механической диссоциации с последующей ферментативной обработкой коллагеназой типа 1. Для получения ММСК клетки стромальной фракции жировой ткани культивировали на протяжении 10–12 сут. в питательной среде DMEM с 1% содержанием антибиотика и 10% FBS. Штамм глиомы мозга (101.8) получали путем имплантации в мозг экспериментальных крыс (80 г) клеточной суспензии в количестве 2×10^6 (контрольная группа). ММСК жировой ткани вводили внутрибрюшинно в количестве 5×10^5 на 3–5–8-е сут. после трансплантации клеток глиомы (1 группа) или одновременно с клетками глиомы (2×10^6) вводили ММСК жировой ткани в соотношении 4:1 (группа №2). Противоопухолевый эффект оценивали по динамике удельного веса живых животных в различные сроки, по общей продолжительности жизни животных и по длительности периода клинических проявлений.

Результаты. Установлено, что общая продолжительность жизни экспериментальных животных с глиомой составила $(17,5 \pm 0,5)$ сут. Троекратное внутрибрюшинное введение ММСК жировой ткани статистически достоверно не влияло на развитие и клиническое течение экспериментальной глиомы. Совместное введение опухолевых клеток и ММСК жировой ткани в мозг экспериментальных животных увеличивало продолжительность жизни у 70% животных с глиомой до $(21,5 \pm 1,0)$ сут., а у 30% выживаемость увеличивало до 10 сут. и составляло $(26,0 \pm 3,2)$ сут. Следует отметить, что длительность периода клинических проявлений заболевания до

смерти вдвое превышала показатели контрольной группы.

Механизм действия ММСК на опухолевые клетки при их совместном введении во многом не ясен, вероятно, что он может реализоваться как контактным путем, так и опосредоваться гуморальными факторами, которые вызывают замедление пролиферации опухолевых клеток или их апоптоз. Будущее морфологическое исследование опухолевого материала и исследования в культуре клеток позволят более детально установить механизм торможения роста опухоли.

В то же время, полученные результаты противоречат данным других авторов, где показано стимулирующее рост опухоли влияние ММСК, а также возможность трансформации стволовых клеток в опухолевые клетки. Возможными объяснениями расхождений этих данных могут быть несколько обстоятельств. Во-первых, разными авторами были применены различные опухолевые модели. Во-вторых, применялись различные по источнику выделения ММСК, а также полученные по разным протоколам (длительность культивирования и др.).

Таким образом, увеличение продолжительности жизни у животных с глиомой мозга при совместном введении ММСК жировой ткани и опухолевых клеток свидетельствует о противоопухолевой активности ММСК. Дальнейшие исследования в этом направлении, возможно, позволят уточнить механизмы действия ММСК, что даст возможность рассматривать применение данных клеток не только в качестве векторов при генной терапии глиом, но и также непосредственно их применять в комплексном лечении новообразований.

И.Я. Бозо^{1,2}, А.Ю. Дробышев², Д.В. Галецкий³,
В.О. Королев³, И.И. Еремин⁴, Е.С. Филоненко⁵,
С.Л. Киселев⁶, А.А. Исаев¹, Р.В. Деев¹

Разработка «активированного» остеопластического материала, содержащего плазмидные ДНК с геном *vegfa165*

¹ Институт Стволовых Клеток Человека, Москва

² Московский государственный
медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова

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

⁴ Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России

⁵ НИЦ Курчатовский институт, Москва

⁶ Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова
bozo.ilya@gmail.com

I.Y. Bozo, A.Y. Drobyshev, D.V. Galetsky, O.V. Korolev,
I.I. Eremin, E.S. Philonenko, S.L. Kisekev, A.A. Isaev,
R.V. Deev

Development of «activated» osteoplastic material containing plasmid DNA with *vegfa165* gene

Введение. Эффективное реконструктивное лечение при патологии костей скелета, зачастую, требует применения остеопластических материалов. В ряде случаев, когда необходима лишь оптимизация естественного репаративного процесса, достаточно использования простых (ординарных) материалов — без биологической активности, —

которые характеризуются лишь остеокондуктивными свойствами. Однако при необходимости замещения протяженных и (или) объемных костных дефектов, когда активность естественных остеоиндуцирующих факторов снижена («остеогенная недостаточность»), требуется индукция репаративного процесса и поддержание его на высоком уровне до полного восстановления целостности кости. Такое влияние могут оказать лишь активированные (оптимизированные) остеопластические материалы, наделенные остеоиндуктивными свойствами и (или) остеогенностью за счет включения в их состав биологически активных компонентов.

К настоящему времени в соответствии с природой биологически активного компонента сформировалось три основных тренда в создании оптимизированных остеопластических материалов: постгеномный, клеточный и генный. В виду ряда недостатков первых двух направлений, мы сосредоточили свои усилия на разработке ген-активированного костного графта (ГАКГ).

Материал и методы. В связи с ключевой ролью ангиогенеза в обеспечении репаративного остеогенеза в качестве биологически активного компонента разрабатываемого материала мы выбрали плазмидные ДНК с геном, кодирующим VEGF-A165, — действующее вещество лекарственного препарата «Неоваскулген» (Институт Стволовых Клеток Человека), обладающего выраженной ангиогенной активностью.

Исследование включало два основных этапа: лабораторный и эксперимент *in vivo*. В ходе первого из различных групп ординарных остеопластических материалов отбирали два варианта с максимальной «вместимостью» для плазмидных ДНК. С этой целью после отмывки материалов в PBS выполняли их совмещение с растворами генных конструкций в концентрации 1 мкг/мкл в течение 10 ч, затем удаляли несорбированные плазмидные ДНК промыванием и элюировали связавшиеся с носителями генные конструкции, после чего определяли количество нуклеиновых кислот с помощью флуоресцентной спектрофотометрии. В результате, для создания ГАКГ были использованы синтетический композитный материал из коллагена и гидроксиапатита (№1), а также ксеногенный депротенинизированный костный матрикс (№2). Полученные варианты ГАКГ инкубировали с культурой ММСК с определением продукции белка VEGF на 1, 3 и 5 сут. посредством ИФА.

В ходе второго этапа исследования разработанные ГАКГ №1 и №2 имплантировали в дефекты (диаметр 9–10 мм) правых теменных костей кроликов (экспериментальные группы 1 и 2). Аналогичные краниальные дефекты с левой стороны были использованы в качестве контроля — для имплантации соответствующих носителей без плазмидных ДНК (контрольные группы 1 и 2). В ряде случаев для создания ГАКГ использовали двухкассетные плазмидные ДНК с генами *vegfa* и *gfp*, что было необходимо для последующей детекции экспрессии генных конструкций *in vivo*. Результаты эксперимента оценивали через 15, 30, 35, 60, 90 и 120 сут. гистологическими и рентгенологическими методами.

Результаты и обсуждение. При инкубировании ГАКГ с культурой ММСК было выявлено значительное повышение уровня VEGF в культуральной среде, по сравнению с эндогенной продукцией, что подтвердило реализацию трансфекции *in vitro*.

Через 15 сут. после имплантации с помощью иммуногистохимической реакции с антителами к GFP была выявлена экспрессия плазмидных ДНК клетками регенерата, а с антителами к α -SMA — большее количество сосудов, по сравнению с контролем, что является доказательством высвобождения генных конструкций из структуры носителя, трансфекции *in vivo* с продукцией биологически активного терапевтического белка.

По данным КТ, на первом контрольном сроке существенной разницы между экспериментальной и контрольной группами 1 выявлено не было: дефекты сохранялись с первоначальными размерами, четкими границами, регенерат имел низкую плотность. Однако уже с 30 сут. после имплантации ГАКГ №1 размеры дефектов уменьшались более существенно (на 1–3 мм), границы дефектов становились менее четкими, а регенерат более плотным, чем при использовании носителя без генных конструкций. В итоге, к 120 сут. эксперимента в случае применения ГАКГ №1 наблюдалась практически полное восстановление целостности теменной кости, в то время как в контроле дефект сохранялся (диаметром 5–6 мм). При оценке результатов в группах 2 на ранних сроках (до 60 сут.) КТ оказалась малоинформативной в связи с высокой рентгенконтрастностью имплантированного материала (носителя из ксеногенного депротеинизированного костного матрикса). Однако и через 90, и через 120 сут. более полная консолидация наблюдалась только в случае ГАКГ 2, в отличие от контроля.

Результаты рентгенологического исследования коррелировали с данными гистологического анализа. Большой объем костного регенерата, представленного на ранних сроках (15–60 сут.) ретикулофиброзной, а на поздних (90, 120) — пластинчатой костной тканью, определялся в экспериментальных группах 1 и 2. При этом, источниками репаративного остеогенеза являлись не только опилы теменных костей, но и фрагменты ген-активированных материалов, поскольку большинство из них, даже находящихся в центральной части дефекта, выполненного реактивно измененной рыхлой волокнистой соединительной тканью, были окружены новообразованной костной тканью. Такой эффект является прямым подтверждением остеоиндукции материала. В контроле же костный регенерат исходил лишь с периферии.

Выводы. Таким образом, нами были разработаны два варианта ген-активированных остеопластических материалов, способных обеспечить более выраженный репаративный остеогенез даже в случае костных дефектов «критического» размера за счет индукции ангиогенеза.

И.Н. Большаков¹, А.В. Светлаков², Ю.И. Шеина², Г.И. Каптюк¹, А.М. Карапетян¹, А.В. Игнатов¹, В.А. Кузнецов¹

Экспериментальная частичная и полная транссекция спинного мозга и его биоинженерная реконструкция

¹ ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск

² Красноярский центр репродуктивной медицины, лаборатория клеточных технологий, Красноярск
krasivf@mail.ru, bol.bol@mail.ru

I.N. Bolshakov, A.V. Svetlakov, Yu.I. Sheina, G.I. Kaptyuk, A.M. Karapetyan, A.V. Ignatov, V.A. Kuznetsov

Experimental partial and complete transection spinal cord and its bioengineering reconstruction

Цель исследования: разработка трехмерной биополимерной матрицы для культивирования и прямой трансплантации эмбриональных стволовых клеток мышцы, трансформированных в нейрональные клетки, в частичный или полный дефект спинного мозга с целью его реконструкции при экспериментальной осложненной позвоночно-спинальной травме.

Материал и методы. Для создания нейрональных матриц был использован базовый полиионный комплекс, состоящий из нано-микроструктурированного аскорбата хитозана с молекулярной массой 695 kDa и степенью дезацетилирования 98%, при содержании на 1 г сухого хитозана аскорбиновой кислоты 1,8 г, включающий солевые анионные формы хондроитинсерной (Sigma, США) (20 мг/г), гиалуроновой (Sigma, США) (10 мг/г) кислот и гепарина (5 мг/г) (Россия), сывороточного фактора роста крупного рогатого скота «адгелон» (110 мкг/г) (Россия). Культивирование на коллаген-хитозановых матрицах ЭСК мышцы в кондиционированной среде от мышечных эмбриональных нейрональных клеток при добавлении в среду нейрональной добавки N2 (Sigma, США) или B27 (Sigma, США), а также ретиноевой кислоты (Sigma, США) приводит к нейрональной дифференцировке. В перечень манипуляций перед трансплантацией в спинной мозг крысам популяции Вистар входило: культивирование и дифференцировка эмбриональных стволовых клеток мышцы и их маркерный анализ, получение кондиционированной среды от культивированных эмбриональных нейрональных клеток, иммуногистохимический контроль нейрональной дифференцировки стволовых клеток, экспериментальная спинальная травма у крыс (частичный и полный разрыв спинного мозга), перенос клеточной массы на матрицы и их культивирование, трансплантация в дефект спинного мозга различных по составу клеточных матриц, послеоперационный уход, динамический неврологический контроль, гистологический анализ срезов спинного мозга в различные сроки после трансплантации, маркерный анализ диспергатов и срезов спинного мозга, включая анализ ядерных и мембранных специализированных молекул, нейротрансмиттеров.

Результаты и обсуждение. Предложенные режимы культивирования эмбриональных стволовых клеток мышцы после соответствующей подготовки биodeградируемых матриц позволяют повысить качество и стабильность культивирования, исключить

на конечном этапе получения клеточной матрицы обработку клеток ферментами в процессе пассирования при смене питательной среды, повысить прикрепление клеток к поверхности матрицы, предупредить их потерю при пересеве на питательные среды благодаря присутствию в ней хитозанового биополимера, обеспечить получение клеточной матрицы, пригодной для прямой трансплантации. Добавление в базовый полиионный коллаген-хитозановый комплекс кондиционированной среды от нейрональных клеток эмбриона мыши или кондиционированной среды от культивируемых предшественников нейрональных клеток мыши, или компонента N2 и ретиноевой кислоты приводит к нейрональной дифференцировке ЭСК мыши с экспрессией нейрофиламентов, GFAP и нестина, моделирует их внешнюю морфологию. Анализ неврологического дефицита у крыс после полной транссекции спинного мозга показывает, что трансплантация бесклеточной коллаген-хитозановой матрицы в диастаз спинного мозга на уровне IX грудного позвонка приводит к заметному сокращению объема нарушений, восстанавливая функции тазовых органов в полном объеме, а также обеспечивает 5–6 уровни восстановления моторных и сенсорных функций спинного мозга в течение 20 нед. наблюдения. Имплантация в диастаз спинного мозга коллаген-хитозановой подложки со 100 тыс. предшественников нейрональных клеток мыши приводит к практическому полному устранению нейродефицита, достигая в течение 20 нед. 20-го уровня восстановления. Исследование опытных образцов спинного мозга показало, что со стороны трансплантата регистрируется спрутинг клеток, продуцирующих GFP, в зону центрального конца материнского спинного мозга. Трансляция ядросодержащих клеток сопровождается экспрессией нейромедиаторов GABA, acetylcholine and serotonin в различные сроки после операции. Детальный серийный анализ срезов собственно клеточного трансплантата в спинном мозге указывает на богатое содержание жизнеспособных нейронов, продуцирующих GFP и одновременно экспрессирующих нейромедиаторы. Трансплантированная клеточная масса помимо пришедших материнских нейрональных клеток занимает весь объем коллаген-хитозановой подложки. В каудальной части спинного мозга животных опытной группы регистрируется сниженное число ядросодержащих клеток с экспрессией и без экспрессии нейромедиаторов. Изучение серийных срезов ниже коллаген-хитозанового клеточного трансплантата (хвостовой отдел спинного мозга) выявляет слабый феномен спрутинга GFP-клеток.

Исследования выполнены при поддержке грантов государственного фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект №6746p/9167 от 10.04.2009 г. и проект № 8775 p/13993 от 11.01.2011 г., проект № 10494 r/16892 от 06.08.2012).

Е.А. Булыгина, Н.Л. Блатт, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов

Транскриптомный анализ ответа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека на воздействие неионных блоксополимеров

Казанский (Приволжский) федеральный университет
rizvanov@gmail.com

E.A. Bulygina, N.L. Blatt, A.K. Shafigullina, A.A. Rizvanov

Transcriptome analysis of human multipotential mesenchymal stromal cells' response to nonionic block copolymers

Согласно современным представлениям, полимеры способны оказывать направленные биологические эффекты и опосредованно изменять действия различных активных субстанций на клетки. Взаимодействие одного из классов полимеров, плуроников, в составе разрабатываемых лекарственных препаратов со стволовыми клетками организма может косвенно влиять на способность тканей к регенерации. Ранее было показано, что некоторые плуроники, в частности, Плуроник Р85, ингибируют механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Возможность проведения протеомного и транскриптомного анализа стволовых клеток человека после воздействия неионных блоксополимеров позволит выявить молекулярные механизмы активации различных сигнальных внутриклеточных каскадов, что может иметь практическое применение в биомедицинских клеточных технологиях.

Цель работы: исследование влияния Плуроника Р85 на пролиферацию и остеогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) человека путем анализа их транскриптома.

Материал и методы. ММСК были выделены из пульпы третьего моляра человека, удаленного у здоровой пациентки по медицинским показаниям. Зачаток пульпы извлекли из полости зуба и, предварительно измельчив, поместили в среду DMEM с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы и 1% смеси пенициллина и стрептомицина. На 3 сут. проводили смену питательной среды. После 10–15 сут. инкубации было отмечено формирование «плотного» монослоя клеток. Замену питательной среды проводили через 1 сут.

Для анализа влияния Плуроника Р85 на остеогенную дифференцировку ММСК инкубировали клетки с Плуроником Р85 в конечной концентрации 0,01%, показавшей наивысший стимулирующий эффект на пролиферацию ММСК. Через 24 часа инкубации среду заменили на дифференцировочную, стимулирующую дифференциацию ММСК в остеогенном направлении.

Полногеномное исследование экспрессии мРНК (транскриптома) в культуре клеток проводилось с помощью чипа Illumina HumanHT-12 Expression BeadChips согласно протоколу фирмы-производителя (Illumina, США). Для визуализации полученных данных были использованы стандартные методы многомерного анализа — многомерное шкалирование и построение тепловых дендрограмм (heatmap). Дифференциально экспрессирующиеся гены обогащались

терминами Gene Ontology (The Gene Ontology (GO) Project, www.geneontology.org).

Результаты. Между контрольной (ММСК без Плуроника) и экспериментальной (ММСК, инкубированные с Плуронином Р85) группами обнаружено статистически значимое различие. Среди генов, обладающих дифференциальной экспрессией, был, среди прочих, выявлен ген SPARC, кодирующий остеоонектин — гликопротеин, инициирующий костную минерализацию и способствующий образованию кристаллов. Таким образом, транскриптомный анализ стволовых клеток человека показал, что Плуроник Р85 повышает эффективность остеогенной дифференцировки ММСК по сравнению с контрольными клетками.

В.А. Буханцев, Л.А. Власова, А.В. Коротков,
О.Г. Макеев

Алгоритм оценки безопасности применения аутогенных клеточных культур при проведении клинических испытаний

ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России, Екатеринбург
ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург
Prof - SSazonov@yandex.ru

V.A. Bukhantsev, L.A. Vlasova, A.V. Korotkov,
O.G. Makeev

Algorithm for estimating the safety of autologous cell cultures for clinical trials

Обобщение результатов исследований в области культивирования постнатальных человеческих клеточных линий, предназначенных для применения в клинике, позволило разработать четырехэтапный алгоритм, направленный на обеспечение безопасности клеточной терапии.

Алгоритм включает: 1 — анамнестические данные; 2 — данные врачебного осмотра; 3 — результаты лабораторных исследований, в том числе исследования клеточных культур; 4 — результаты тестового введения клеток.

Потенциальную инфицированность возбудителями социально-значимых заболеваний (ВИЧ, вирусные гепатиты В, С, цитомегаловирусная инфекция, туберкулез, токсоплазмоз, инфекции, вызываемые *Chlamydia* spp.) устанавливали иммунофлуоресцентным и иммунополяризационным методами с использованием закрытых систем (Abbot Lab) на анализаторе AxSym или с помощью ПЦР-анализа (с применением наборов Flash).

Важной составляющей мониторинга является оценка в культурах потенциала неоплазии. В наших исследованиях для анализа мутаций используется ДНК, выделенная из культивируемых клеток, культуральной жидкости и, с целью подтверждения неогенеза, — из крови испытуемых. Анализируются мутации в генах p53 (кодон 175 (1 мутация), кодон 248 (3 мутации), кодон 273 (4 мутации), B-ras (2 мутации), K-ras (2 мутации).

Анализ ДНК на наличие мутаций проводили в соответствии с трехэтапной схемой: 1) скрининг на наличие изменения структуры экзонов генов-супрессоров опухолевого роста и протоонкогенов с использованием SSCP-анализа; 2) уточнение структурных изменений в экзонах посредством аллель-специфичной ПЦР и рестрикционного анализа экзонов;

3) верификация типа и положения мутации, а также количества мутантных аллелей в образце в ходе РТ-ПЦР.

В предварительных слепых исследованиях 33 образцов крови больных с морфологически идентифицированной онкологической патологией I–II стадий различной локализации и 8 контрольных образцов было подтверждена высокая достоверность метода — 94% (от 1 до 2 исследуемых мутаций было выявлено в 31 образце крови, в 2 образцах крови больных и в 8 контрольных образцах мутаций не обнаружено; вероятность ложноотрицательного результата 6%).

В 390 исследованных краткосрочных культурах фибробластов неогенез мутаций *in vitro* был подтвержден. Так, в клетках одной из культур, полученной из эксплантата кожи испытуемой Н., была выявлена мутация в 248 кодоне гена p53 (G248C), получившая подтверждение в процессе выполнения всех этапов определения мутантных генов. Мутация была выявлена в клетках одной из культур после 3-го пассажа клеток. Однако в других параллельных культурах испытуемой, а также в образцах ее периферической крови мутаций в гене p53 не найдено, что послужило основанием только для выбраковки единичной культуры, содержащей мутантную ДНК.

Полученные результаты хорошо согласуются с проведенными исследованиями, подтверждающими наличие элементов генетической нестабильности при длительном культивировании клеточных линий, а единичный положительный результат может свидетельствовать о том, что при сроках культивирования до 30 сут. зарегистрированное генетическое событие является сравнительно редким.

Наряду с этим, как показывают проведенные исследования, необходимо одновременное исследование не только ДНК культивируемых клеток донора-реципиента, но и его крови, в связи с возможностью проявления уже имеющейся в клетках организма мутации. Отсутствие изменений ДНК периферической крови будет свидетельствовать о возникновении мутации *de novo*.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают возможность использования разработанной методики для многоступенчатого поэтапного контроля генетической стабильности культивируемых клеток, предназначенных для практического применения в аутогенном варианте.

Р.Г. Васильев^{1,2,3}, А.Е. Родниченко^{1,2,3}, З.А. Короп³,
Л.С. Литвинова⁴, О.В. Седнев⁵, Т.С. Шестакова^{3,6},
В.В. Шуплецова⁴, А.Н. Паламарчук³,
А.В. Курмышов⁴, С.Н. Новикова^{1,2}

Стромальные клетки эндометрия человека: биологические свойства при общепринятых и низкокислородных условиях культивирования in vitro

¹ ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев, Украина

² ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины», Киев, Украина

³ Медицинская компания «ілауа», Киев, Украина

⁴ ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет им. И.Канта», Калининград, Россия

⁵ ГБУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», Калининград, Россия

⁶ Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина
rvasiliev@ukr.net

R.G. Vasyliiev, A.E. Rodnichenko, Z.A. Korop,
L.S. Litvinova, Sednev, T.S. Shestakova,
V.V. Shupletsova, A.N. Palamarchuk, A.V. Kurmyshov,
S.N. Novikova

Human endometrial stromal cells: in vitro biological properties under conventional and low oxygen cell culture conditions

Эндометрий представляет собой ткань, обладающую значительной способностью к регенерации. Так, в течение жизни женщины происходит более 400 циклов физиологической регенерации эндометрия. В настоящее время в эндометрии человека идентифицирован ряд типов клеток, имеющих в составе своего дифферона стволовые и (или) прогениторные клетки — это эпителиальные, эндотелиальные и стромальные клетки эндометрия (C. Cargett, 2010). Изучение данных клеточных типов имеет большое значение — как фундаментальное (исследование молекулярных и клеточных механизмов циклической регенерации; исследование патогенеза эндометриоза, и др.), так и прикладное (разработка протоколов клеточной терапии для лечения гипоплазии эндометрия, создания рецептивного эндометрия в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий и др.).

На текущий момент в мире известны случаи успешного применения клеточной терапии для лечения различных заболеваний, связанных с патологией эндометрия (синдром Ашермана, «тонкий» эндометрий и др.) и зарегистрирован ряд клинических исследований для оценки эффективности данного подхода. При этом используются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) из костного мозга и (или) жировой ткани. Вместе с тем, эндометрий является гормон-чувствительной тканью (в том числе и его стромальный компартмент). Вследствие этого представляется логичным использовать в протоколах клеточной терапии для лечения патологии эндометрия гистотипические типы клеток, в частности — стромальные клетки эндометрия. Кроме того, значительный интерес с фундаментальной точки зрения представляет определение сходства и отличия между клетками, обладающими свойствами ММСК, из эндометрия, костного мозга, жировой ткани и других тканевых источников.

Цель исследования: изучить биологические свойства эндометриальных стромальных клеток в культуре in vitro при общепринятых и низкокислородных условиях культивирования.

Материал и методы. Образцы эндометрия ($n = 5$) были получены при помощи кюретажной биопсии в первую фазу менструального цикла от пациенток с очаговой гиперплазией эндометрия из области нормального эндометрия. Во всех случаях получено добровольное письменное информированное согласие пациенток. Фрагменты эндометрия были диссоциированы ферментативной обработкой в течение 1 ч раствором 0,05% коллагеназы IА и 0,05% проназы. Полученная суспензия клеток культивировалась в среде DMEM:F12 с 10% ЭТС и 2 мМ глутамин (все реактивы Sigma, США) в мультигазовых инкубаторах при 37°C, насыщающей влажности, 5% CO₂ и 5% или атмосферной (условно — 21%) концентрации O₂. Стромальные клетки эндометрия были отобраны как адгезивная фракция клеток, прикрепившаяся к пластику в течение 24 ч. Для определения фенотипа, способности к направленной адипо- и остеогенной дифференцировке и теста на КОЕф использовали клетки культуры 3-го пассажа. Направленную адипо- и остеогенную дифференцировку осуществляли при 5% и 21% O₂ по стандартным методикам (D. Prosser, 2004) с оценкой цитохимическим окрашиванием красителями Oil Red O и Alizarin Red S соответственно. Фенотип определяли на проточном цитофлюориметре-сортере «BD FACSAria» с ПО FACSDiva 6.1.1 с использованием анти-человеческих моноклональных антител к CD34, CD45, CD73, CD90 и CD105 (Becton Dickinson, США). В тесте на КОЕф засевали по 100 клеток в чашку Петри 100 мм и культивировали в течение 14 и 21 сут. в при 5% или 21% O₂.

Результаты. Эндометриальные стромальные клетки обладают фибробластоидной морфологией и имеют характерный для ММСК фенотип (CD73+CD90+CD105+CD34-CD45-) при культивировании, как в общепринятых, так и в низкокислородных условиях. При 5% O₂ скорость роста культуры эндометриальных стромальных клеток увеличивается в 1,8 раза по сравнению со стандартными условиями культивирования (21% O₂). Часть клеток в культуре эндометриальных стромальных клеток обладает способностью к росту в условиях клональной плотности. При этом концентрация кислорода в составе газовой фазы не влияет на частоту КОЕф, но способствует образованию более крупных колоний за счет большего числа клеток в их составе. При культивировании КОЕф в течение 21 сут. отмечается тенденция к формированию 3D сфероидов в большинстве колоний. Эндометриальные стромальные клетки обладают способностью к направленной адипо- и остеогенной дифференциации, при этом качественных отличий в способности клеток к направленной дифференциации при культивировании при 5% и 21% O₂ не отмечено.

Выводы. 1. Культура эндометриальных стромальных клеток содержит клетки с клоногенным потенциалом. 2. Фенотипически и по способности к направленной дифференцировке стромальные клетки эндометрия удовлетворяют критериям, предъявляемым к ММСК. 3. Культивирование в низкокислородных условиях ускоряет пролиферацию эндометриальных стромальных клеток, не влияя на частоту КОЕф в культуре и не нарушая способности клеток к направленной дифференциации.

Р.Г. Васильев^{1,2}, А.Е. Родниченко^{1,2},
Т.С. Шестакова^{2,3}, Л.С. Литвинова⁴,
В.В. Шуплецова⁴, И.Ф. Лабунец¹, С.Н. Новикова¹,
Г.М. Бутенко¹

Мультipotентные стволовые/прогениторные клетки – производные нервного гребня в культуре in vitro: самообновление, клональная мультipotентность и сферогенез

¹ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев, Украина

²Медицинская компания «ilaуа», Киев, Украина

³Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

⁴Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия
rvasiliev@ukr.net

R.G. Vasyliiev, A.E. Rodnichenko, T.S. Shestakova,
L.S. Litvinova, V.V. Shupletsova, I.F. Labunets,
S.N. Novikova, G.M. Butenko

Neural crest – derived multipotent stem/progenitor cells in culture in vitro: self-renewal, clonal multipotency and spherogenesis

Бульбарный регион волосяного фолликула взрослых млекопитающих содержит мультipotентные стволовые клетки – производные нервного гребня (МСК-ПНГ) (M. Sieber-Blum, 2004). Используя метод эксплантатов и селективные условия культивирования из бульбарного региона волосяного фолликула можно получить «чистую» культуру клеток – производных нервного гребня – для изучения их биологических свойств.

Целью данной работы являлось изучение биологических свойств МСК-ПНГ из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих на клональном уровне.

Материал и методы. Культуры МСК-ПНГ получали из бульбарного региона волосяного фолликула вибрисс взрослых мышей линии FVB (самцы возрастом 4–6 мес.) по методу M. Sieber-Blum в собственной модификации. Клетки культивировали на коллагене I типа в среде DMEM:F12 с 10% фетальной сывороткой коров, 2 нг/мл bFGF, 2 мМ глутамина, 1% питательной добавки B27 и 1% витаминов MEM в мультигазовом инкубаторе при 37°C, насыщающей влажности, 5% CO₂ и 5% O₂. Способность клеток к росту в условиях клональной плотности была оценена в КОЕф-тесте путем засева 100 клеток в чашку Петри 100 мм и культивирования в течение 14 дней. Для дальнейших экспериментов были отобраны колонии, содержащие более 100 клеток (в среднем ~500 клеток) и пересеяны при помощи клонирующих цилиндров. Эксперименты по направленной дифференцировке были выполнены на клональных культурах (n = 9), полученных от 3 различных доноров. Направленная дифференциация в адипо- и остеогенном направлении была выполнена по общепринятым протоколам (D. Prockop, 2004). Для нейрональной дифференциации МСК-ПНГ были культивированы в среде Neronal Base Medium P с 10% экстракта мышиного головного мозга, 1% питательной добавки B27, 2% питательной добавки NeuroMix, 2 мкМ ретиноевой к-ты, 5 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF на поли-L-лизине. Для направленной

дифференциации в глиальные клетки среда вышеуказанного состава была дополнена 100 нМ изопротеренола, а в качестве субстрата использовался коллаген I типа. Дифференциация была оценена при помощи цитохимического окрашивания красителями Alizarin Red S (остеогенная), Oil Red O (адипогенная), и иммунофлуоресцентным окрашиванием с анти-βIII-тубулин (для нейронов, 1:500) и анти-S-100 (для Шванновских клеток, 1:500) антителами с детекцией вторичными FITC-конъюгированными антителами (все – Abcam, Великобритания). Для сферогенеза МСК-ПНГ культивировались в бессывороточной среде следующего состава: DMEM:F12, 2% питательной добавки B27, 40 нг/мл bFGF и 40 нг/мл EGF. Числовые данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (M±s). Эксперименты выполнены с соблюдением принципов биоэтики и норм биологической безопасности, что подтверждено заключением комиссии по биоэтике ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ».

Результаты. Тест на КОЕф показал способность фибробластоидных клеток из бульбарного региона волосяного фолликула к росту в условиях клональной плотности. Эффективность колониеобразования составила 72,58±12,35%. При этом наблюдалось формирование колоний 3-х типов (по числу и морфологии клеток): колонии I типа (13,86±2,74% от общего числа колоний) – 8–10 крупных клеток с морфологическими признаками терминальной дифференциации; колонии II типа (31,68±8,35%) – 30–70 клеток различного размера и морфологии; колонии III типа (54,46±7,58%) – более 100 (от 500 до 1000) клеток, с преобладанием клеток небольшого размера без морфологических признаков дифференциации. При субклонировании колонии III типа (n = 15; от 3 различных животных) наблюдалось формирование новых колоний всех трех типов: I типа – 28,25±2,78%; II типа – 40,9±7,04%; III типа – 31,88±4,36% от общего числа новообразованных колоний. Таким образом, КОЕф-тест показал гетерогенность фибробластоидных клеток из бульбарного региона по клоногенному потенциалу и выявил способность части клеток к самообновлению. В дальнейших экспериментах, выполненных на клональных культурах (n = 9), полученных путем субклонирования колоний III типа (n = 9, от 3-х различных животных), была показана их способность к формированию флотирующих сфер в бессывороточных условиях культивирования и к направленной дифференциации в адипоциты, остеобласты, нейроны и Шванновские клетки. Таким образом, в ходе работы установлено, что бульбарный регион волосяного фолликула взрослых млекопитающих содержит МСК-ПНГ, обладающие способностью к самообновлению, направленной мультилинейной дифференциации и сферогенезу на клональном уровне.

А.В. Виноградов, П.Н. Меньшанов, А.В. Резайкин,
А.Г. Сергеев

**Детекция молекулярных повреждений генов
белков апоптоза при остром мегакариобластном
лейкозе методом RNA-seq**

ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская
академия» Минздрава России, Екатеринбург
ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН,
Новосибирск
vinogradov - av@yandex.ru

A.V. Vinogradov, P.N. Menshanov, A.V. Rezaikin,
A.G. Sergeev

**Detection of apoptosis pathway's molecular
lesions in acute megacarioblastic leukemia
by RNA-seq**

Острый мегакариобластный лейкоз (ОМЛ М7) представляет собой редкое онкогематологическое заболевание, развивающееся вследствие клональной экспансии поврежденных на генетическом уровне клеток-предшественниц мегакариоцитарного ростка. Известно, что повреждение одного протоонкогена или гена-супрессора опухолевого роста не является достаточным условием для злокачественной трансформации, а потому для описания патогенеза лейкозов используется «пошаговая» модель, согласно которой формирование опухолевого клона начинается с «условно-иницирующей» мутации. Тем не менее, сведения о количестве молекулярных повреждений тех или иных генных кластеров в период клинической манифестации лейкоза в доступной литературе отсутствуют.

Цель исследования — оценить возможность применения технологии массивного параллельного секвенирования транскриптома (RNA-seq) для идентификации молекулярных повреждений генов белков апоптоза и нефункционирующих звеньев аппарата программируемой гибели опухолевых клеток при остром мегакариобластном лейкозе.

Материал и методы. Исследована проба аспирата костного мозга грудины от больного 49 лет с впервые выявленным ОМЛ М7, верифицированным цитологически и иммунофенотипически. При стандартном цитогенетическом исследовании лейкозных клеток (G-banding) определялся нормальный кариотип (46, XY).

Тотальную РНК из опухолевых клеток выделяли набором реагентов «QIAamp RNA Blood Mini Kit». После выделения РНК секвенировали на полногеномном секвенаторе HiSeq 2000 (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя. Получены ~42,4 млн 100-нуклеотидных односторонних последовательностей с Q-оценкой ≥ 15 по системе оценки качества секвенирования PHRED. Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму COBWeb (Strand, США) относительно референсного генома человека hg19 и базы последовательностей транскриптов RefSeq от 01.04.2013. После выравнивания идентифицирована геномная локализация для ~31,9 млн последовательностей (~73%), неидентифицированные последовательности исключены из анализа. Выявление SNP для целевых генов, участвующих в процессах программируемой клеточной гибели (каспазы, Bcl2-семейство белков, TP53 и другие, в соответствии с http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04115+7157), проводили посредством алгоритма MAQC (Li et al., 2008). Идентификацию известных SNP проводили по базе данных dbSNP137, функциональные последствия SNP оценивали по базе данных dbNSFP 2.0 (Liu et al., 2013).

Результаты и обсуждение. Точечные мутации определены в 9 целевых генах и были представлены двумя инсерциями, приводившим к сдвигу рамки считывания, и двенадцатью несинонимичными нуклеотидными заменами (таблица). Среди замен нуклеотидов преобладающим вариантом были транзиции (8 наблюдений), из них 5 — в пуриновых остатках. В четырех генах (ATM, CASP7, PIDD, TNFRSF10B) одновременно определялись по две мутации, в остальных — по одной. Гомозиготные мутации определены в пяти генах (ATM, CASP7, CASP9, CHEK и TP53), гетерозиготные — в шести. В генах ATM, ATR и PIDD впервые выявлены гетерозиготные инсерции ins(1409)AATTC, ins(3517)A и замена C974T, соответственно.

Таким образом, в исследованном случае ОМЛ М7 апоптозный каскад имеет несколько молекулярных дефектов — как на уровне регуляторов апоптоза (ATM, TP53), так и каспаз. Оказывался заблокированным внутренний путь активации апоптоза через каспазу 9 наряду со снижением эффективности реализации внешнего пути (мутации BID и CASP10), а также дублер ключевой эффекторной каспазы 3 — каспаза 7.

Результаты детекции точечных мутаций при ОМЛ М7

Ген	Экзон	Мутация*	Зиготность	Кол-во ридов	dbSNP Id	Изменения в белке
ATM	8	ins(1409)AATTC	гетеро	10	новая	FS**
	40	A6333G	гомо	45	rs659243	N->S
ATR	17	ins(3517)A	гетеро	12	новая	FS**
BID	3	C682G	гетеро	103	rs201438109	S->T
CASP7	8	C919G	гомо	53	rs2227310	T->S
	8	G934A	гомо	53	rs2227309	R->K
CASP9	5	T738C	гомо	23	rs1052576	Q->R
CASP10	10	T1982A	гетеро	49	rs13006529	L->I
CHEK1	13	A2308G	гомо	22	rs506504	I->V
PIDD	4	C974T	гетеро	22	новая	R->Q
	6	T1139C	гетеро	28	rs10902221	Q->R
TNFRSF10B	1	G388A	гетеро	41	rs1129424	P->L
	5	A865G	гетеро	49	rs13265018	V->A
TP53	4	G417C	гомо	28	rs1042522	P->R

* — позиция указана по последовательности кДНК; ** FS — фреймшифт.

Заключение. Таким образом, идентификация конкретных молекулярных дефектов при остром мегакариобластном лейкозе методом RNA-seq позволяет выявлять нефункционирующие звенья апоптотического каскада опухолевых клеток, что может быть использовано для персонализированного подхода к лечению пациентов. При этом, себестоимость определения мутаций для всего транскриптома оказывается на два порядка ниже, а затраты по времени — на три порядка ниже в сравнении с прямым автоматическим секвенированием по Сэнгеру.

Н.Б. Герасименко, И.Ф. Радаева, Е.А. Нечаева

Усовершенствование технологии гриппозной вакцины

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл.
dumchenko@vector.nsc.ru

N.B. Gerasimenko, I.F. Radaeva, E.A. Nechaeva

Improving the technology of influenza vaccine

Грипп — острое респираторное заболевание вирусной этиологии, протекающее с явлениями общей интоксикации и поражением респираторного тракта. Самым эффективным методом снижения количества инфицированных является вакцинация. Вакцины, приготовленные на культурах клеток Vero и MDCK, лицензированы для профилактики гриппа в Европе и США. Российских аналогов культуральных вакцин против гриппа на фармацевтическом рынке нет. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» разработана технология производства живой гриппозной вакцины «Вектор-Флю» на основе клеток MDCK, культивируемых в бессывороточных питательных средах на микроносителях. Поскольку в производстве вакцины используются компоненты импортного производства, она остается достаточно дорогостоящей. Разработка технологии производства вакцины, содержащей компоненты отечественного производства, и культивирование клеток в суспензии могли бы существенно удешевить производство вакцины.

Целью исследования стало изучение технологических подходов перевода культуры клеток MDCK из монослойной в суспензионную.

Материал и методы. Исследовалось влияние различных концентраций метилцеллюлозы и альгината натрия, введенных в ростовую питательную среду, на адгезивную способность, пролиферативную активность и жизнеспособность клеток MDCK. Культивирование клеток MDCK проводили в культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 25 см² в питательной среде Игла MEM производства ГВП «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова» РАМН (Россия), содержащей 0,5–5% сыворотки крови плодов коров (Sigma, США), 0,05 мг/мл гентамицина сульфата, метилцеллюлозу и альгинат натрия в различных концентрациях (Sigma, США).

Результаты. Влияние метилцеллюлозы и альгината натрия на пролиферацию культуры клеток оценивали путем определения индекса пролиферации с помощью окрашивания клеток трипановым синим и подсчета в камере Горяева, за их влиянием на адгезивную способность клеток следили визуально. В результате исследований было показано, что метилцеллюлоза в концентрации 1% и альгинат натрия в концентрации 0,5% влияют на адгезивную способность культуры клеток MDCK: культура клеток пере-

ходит в суспензию и не адгезируется к поверхности культуральных флаконов.

Выводы. В результате проведенного исследования установлено, что метилцеллюлоза в концентрации 1% и альгинат натрия в концентрации 0,5% могут быть использованы в технологии производства гриппозной вакцины в качестве добавки к ростовой питательной среде для суспензионного культивирования клеток MDCK.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России.

М.О. Гомзикова¹, А.А. Музыкантов², В.М. Чернов^{1,2},
А.А. Ризванов¹

Детекция микоплазменной контаминации в культурах клеток млекопитающих

¹ ФГАОУВПО Казанский (Приволжский)

федеральный университет, Казань

² КИББ КазНЦ РАН, Казань

rizvanov@gmail.com

M.O. Gomzikova, A.A. Mouzykantov, V.M. Chernov,
A.A. Rizvanov

Detection of mycoplasma contamination in mammalian cell cultures

Основными контаминантами клеточных культур являются семь видов микоплазм. В основной массе это виды, инфицирующие человека (*M. orale*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. salivarium*, *Acholeplasma laidlawii*), а также крупный рогатый скот (*M. arginini*) и свиней (*M. hyorhinis*), что указывает на основные источники загрязнения — персонал лаборатории, сыворотка крови или реагенты. Зачастую научные коллективы, работающие с культурами клеток, недооценивают опасность микоплазменной контаминации и не осуществляют периодическую проверку.

Коварность микоплазм заключается в способности расти в культуре эукариотических клеток, оставаясь при этом незамеченными, распространяясь на другие культуры, реагенты. Опасность заражения культуры клеток микоплазмами заключается в изменении метаболизма и других биологических свойств эукариотических клеток. При высокой степени обсемененности микоплазмами наблюдается ингибирование роста клеточной культуры, снижение жизнеспособности, повышение количества мутаций. Изменение свойств эукариотических клеток вследствие микоплазменной контаминации, в свою очередь, грозит ложной интерпретацией результатов эксперимента.

Цель работы: протестировать вновь поступившие из других лабораторий культуры клеток млекопитающих на наличие микоплазменной контаминации и идентифицировать обнаруженные микроорганизмы.

Материал и методы. Культуральную среду и (или) суспензию культуры клеток центрифугировали в режиме: 10 мин., 16 тыс. g при комнатной температуре. Осадок использовали для выделения общей ДНК методом фенол-хлороформной экстракции. Выделенную ДНК использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР со специфичными праймерами к участку гена 16S рРНК микоплазм. Полученные ампликоны секвенировали с целью идентификации вида микоплазмы.

Результаты. Всего было протестировано 42 образца из 27 видов культур клеток, поступивших в лабораторию в разные периоды времени. Из 42 образцов 32 оказались контаминированы — таким образом, процент контаминации составил 76,19%.

Согласно результатам секвенирования с идентичностью 97–100% и покрытием 93–100% контаминантами протестированных клеточных культур являются два вида микоплазм *M. arginini* и *M. hyorhinae*. Поскольку используемая в лаборатории среда, сыворотка крови, трипсин не дали положительных ПЦР-сигналов, можно предположить, что клеточные культуры, привнесенные из других лабораторий, оказались исходно контаминированы.

Выводы. В настоящее время фирмы-поставщики сыворотки крови и реагентов осуществляют строгий контроль чистоты своего продукта. Поэтому основными источниками микоплазменной контаминации являются персонал лаборатории или, что подтвердило наше исследование, широко распространенная практика обмена клеточными линиями без строгого контроля микоплазменной контаминации. Проведенное исследование еще раз подчеркивает важность тестирования клеточных линий, передаваемых из одной лаборатории в другую, а также постоянное тестирование культур клеток в лаборатории на наличие контаминации.

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

Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для активации гемопоэза старых лабораторных животных в условиях острой кровопотери

ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздрава России, Екатеринбург
ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург
Prof - SSazonov@yandex.ru

D.U. Grebnev, A.P. Jastrebov, I.U. Maclakova,
S.V. Sazonov, S.L. Leontyev

Application of stem cells for activation of hemopoiesis in old laboratory animals in the conditions of acute hemorrhage

Трансплантация стромальных клеток здорового донора способна ускорить процесс приживания трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и, соответственно процесс восстановления гемопоэза. Известно, что с возрастом происходит существенное уменьшение содержания стволовых клеток в организме. Учитывая свойства ММСК, представляется перспективным восстановление активности гемопоэза в условиях возрастной инволюции проведением сочетанной заместительной клеточной терапии.

Эксперименты выполнены на 18 мышах-самцах возраста 3 года, массой 45–50 г. Эксперименты по получению плацентарных ММСК и ГСК выполнены на 5 лабораторных животных мышах-самках возраста 3–4 мес., массой 20–25 г, срок гестации 18 дней. Массивную кровопотерю вызывали кровопусканием из хвостовой вены в объеме 2% от массы тела, что составляет 25–35% от объема циркулирующей крови. Было выделено 2 подгруппы (опытная и контрольная) по 9 животных в каждой. Животным опытной подгруппы внутривенно вводилась суспензия ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн кл./кг и 330 тыс. кл./кг; вторая подгруппа крыс являлась контролем, животным вводили физиологический раствор — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные вве-

дения осуществлялись через 1 час после кровопускания однократно. Забой осуществлялся на 5 сут. Производилась оценка миелограммы, определяли общее количество миелокариоцитов в костном мозге бедренной кости. Производилась оценка микро-ядерного теста.

Число полихроматофильных эритроцитов с микроядрами

$$\text{МЯТ} = \frac{\text{Число полихроматофильных эритроцитов с микроядрами}}{1000 \text{ нормохромных эритроцитов}} \times 1000 \text{ ‰}.$$

Получено, что в физиологических условиях на 5 сут. сочетанная трансплантация ММСК и ГСК в костном мозге приводит к увеличению содержания отдельных элементов эритроидного ростка (эритробластов и базофильных нормобластов). Тем не менее, указанные изменения не приводят к существенной стимуляции эритропоэза в целом. На фоне сочетанной трансплантации в миелоидной ткани происходит снижение содержания цитогенетически измененных клеток на 24,9%. В условиях воздействия острой кровопотери на 5 сут. сочетанная трансплантация ММСК и ГСК приводит к активации эритропоэза и гранулоцитопоэза. Повышение общего содержания эритроидных элементов происходит за счет увеличения полихроматофильных нормобластов на 23,8%. Активация гранулоцитов обусловлена увеличением количества миелобластов, миелоцитов, метамиелоцитов, а также сегментоядерных и палочкоядерных форм нейтрофилов. Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК на 5 сут. после острой кровопотери у старых лабораторных животных оказывает цитопро-тективное действие, которое выражается в снижении содержания цитогенетически измененных клеток в костном мозге на 19,6%.

Таким образом, у старых лабораторных животных в физиологических условиях, а также после острой кровопотери сочетанная трансплантация ММСК и ГСК вызывает уменьшение цитогенетически измененных клеток, в условиях острой кровопотери приводит к активации эритропоэза и гранулоцитопоэза.

А.А. Гумерова¹, А.К. Шафигуллина², Г.Р. Бурганова²,
А.А. Титова^{2,1}, М.О. Мавликеев¹, А.Р. Мухаммедов²,
Э.И. Шарипова^{1,2}, М.А. Титова¹, М.С. Калигин^{1,2},
И.М. Газизов^{2,1}, А.П. Киясов^{1,2}

Пути дифференцировки нативных и активированных in vivo звёздчатых клеток печени после трансплантации крысам, перенёвшим частичную гепатэктомию или повреждение печени четырёххлористым углеродом

¹ ФГАОУ Казанский (Приволжский) федеральный университет

² ГБОУ ВПО Казанский государственный медицинский университет
anissagum@mail.ru

A. Gumerova, A. Shafigullina, G. Burganova, A. Titova, M. Mavlikeev, A. Muchamedov, E. Sharipova, M. Titova, M. Kaligin, I. Gazizov, A. Kiassov

Possibilities of differentiation of native and in vivo activated hepatic stellate cells transplanted into rats after partial hepatectomy or liver damage by carbon tetrachloride

Актуальность. Звёздчатые клетки печени (ЗКП) продуцируют важные морфогенетические цитокины (фактор роста гепатоцитов, фактор стволовых

клеток и т.д.) и экспрессируют целый ряд маркёров стволовых клеток, таких как Oct 4, Bcl-2, C-kit и др. Более того, ЗКП и гепатоциты располагаются в непосредственном контакте друг с другом, а в период эмбрионального гистогенеза печени крысы и человека эти клетки обладают общими фенотипическими признаками, экспрессируя десмин (маркёр звездчатых клеток печени) и цитокератины 18 и 19 (маркёры гепатобластов и гепатоцитов), что позволило выдвинуть теорию о возможности мезенхимально-эпителиальной трансдифференцировки данных клеток и о существовании общего для обеих популяций клеточного предшественника. В наших ранних работах мы установили возможность дифференцировки ЗКП в клетки с фенотипом гепатоцитов в ходе пренатального онтогенеза человека и при культивировании изолированной популяции ЗКП крысы. Целью настоящего исследования стало изучение возможности гепатоцитарной дифференцировки ЗКП после их трансплантации крысам с повреждениями печени различной природы.

Материал и методы. ЗКП были изолированы из печени интактных крыс и крыс, получивших за двое суток до выделения клеток однократную внутривенную инъекцию нитрата свинца (100 мМоль/кг веса животного) методом проназно-коллагеназной перфузии с последующим разделением на градиенте плотности гистоденза. Введение нитрата свинца в указанной дозе вызывает незначительное повреждение печени за счёт усиления перекисного окисления липидов, сопровождающееся неполной активацией ЗКП (усиление экспрессии десмина и пролиферация без трансдифференцировки в миофибробласты). Изолированные ЗКП были трансфецированы геном зелёного флуоресцентный белка (GFP) и трансплантированы в воротную вену крысам с повреждением печени в дозе 3×10^6 клеток. Для повреждения печени использовали 2 модели: операцию частичной гепатэктомии (трансплантация ЗКП интраоперационно) и острое токсическое повреждение четырёххлористым углеродом (трансплантация ЗКП через сутки после введения четырёххлористого углерода (ЧХУ)). Контрольным крысам вводили соответствующий объём растворителя. Через 1, 2, 5, 7, 14 сут. животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом, печень фиксировали и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы окрашивали иммуногистохимически с антителами к GFP, десмину, ядерному антигену пролиферирующих клеток PCNA, альфа-гладкомышечному актину (α -ГМА), цитокератинам.

Результаты. Во всех экспериментальных группах мы выявили мелкие округлые GFP⁺ клетки в перипортальных зонах и GFP⁺ клетки, имеющие форму и размеры гепатоцитов. Наибольшее число GFP⁺ гепатоцитов отмечено в печени крыс через 1–2 сут. после частичной гепатэктомии и трансплантации клеток (5–7 клеток/поле зрения). После трансплантации *in vivo* активированных ЗКП крысам с частичной гепатэктомией число GFP⁺ гепатоцитов было существенно ниже. В случае повреждения печени ЧХУ лишь единичные нативные ЗКП после трансплантации приобретали фенотип гепатоцитов. Однако на этой модели трансплантация *in vivo* активированных ЗКП приводила к появлению большего числа GFP⁺ гепатоцитов в паренхиме печени: первые позитив-

ные клетки в фенотипом гепатоцитов отмечены через сутки после трансплантации, и их число достигало максимума через 5 сут. эксперимента. Вероятно, таким образом, важным фактором, определяющим возможность и динамику гепатоцитарной дифференцировки ЗКП после трансплантации, является характер повреждения органа.

Во всех сериях экспериментов ни на одном из экспериментальных сроков не выявлено α -ГМА-позитивных миофибробластов в паренхиме, что указывает на низкий риск развития фиброза после трансплантации даже активированных ЗКП. Позитивное окрашивание наблюдали только в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов. Уровень и динамика пролиферативной активности клеток печени после повреждения в опытных и контрольных группах значимо не отличались. В отличие от результатов трансплантации мононуклеаров пуповинной крови трансплантация ЗКП не приводит к появлению у опытных животных GFP⁺ клеток в эпителии внутрипечёчных желчных протоков и GFP⁺/цитокератин 19⁺ клеток. Таким образом, ЗКП имеют меньший дифференцировочный потенциал (гепатоциты) по сравнению с кроветворными стволовыми клетками (гепатоциты, холангиоциты).

Выводы. Звёздчатые клетки печени способны дифференцироваться в клетки с фенотипом гепатоцитов после трансплантации крысам с повреждением печени без риска развития фиброза. При этом в случае частичной гепатэктомии более эффективным с точки зрения репопуляции гепатоцитов является введение нативных ЗКП, а при токсическом повреждении четырёххлористым углеродом — активированных *in vivo* ЗКП.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-04-97088-р_поволжье_а).

А.П. Давыдов-Синицын¹, О.В. Баженова²,
М.А. Лисковых¹, Л.Л. Чечик¹, С.В. Пономарцев¹,
А.Н. Томилиן¹, Е.Н. Толкунова¹

Уничтожение стволовых клеток колоректального рака *in vivo* с помощью суицидальной технологии

¹ Институт цитологии РАН

² Санкт-Петербургский государственный
университет
ads707@ya.ru

A.P. Davydov - Sinitsyn, O.V. Bazhenova,
M.A. Liskovych, L.L. Chechik, S.V. Ponomartsev,
A.N. Tomilin, E.N. Tolkunova

Elimination of colorectal cancer stem cells *in vivo* via suicidal technology

Введение. Согласно современным представлениям [1], в раковой опухоли присутствует популяция низкодифференцированных клеток, обладающих стволовыми свойствами — раковые стволовые клетки (РСК). Именно РСК ответственны за возникновение новых очагов опухолеобразования при метастазировании [2]. Сходство РСК с эмбриональными стволовыми клетками даёт основание предположить, что в них могут быть активны те же ключевые регуляторы, например, транскрипционный фактор Oct4 [3].

Цель работы — выделение субпопуляции РСК из культуры клеток карциномы прямой кишки человека MIP101/CEA⁺ на основании эндогенной экспрессии

Ost4 и испытание суицидальной технологии для уничтожения их *in vivo*.

Материал и методы. Клетки заражали в культуре лентивирусным вектором, содержащим ген вирусной тимидинкиназы и ген устойчивости к пуromицину под контролем Ost4-зависимого энхансера. Клетки, получившие трансген и при этом экспрессирующие эндогенный Ost4, приобретают устойчивость к антибиоту бластицидину и чувствительность к противогерпетическому препарату ганцикловиру. Экспрессия Ost4 оценивалась с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Опухолеогенность определялась путём подкожной инъекции суспензии клеток (500 тыс. клеток) иммунодефицитным лабораторным мышам Nude с последующим измерением опухолей в течение 50 сут. Направленное уничтожение РСК *in vivo* индуцировали внутримышечным введением ганцикловира в концентрации 20 мкг на 1 г массы тела ежедневно с 20 по 30 сут. с последующим измерением размеров опухоли и сравнением с контрольной группой.

Результаты. После заражения клеток карциномы *in vitro* вирусом и отбора устойчивых к бластицидину клонов, экспрессирующих эндогенный Ost4, наблюдали усиление экспрессии Ost4 на уровне РНК более чем в 30 раз.

При введении под кожу мышам возникали опухоли, размеры которых измеряли на 20 сут. перед началом введения ганцикловира опытной группе. На 50 сут. с начала эксперимента относительный размер опухолей у контрольной группы составил $(200 \pm 39)\%$, тогда как у животных, получавших инъекции ганцикловира, наблюдалась остановка роста опухоли, и их размер на 50 сут. составил $(89 \pm 20)\%$ от исходного.

Выводы. Из культуры клеток карциномы человека MIP101/CEA⁺ получена субпопуляция клеток с повышенным уровнем экспрессии эндогенного Ost4, обладающих свойствами РСК. Показано, что направленное уничтожение РСК *in vivo* с помощью суицидальной технологии позволяет добиться остановки роста опухоли.

Литература:

1. Al-Hajj M., Clarke M.F. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 23 : 7274–7282.

2. Liu H. G., Chen C., Yang H., Pan Y.F., Zhang X.H. 2011. Cancer stem cell subsets and their relationships. *J.Transl. Med.* 9 : 50–59.

3. Лисковых М.А., Чуйкин И.А., Ранян А., Сафина Д.А., Толкунова Е. Н., Минина Ю.М., Жданова Н.С., Дыбан П.А., Маллинс Дж., Костылева Е.И., Чихирджина Е. В., Бадер М., Аленина Н., Томилин А.Н. 2011. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток крысы: анализ условий репрограммирования и культивирования. *Цитология*. 53 (12) : 939–945.

К.С. Десятниченко, В.Б. Грицаюк, С.Г. Курдюмов, Е.В. Тимонина

Увеличение объема костной ткани при дентальной имплантации с использованием остеопластических материалов

ЗАО НПО «ПОЛИСТОМ», Москва
kurdyumov@polystom.ru

K.S. Desyatnichenko, V.B. Gritsayuk, S.G. Kurdyumov, E.V. Timonina

Increase the volume of bone tissue in dental implantation using osteoplastic materials

В различных областях стоматологии и челюстно-лицевой хирургии широко используются материалы, направленно стимулирующие новообразование костной ткани. Их применение показано при необходимости возмещения врожденных, посттравматических и постоперационных (цистэктомия, туморэктомия и пр.) дефектов костей челюстно-лицевой области. При дентальной имплантации лимитирующим фактором является недостаточный объем костной ткани, в котором необходимо установить интрамуральную часть имплантата(тов) вследствие атрофии альвеолярного гребня, возникшей при адентии в условиях отсутствия адекватной механической нагрузки. В этой связи, горизонтальная и (или) вертикальная аугментация является важнейшим этапом для последующей дентальной имплантации.

Материалами выбора для данной процедуры могут быть нативная (аутогенная) или в разной степени деминерализованная кость (алло- или ксеногенная), а также искусственно изготовленные остеопластические материалы, представляющие собой композиции ортофосфатов кальция, коллагена, гетерополисахаридов и других биополимеров. Помещенные в тканевой дефект эти материалы способствуют репаративной регенерации костной ткани, полностью деградируя к завершению восстановительного процесса. Важнейшей функцией их является привлечение в костный дефект и удержание в нем предшественников клеток остеобластического дифферона, создание условий для их пролиферации, дифференцировки и продукции компонентов внеклеточного матрикса, подвергающегося в дальнейшем минерализации. Технологии использования остеопластических материалов, таким образом, соответствует постулированным признакам «регенеративной медицины».

Медицинское материаловедение в части разработки таких материалов активно развивается, в соответствии с чем совершенствуется и техника их клинического применения. В частности, отрабатываются методики сочетанного применения материалов различной физической консистенции (губка, пластины + гель, паста, суспензия) и состава, что позволяет заполнить дефект сложной конфигурации при полноценном контакте имплантируемого изделия с тканями реципиентного ложа. В настоящем сообщении приведены результаты костной пластики с использованием такой технологии в 106 оперативных вмешательствах у 104 пациентов с адентией и атрофией альвеолярных отростков, кистами челюстей, экстракцией зубов с одномоментной дентальной имплантацией. Две трети пациентов были старше 50 лет, имели осложнения в виде парадонтопатий, воспалительно-дегенеративных явлений, системного остеопороза, т.е. входили в группу риска.

Во всех случаях подготовка к операции включала в себя выполнение регламентных клинко-лабораторного и рентгенологического обследования, санацию полости рта. Протокол типичной операции по восстановлению утраченного объема костной ткани совместно с одномоментной дентальной имплантацией был следующим: под инфильтрационной и (или) проводниковой анестезией при помощи двух разрезов формировали два встречных трапецевидных слизисто-надкостничных лоскута по обе стороны альвеолярного отростка непосредственно в месте будущей костной пластики. Обнажали поверхность кости и при обнаружении на ней патологических воспалительных изменений удаляли в пределах здоровых тканей. Слизисто-надкостничные лоскуты мобилизовали таким образом, чтобы ими можно было укрыть возросший после пластики объем костной ткани. Из губчатых материалов (КОЛАПОЛы КП, КПЗ, ИНДОСТ-губка) приготавливали необходимый фрагмент для создания достаточного объема костной ткани из расчета плюс 30-35% дополнительно, который из шприца под давлением равномерно пропитывали гелеобразными материалами: ТРАПЕКС-гель или ИНДОСТ-гель. При выборе гелевого материала, учитывая различия в их составе, руководствовались следующими соображениями: при выраженных воспалительно-деструктивных изменениях предпочтителен ТРАПЕКС-гель, имеющий в своем составе стероидный противовоспалительный препарат. Он подавляет воспаление, способствует резорбции окружающей костной ткани с освобождением эндогенных местных факторов роста. Композиция последних, полученная из ксенокости, входит в состав ИНДОСТ-геля, что делает его предпочтительным для пациентов со сниженным регенераторным потенциалом. Имплантированный материал изолировали от мягких тканей мембранами ПАРАДОНКОЛ, на поверхность которых, обращенную к кости, наносили гелевый материал. Поверх мембраны укладывали слизисто-надкостничный лоскут и ушивали наглухо без излишнего натяжения.

Послеоперационный период обычно включал в себя антибактериальную и десенсибилизирующую терапию, ревизию ушитой раны на предмет состоятельности швов и лоскута. Процесс остеогенеза в области имплантированных материалов иногда сопровождался незначительным отеком и локальной гиперемией. Ближайшие результаты (60 сут.) по клинко-рентгенологическим данным показали прирост костной ткани в зоне имплантации на 30-60 % от объема имплантанта материала. Результаты оперативного вмешательства в зависимости от уровня достижения поставленной цели, используя стандартные критерии оценки, распределились следующим образом: хороший — 81,1%, удовлетворительный — 13,2%, неудовлетворительный — 5,7%.

Таким образом, в условиях невозможности применения аутогенной костной ткани и сомнительных прогнозов дентальной имплантации (возрастные особенности, наличие заболеваний пародонта, остеопороза, значительная атрофия альвеолярных гребней, костные дефекты после перенесенных заболеваний или травм) для увеличения объема костной ткани до физиологической и анатомической нормы методом выбора может являться сочетанное применение остеопластических материалов в твердотельной гелевой форме.

И.И. Еремин, П.С. Еремин, К.К. Губарев,
С.Э. Восканян, А.И. Захлевный, В.С. Рудаков,
А.А. Пулин, К.В. Котенко

Костный мозг трупного донора как потенциальный источник для получения аллогенных клеточных продуктов

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России,
Москва
cd105@mail.ru

I.I. Eremin, P.S. Eremin, K.K. Gubarev, S.E. Voskanyan,
A.I. Zakhlevny, V.S. Rudakov, A.A. Pulin, K.V. Kotenko

Bone marrow brain death-donor as a potential source for allogenic cell products

По приблизительным данным в России в трансплантации алогенного костного мозга нуждается 7000–10000 человек в год. Наличие банка костного мозга позволяет упростить процедуру поиска донора для онкогематологических больных и снизить стоимость операции.

Показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), выделенные из костного мозга, обладают иммуносупрессивными свойствами, что делает возможным их применение при различных патологических состояниях, в том числе для профилактики РТПХ при аллогенной трансплантации костного мозга (ТКМ).

Учитывая острую нехватку доноров и системы биобанков типированных образцов костного мозга, представляется актуальным использование в качестве потенциального источника КМ и ММСК материал, полученный от трупных доноров.

Цель исследования: охарактеризовать жизнеспособность костного мозга, полученного от доноров со смертью головного мозга и возможность экспансии ММСК для создания банка аллогенных материалов, типированных по HLA.

Материал и методы. Костный мозг был получен путем пункции подвздошных костей у доноров с диагностированной смертью мозга при сохранении кровотока. Объем аспирированного костного мозга составлял от 300 до 500 мл. Доноры были обследованы на наличие инфекций и типированы по HLA. Костный мозг трупного донора доставляли в ЦМБТ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России в течение 4–6 ч после забора биоматериала. Жизнеспособность клеток костного мозга была 87–92%. Для определения возможности банкирования и дальнейшего применения в онкогематологии для аллогенной ТКМ, 400 мл костного мозга подвергали криоконсервированию по стандартной методике. Оценка жизнеспособности и биологической активности клеток будет проводится через 3,6 и 12 мес.

Выделение ММСК проводили по стандартной методике в градиенте плотности. Экспансию ММСК проводили на среде MesenCult (StemCell Technology, США) с добавлением 2 мМ L-глутамин (StemCell Technology, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (StemCell Technology, США) и 10% добавки для культивирования клеток MesenCult (StemCell Technology, США). Смену среды проводили каждые 3–4 дня. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Иммунофенотипирование культивированных ММСК проводили на проточном цитометре BD FACS Canto II (США). Для идентификации и характеристики

культивируемых клеток был использован набор моноклональных антител CD90, CD73, CD105, CD54, CD44, CD116, CD13, CD34, CD117, CD45, CD14 (BD Bioscience, США), которые являются маркерами, характерными для ММСК.

Морфологически клетки в полученных культурах имели фибробластоподобную форму, активно пролиферировали. Жизнеспособность культур ММСК составляла более 92%. Результаты проведенного иммунофенотипирования показали, что культивируемые ММСК экспрессировали CD90, CD73, CD105, CD54, CD44, CD116, CD13 (BD Bioscience, США) и не экспрессировали маркеры, характерные для эндотелиальных и гемопоэтических клеток — CD34, CD117, CD45, CD14 (BD Bioscience, США).

Таким образом, следует сделать вывод о том, что нами были получены жизнеспособные культуры адгезивных клеток костного мозга, экспрессирующие спектр поверхностных маркеров, характерный для ММСК. Полученные данные являются подтверждением возможности использования КМ доноров со смертью мозга для получения жизнеспособных типированных трансплантатов и клеточных продуктов на основе аллогенных ММСК.

П.С. Еремин¹, И.И. Еремин¹, В.Л. Зорин^{2,1},
Г.П. Димов¹, А.В. Аклеев¹, А.Ю. Бушманов¹,
К.В. Котенко¹

Оценка морфофункциональных свойств фибробластов кожи человека после воздействия ионизирующего излучения

¹ ФГБУ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
² Институт стволовых клеток человека, Москва

P.S. Eremin, I.I. Eremin, V.L. Zorin, G.P.
Dimov, A.V. Akleev, A.Y. Bushmanov, K.V. Kotenko

The assessment of morphofunctional properties of skin fibroblasts after ionizing irradiation

Эффективное лечение местных лучевых поражений (МЛП) является одной из наиболее актуальных и сложных проблем современной радиационной медицины, в то же время тактика и стратегия лечения этих патологий до настоящего времени остаются не разработанными в полной мере. Моделирование последствий местного радиационного воздействия *in vitro* и изучение клеточных механизмов регенеративных процессов в зоне повреждения, с нашей точки зрения, могут быть полезными в разработке инновационных методов и подходов, способствующих оптимизации лечения пациентов с МЛП.

Цель исследования: провести сравнительный анализ морфофункциональных свойств фибробластов, выделенных из *ex vivo* облученных и необлученных образцов кожи.

Материал и методы. Биоптаты кожи из абдоминальной области от 25 пациентов в возрасте 30–70 лет получали в ходе проведения хирургических операций при наличии письменного информированного согласия пациентов.

Из биоптатов посредством стилета для биопсии (Epitheasy EPT2000-01, d = 6,5 mm) получали стандартизованные по размеру образцы (из каждого биоптата 7 образцов: один — для контроля, 6 — для эксперимента). Полученные образцы подвергали облучению различными дозами ионизирующего излучения (5, 10, 15, 20, 25 и 30 Гр). Облучение

биоматериала проводили на рентгеновской установке Radgil (GILARDONI S.p.A) согласно стандартам, разработанным научными клиническими центрами РАМН и Министерства Здравоохранения России.

Выделение клеток как из облученных, так и необлученных образцов кожи проводили путем ферментативной обработки по стандартной методике. Полученные клетки культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (StemCell Technology, США) с добавлением 2 mM L-глутамин (StemCell Technology, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (StemCell Technology, США) и 10% FBS (Biological Industries, Израиль). Смену среды производили каждые 3–4 сут. Для оценки эффективности колониеобразования фибробласты первого пассажа высевали с клональной плотностью 3–4 клетки на см² поверхности чашек Петри диаметром 60 мм и культивировали в течение 14 сут. Эффективность колониеобразования (ЭКОф) рассчитывали по формуле:

$$\text{ЭКОф} = \text{Nкол} / \text{Nкл} * 100\%,$$

где Nкол — количество образовавшихся колоний; Nкл — количество эксплантированных клеток.

При подсчете учитывались колонии, содержащие не менее 50 клеток.

Определение времени удвоения клеточной популяции (T2). Фибробласты высевали с плотностью 10⁴/см² и культивировали до формирования 90% монослоя. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Время удвоения популяции оценивали по формуле:

$$T2 = T_k * \ln(2) / \ln(N_k / N_0),$$

где N₀ — число клеток, эксплантированных в начале культивирования; T_k — длительность культивирования одного пассажа в часах; N_k — конечное число клеток через T_k.

Оценку секреторной активности клеток в культуральной среде проводили на ИФА-наборах R&D Systems (США) по методике производителя.

Результаты. Фибробласты, полученные из облученных образцов кожи, характеризовались наличием множества ядер и большими размерами по сравнению с контролем (фибробластами, полученными из необлученных образцов кожи). При изучении ЭКОф выявлено, что в культурах фибробластов с увеличением дозы облучения наблюдалось значительное снижение доли плотных. Также в культурах фибробластов, полученных из облученных образцов кожи, отмечается снижение времени удвоения клеточной популяции и снижение уровней экспрессии клетками VEGF, интерлейкинов-4, 6, 8, 10 и TGF-β.

По аналогичному алгоритму нами также проанализированы 20 образцов кожи от лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию во время проживания на радиоактивно-загрязненных территориях Челябинской области. Результаты исследований продемонстрировали сходную с экспериментальной работой картину.

Выводы. Проведенные исследования выявили прямую зависимость между снижением регенераторного потенциала фибробластов и увеличением дозы облучения как острого, так и хронического. Полученные данные можно рассматривать в качестве перспективной базы для разработки принципиально нового способа биологической дозиметрии, который может быть использован в оптимизации подходов к лечению пациентов с МЛП.

И.И. Еремин¹, С.Б. Ставицкий²,
А.А. Калиновский², К.В. Котенко¹, Ю.А. Жгуты¹,
Т.С. Чаузова¹

**Лечение разрывов переднего
поверхностного сгибателя у лошадей
с помощью мультипотентных
мезенхимальных стромальных клеток
жировой ткани**

¹ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА
России, Москва

² Центр ветеринарной клеточной медицины,
Москва
cd105@mail.ru

I.I. Eremin, S.B. Stavitskiy, A.A. Kalinowski,
K.V. Kotenko, Yu.A. Zhgutov,
T.S. Chauzova

**Treatment of full breaks forward superficial
flexor in horses with use of multipotent
mesenchymal stromal cells derived from
adipose tissue**

Одной из актуальных проблем практикующих ветеринарных врачей, являются травмы сухожилия поверхностного пальцевого сгибателя (СППС). Чаще всего этой патологией страдают высокопородные лошади, которые подвергаются повышенным нагрузкам во время тренировок и соревнований. При такой травме лошадь выбывает из работы на срок около года.

Современные методы лечения разрывов СППС подразумевают под собой сращение сухожилия за счет соединительнотканного рубца. В случае успешного лечения сухожилие теряет свою естественную эластичность, поэтому нагрузки на лошадь должны быть снижены, и она может быть выбракована из работы. Помимо этого риск рецидива травмы достигает 80%.

Практикующие ветеринарные врачи уже давно ведут поиск эффективных и безопасных способов лечения травм СППС. Врачами Центра Ветеринарной Клеточной Медицины был предложен метод инъекции суспензии аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) непосредственно в место травмы сухожилия. Диагноз разрыва подтверждался на основании клинических признаков, результатов осмотра, пальпации и УЗИ сухожилия. При подтвержденном диагнозе у лошади, под местным обезболиванием в районе основания хвоста через разрез 1–1,5 см забирался фрагмент подкожного жира объемом 0,5–1,0 см³, который помещался в пробирку с транспортной средой и отправлялся в лабораторию.

В лаборатории из полученного биоптата выделялись клетки стромаль-васкулярной фракции методом ферментативного расщепления. Затем полученные клетки помещали в среду (DMEM/F12 (StemCell Technology, США) с добавлением FBS (Biological Industries, Израиль) до 10% с добавлением 2 мМ L-глутамин (StemCell Technology, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (StemCell Technology, США) для дальнейшей экспансии ММСК. Смену среды проводили каждые 3–4 сут.

Через 10–14 дней выращенные ММСК помещались в стерильный шприц с физиологическим раствором, содержащем аутосорбенту.

Инъекция производилась под контролем УЗИ, после чего лошадь полностью исключалась из работы. Период реабилитации занимал в среднем 42–48 нед. В течение этого времени лошадь подвергалась постепенно увеличивающимся нагрузкам. При этом, с определенной периодичностью мониторировалось состояние сухожилия — с интервалом в месяц выполнялось УЗИ.

При последовательном изучении результатов УЗИ было отмечено постепенное восстановление сухожилия за счет образования волокон, которые ориентированы по продольной оси сухожилия. Грубый соединительнотканый рубец отсутствовал. Это же было подтверждено и патоморфологическими исследованиями.

За 2 года нами было излечено 18 лошадей с тенденитами различной степени тяжести. 11 из них полностью восстановились после травмы и вернулись к максимальным нагрузкам. 3 лошади находятся в реабилитационном периоде, но уже приступили к рысистой работе. У 4 лошадей был рецидив, который объясняется нарушением режима реабилитации.

Из вышесказанного можно сделать вывод, что предложенный нами метод использования аутогенных ММСК для лечения травм сухожилия поверхностного пальцевого сгибателя у лошадей, позволяет добиться полного восстановления тканей сухожилия, сохранить его упругость и эластичность. В результате дорогие породистые лошади могут вернуться к соревнованиям и испытаниям.

П.С. Еремин¹, Е.А. Супруненко²,
М.Б. Мурзабеков¹, В.А. Голиченков²,
А.Ю. Беспятых¹, И.И. Еремин¹,
К.В. Котенко¹

**Разработка экспериментальной модели
терапии фиброза печени с помощью
стромально-васкулярной фракции жировой
ткани**

¹ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА
России, Москва

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
cd105@mail.ru

P.S. Eremin, E.A. Suprunenko, M.B. Murzabekov,
V.A. Golichenkov, A.Yu. Bespyatyh, I.I. Eremin,
K.V. Kotenko

**Development of an experimental model
of treatment of liver fibrosis with stromal-
vascular fraction of adipose tissue**

Фиброз печени — это патологический процесс, при котором в результате хронического воспаления происходит постепенное замещение клеток печени соединительной тканью. Основной причиной возникновения фиброза печени являются хронические вирусные гепатиты, а также чрезмерное употребление алкоголя. Эффективных методов лечения фиброза печени не существует. Это делает актуальным поиск новых методов, направленных на функциональное восстановление печени и ее регенерацию. Известно, что стромально-васкулярная фракция (СВФ) клеток жировой ткани способна запускать реорганизацию рубцовых поражений, индуцировать неогенез и модулировать воспалительные и иммунные процессы.

Целью данного исследования явилась разработка модели фиброза печени, позволяющей проводить изучение эффекта трансплантации клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани.

Материал и методы. Для отработки модели лечения были использованы 5 самцов мышей, гибриды F1 C57/СВА, в возрасте 8 нед. с фиброзом, индуцированным при помощи четыреххлористого углерода.

Жировую ткань получали под общим наркозом путем шприцевой липосакции паховой и брюшной области. Липоаспират промывали PBS (Biowest, США), дезагрегировали путем инкубации в 0,15% коллагеназе II типа (Sigma, США) при 37°C в течение 30 мин. После чего производился подсчет клеток. Аликвоту каждого образца СВФ в количестве 3×10^5 клеток на см^2 помещали в среду (DMEM/F12 (StemCell Technology, США) с добавлением FBS (Biological Industries, Израиль) до 10%, 2 mM L-глутамин (StemCell Technology, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (StemCell Technology, США) для дальнейшей экспансии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Смену среды проводили каждые 3–4 сут.

Результаты. Всем животным была выполнена липосакция в объеме 2 мл. Содержание выделенных СВФ варьировало от 4 до 12 млн клеток. Клетки СВФ вводились в количестве 400 тыс. в 0,5 мл физиологического раствора внутривенно и внутрибрюшинно сразу после выделения. Осложнений, связанных с забором жировой ткани или введением СВФ, отмечено не было.

В результате трехнедельной экспансии было получено в среднем по 1,5 млн ММСК. Для подтверждения мультипотентности была проведена дифференцировка выращенных клеток в трех ортодоксальных направлениях (кость, жир, хрящ) по стандартным методикам.

Выводы. Впервые показана принципиальная техническая возможность выполнения шприцевой липосакции мышам с последующим выделением из липоаспиратов СВФ. Полученная СВФ пригодна для аутогенного использования. Полученные данные были положены в основу протокола экспериментального исследования по лечению фиброза печени с помощью клеток СВФ.

А.Ю. Ефименко, Н.А. Джояшвили, Н.И. Калинина, Р.С. Акчурин, Е.В. Парфенова

Активация факторов системы урокиназы и матриксных металлопротеиназ (ММП) в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани пожилых пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС)

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

² Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ, Москва
efimenkoan@gmail.com

A.Yu. Efimenko, N.A. Dzhojashvili, N.I. Kalinina, R.S. Akchurin, Ye.V. Parfyonova

Age-associated activation of urokinase system and MMPs in adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from patients with coronary artery disease (CAD)

Актуальность. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани (ММСК-ЖТ) играют важную роль в процессах репарации и регенерации тканей, благодаря высокому пролиферативному и дифференцировочному потенциалу и способности стимулировать рост сосудов и нервов, в первую очередь, за счет продукции широкого спектра различных цитокинов и факторов роста. Кроме того, было показано, что ММСК-ЖТ секретируют урокиназу и матриксные металлопротеиназы (ММП), принимающие активное участие в ремоделировании внеклеточного матрикса (ВКМ) и протеолитических процессах высвобождения и активации факторов роста. Ранее мы показали, что способность ММСК, выделенных из жировой ткани пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), стимулировать ангиогенез ухудшается с возрастом из-за сниженной секреции клетками ключевых проангиогенных факторов роста. Целью данного исследования было определить изменения системы факторов внеклеточного протеолиза в ММСК-ЖТ больных ИБС при старении.

Материалы и методы. ММСК-ЖТ были выделены из подкожной жировой ткани пациентов с ИБС ($n = 64$, возраст 43–77 лет). Для экспериментов использовали клетки 2 пассажа. Иммунофенотип клеток был определен с помощью проточной цитофлуориметрии как $\text{CD90}^+/\text{CD73}^+/\text{CD105}^+/\text{CD45}^-/\text{CD31}^-$ — для всех образцов, и была подтверждена мультипотентность клеток путем индукции адипогенной и остеогенной дифференцировки. Относительную длину теломеров, содержание мРНК урокиназы (uPA), ее рецептора (uPAR), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), ММП-2 и -9 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Экспрессию uPAR на поверхности ММСК-ЖТ оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. Содержание про- и активных форм ММП-2 и -9 в кондиционированной среде от ММСК-ЖТ определяли методом зимографии. Проводили количественную оценку PAI-1 в кондиционированной среде от ММСК-ЖТ методом иммуноферментного анализа (ELISA).

Результаты. Корреляционный анализ показал, что в ММСК, выделенных из жировой ткани пожилых пациентов, относительная длина теломеров была снижена ($r = -0,6$, $p = 0,006$), а содержание мРНК α PAR и PAI-1 повышено ($r = 0,46$, $p = 0,001$ и $r = 0,47$, $p = 0,001$, соответственно) по сравнению с клетками пациентов более молодого возраста. Уровень экспрессии α PAR на поверхности ММСК-ЖТ также коррелировал с возрастом пациентов ($r = 0,65$, $p = 0,01$). Кроме того, ММСК-ЖТ, имевшие более низкий показатель относительной длины теломеров, секретировали больше PAI-1 в среду культивирования ($r = -0,41$, $p = 0,02$). Содержание про-ММП-2 и про-ММП-9 было повышено в кондиционированной среде от ММСК-ЖТ пожилых пациентов по сравнению с пациентами более молодого возраста ($p < 0,05$). Мы наблюдали похожую тенденцию для активных форм ММП-2 и ММП-9, однако различия не достигали статистической значимости.

Выводы. С возрастом в ММСК-ЖТ пациентов с ИБС происходит активация системы факторов внеклеточного протеолиза: повышение экспрессии α PA и α PAR, увеличение продукции клетками PAI-1 и про-ММП-2 и -9. Это может отражать реакцию прогениторных стромальных клеток на изменения ВКМ, происходящие при старении, повышенный уровень провоспалительных факторов и активных форм кислорода, а также может рассматриваться в качестве компенсаторного механизма для более эффективной активации факторов роста, продукция которых снижается с возрастом.

Финансовая поддержка. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта № 16.512.11.2251 Министерства образования и науки Российской Федерации, а также гранта №241558 (SICA-HF) Седьмой рамочной программы Европейского союза [FP7/2007-2013], Государственного контракта №02.527.11.0007 Министерства образования и науки Российской Федерации и гранта №16.512.11.2262 Федерального агентства науки и инноваций Российской Федерации.

С.В. Жарков, В.В. Минин, Е.Л. Ткаченко,
Г.В. Мороз, В.Н. Мещанинов,
С.В. Сазонов

Содержание гетерохроматина в ядрах клеток буккального эпителия у пациентов с соматической патологией разной степени тяжести, как показатель биовозраста

ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург
ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия», Минздрава России, Екатеринбург
ЦГКБ № 24, Екатеринбург
Prof - SSazonov@yandex.ru

S.V. Zharkov, V.V. Minin, E.L. Tkachenko, G.V. Moroz,
V.N. Meshchaninov, S.V. Sazonov

Concentration of nuclear heterochromatine in buccal epithelium cells in groups of patients with various degree of diseases as the bioage index

Существуют различные методики определения биовозраста человека, однако по-прежнему требуются точные, недорогие, быстрые и инва-

зивные способы определения связанных с биовозрастом показателей. На жизненные функции влияют заболевания, увеличивая вероятность смерти, что позволяет рассматривать их как факторы, ускоряющие старение и увеличивающие биологический возраст (В.Н. Мещанинов, 2011). Однако определение биологического возраста по комплексу психо-физиологических параметров с использованием нагрузочных проб в остром и подостром периоде течения заболеваний ограничено (А.В. Токарь, 1990; Л.М. Белозерова, 2000). Одним из возможных способов устранения этих противоречий является определение гетерохроматина в ядрах клеток, как показателя транскрипционной активности в соматических клетках. Клетки буккального эпителия человека просты в получении для анализа и способны отражать его функциональное состояние (В.Г. Шахбазов, 2001; Ю.Г. Шкорбатов, 2010). Степень конденсации вещества хромосом чувствительна к внешним воздействиям (О.В. Мячина, 2012; И.К. Волошин-Гапонов, 2013), это позволяет предположить ее зависимость от возраста и от некоторых заболеваний.

Цель исследования. Оценить возможности использования определения содержания хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека в качестве маркера биовозраста и функционального состояния.

Материал и методы. Исследование выполнено на 37 добровольцах мужского (20 чел.) и женского пола (17 чел.) с календарным возрастом от 26 до 75 лет. Привлекались пациенты стационара кардиологического отделения (19 чел.), с диагнозом: «ИБС. Нестабильная стенокардия. Гипертоническая болезнь III ст., р.4. ХСН I-II ФК по NYHA, I ст. по Н.Д. Стражеско — В.Х. Василенко. Метаболический синдром», и практически здоровые люди (18). Получение периферической крови и слюны, содержащей клетки буккального эпителия производили в 8.30 утра. Общие биохимические показатели, отражающие обмен белков, липидов, углеводов, исследовали на биохимическом иммуноферментном анализаторе (Chem Well, Awareness Technologies, США) в сыворотке крови пациентов с использованием реактивов «SPINREACT» (Испания). В периферической крови пациентов определяли общие гематологические показатели (гематологический анализатор ERMA PCE 90VET, Walpole, США). Для оценки геропротективного эффекта определяли биовозраст (программа «BIOAGE Polinom», Свидетельство № 2012613817) (Токарь А. В. и др., 1990; Гаврилов И.В. и др., 2012). Препарат клеток буккального эпителия окрашивали ацеторсеином и оценивали интенсивность окрашивания ядер при помощи светового микроскопа (Mikros MC 300TFXS, тринокулярный, флуоресцентный с оптикой ICO Infinite, Mikros, Австрия). Статистическая обработка результатов исследований проводилась методами вариационной статистики с применением программного комплекса Stata 6.0 (Stata Corporation, США).

Результаты и обсуждение. Среднее отклонение биологического возраста от паспортного в группе практически здоровых людей составило 10 лет, против 4 лет у больных при значительно большей дисперсии, что свидетельствует об увеличении биовозраста при патологии, а также о различном

влиянии патологии на функциональные параметры организма. Коэффициент корреляции биовозраста и содержания гетерохроматина во всех группах оказался достаточно значимым (от -0,79 до -0,89), за исключением группы мужчин с сердечно-сосудистыми заболеваниями, где он имеет обратное направление (+0,4). Сравнение биовозраста с биохимическими показателями и с показателями гематологии у пациентов стационара не дали выраженной корреляционной зависимости, кроме содержания сегментоядерных нейтрофилов ($r = -0,52$, $p < 0,05$). Таким образом, определение содержания гетерохроматина может быть использовано в диагностических целях для дополнения методики определения биовозраста и расширения показаний к ее использованию.

Выводы. Содержание гетерохроматина в ядрах клеток буккального эпителия здоровых мужчин и женщин различных возрастных групп, а также женщин, имеющих сердечно-сосудистые заболевания, достоверно коррелирует с их биологическим возрастом.

А.Е. Зверева, А.И. Улыбин, Ю.В. Бабушкина,
О.Г. Макеев

Опыт применения смешанных культур аутогенных клеток для терапии нейротрофических язв нижних конечностей

ГБОУ ВПО Уральская государственная
медицинская академия Минздрава России,
Екатеринбург
ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных
технологий», Екатеринбург
Prof - SSazonov@yandex.ru

A.E. Zvereva, A.I. Ulybin, Y.V. Babushkina,
O.G. Makeev

Experience of using a mixed culture of autologous cells for the treatment of neurotrophic ulcers of the lower limbs

Сахарный диабет (СД) признан одним из наиболее распространенных неинфекционных заболеваний в мире. По данным Международной диабетической федерации к 2030 г. число больных в мире составит 439 млн человек. При этом у 10% больных СД формируются нейротрофические язвы нижних конечностей (НТЯНК), с течением времени приводящие к ампутации.

С целью повышения эффективности клеточной терапии НТЯНК и сокращения сроков лечения нами разработана технология, основанная на использовании смешанной культуры немодифицированных аутогенных фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

Исследование проводилось после одобрения протокола локальным этическим комитетом ГКБ № 40 г. Екатеринбурга.

Терапия повреждений кожных покровов с использованием клеточных культур проведена у 10 пациентов (7 женщин и 3 мужчин) с СД II типа тяжелой степени. Средний возраст пациентов составил 65,16 лет. Стаж СД — 8,16 лет. У всех пациентов имелись обширные язвенные дефекты на стопе или голени без признаков регрессии в течение 6 и более меся-

цев. У трех исследуемых достаточный объем жировой ткани в эксплантате позволил получить стабильные линии Stro-1, CD73, CD90 и CD105 позитивных и CD34, CD45 и CD14 негативных клеток, использованных для формирования смешанной культуры фибробластов и ММСК.

Клетки однократно наносили на раневую поверхность в виде суспензии, содержащей не менее 8×10^6 живых клеток в растворе фосфатного буфера и фиксировали фибриновой пленкой, полученной из крови пациента, и адсорбирующей повязкой «Тиелле» (для «влажного» заживления).

При применении монокультур фибробластов сроки полного закрытия язвенной поверхности варьировали от 9 до 21 нед. Уже на первой неделе наблюдения закрытие язвы происходило на 47%. Далее скорость заживления замедлялась, а к третьей неделе закрытие раневого дефекта составляло в среднем 67%, на шестой неделе — 80%, а полное закрытие раны происходило в среднем через 15 нед.

При применении смешанных культур аутофибробластов и ММСК сроки заживления сокращались в 3 раза.

Так, на первой неделе язвенный дефект закрывался на 50–85% (в среднем на 65%), на третьей неделе — от 90% до 100%. Полное закрытие язвенного дефекта происходило на 3–5 нед. При этом снижение скорости заживления не наблюдалось ни у одного из пациентов.

Таким образом, повышение доли ММСК в культуре способствует активному заживлению и максимально полному восполнению всех клеточных элементов на этапах закрытия раневой поверхности. При этом наличие фибробластов формирует необходимое для функционирования ММСК микроокружение, включающее внеклеточный матрикс, насыщенный синтезированными питательными веществами и цитокинами.

В ходе последующего наблюдения пациентов в течение 3 лет (2009–2012 гг.) случаев рецидива НТЯНК в области первичного поражения зарегистрировано не было.

В.Л. Зорин¹, А.И. Зорина¹, П.Б. Копнин^{1,2},
Г.А. Воложин³, А.М. Панин³

Изучение фенотипического профиля и остеогенных свойств фибробластов десны

¹ Институт стволовых клеток человека,
Москва

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

³ Медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова, Москва
doc_zorin@pisem.net

V.L. Zorin, A.I. Zorina, P.V. Kopnin, G.A. Volozhin,
A.M. Panin

The study of phenotypic profile and osteogenic properties of gingival fibroblasts

Введение. Несмотря на значительный арсенал материалов для костной пластики и широкий диапазон методов реконструкции кости, восстановление утраченных костных структур челюстей, по-прежнему, представляет собой сложно решаемую

проблему хирургической стоматологии и дентальной имплантологии. В этой связи для активации репаративного остеогенеза в зоне дефекта рассматривается возможность реализации терапевтической стратегии, в основе которой лежит применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) — недифференцированных или малодифференцированных предшественников, дающих начало различным типам соединительной ткани. Долгие годы в качестве основного источника ММСК рассматривали костный мозг. Между тем, для стоматолога наиболее удобным ресурсом для получения клеточного материала являются ткани полости рта. В связи с этим нами предпринята попытка поиска альтернативного источника с целью получения культур клеток с остеогенными потенциалами для дальнейшего их эффективного использования в регенеративной хирургии костной ткани. Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные позволяют предположить, что адекватной заменой этим клеткам могут быть фибробластоподобные клетки, выделенные из соединительной ткани десны. В культуре данные клетки активно продуцируют проколлаген, проэластин, гликозаминогликаны, факторы роста и другие компоненты межклеточного матрикса. При использовании *in vivo* они не вступают в конфликт с собственной иммунной системой, не вызывают аллергических и других побочных реакций.

Цель работы: исследовать возможность использования фибробластов десны (Фд) для восстановления утраченных костных структур челюстей.

Материал и методы. Фибробласты выделяли из биоптатов десны (2–3 мм в диаметре), у 10 здоровых добровольцев по стандартной методике. *Клональный анализ* проводили, используя клетки 1 пассажа. Эффективность колониеобразования фибробластов (ЭКОф) определяли после стандартной окраски, за колонию принимали клон клеток, содержащий не менее 50 клеток. *Иммунофлуоресцентный анализ* проводили, используя первичные и вторичные моноклональные антитела, меченные родамином. Поверхностные маркеры (CD) определяли посредством цитофлуориметра FACS Canto™ II с программным обеспечением «FACSDiva™» (Becton Dickinson, США). *Индукцию остеогенной дифференцировки* фибробластов осуществляли на среде α -Mem, 10% фетальная сыворотка коров (ФСК) с добавлением 10 нМ дексаметазона, 10 мМ β -глицерофосфата и 0,2 мМ аскорбиновой кислоты. В качестве критериев остеогенной дифференцировки использовали образующиеся кальцификаты и экспрессию остеокальцина.

Результаты. *Анализ иммунофенотипа фибробластоподобных клеток*, выделенных из десны человека, показал отсутствие у них гемопоэтических (CD34, CD45), эпителиальных (панцитокератины 14-16, 19) и наличие мезенхимных (CD73, CD90, CD105) поверхностных маркеров. Клетки экспрессировали также внутриклеточные маркеры фибробластов — коллагены I, III типа, эластин и виментин. *Эффективность колониеобразования фибробластов* (ЭКО-ф) десны составила в среднем $57 \pm 2\%$. Выявлено, что Фд образуют колонии, отличающиеся между собой по размерам и морфологии составляющих их клеток, которые по аналогии с колониями фибробластов кожи обозначены как плотные,

диффузные и смешанные. При этом доля плотных колоний в 5–10 раз превышает доли смешанных и диффузных колоний. *Остеогенная дифференцировка фибробластов десны.* При культивировании Фд в условиях, способствующих остеогенной дифференцировке, во всех исследуемых культурах отмечено изменение морфологии клеток с классической веретеновидной формы на кубоидальную — характерную для остеобластов. Гистохимический анализ с использованием окраски Alizarin Red S продемонстрировал наличие кальцификатов во внеклеточном матриксе. При этом выявлено, что все исследуемые культуры фибробластов десны, без исключения, демонстрируют способность к дифференцировке в остеогенном направлении. Случаев спонтанной остеогенной дифференцировки фибробластов десны в контрольных культурах (состав культуральной среды — α -Mem, 10% ФСК) не отмечалось. Проведенный иммуногистохимический анализ исследуемых культур фибробластов десны выявил экспрессию ими остеокальцина.

Заключение. Полученные нами результаты характеризуют фибробласты десны, как однородную культуру, состоящую из мезенхимных клеток с высоким клоногенным и остеогенным потенциалами и позволяет рассматривать данные клетки в качестве перспективного компонента для создания тканеинженерных конструкций с целью восполнения утраченных скелетных тканей в челюстно-лицевой хирургии.

В.Л. Зорин ^{1,2}, П.Б. Копнин ^{1,2},
Е.В. Соловьёва ¹

Сравнительный анализ сывороток и сред для культивирования фибробластов

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва

² НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва
doc_zorin@pisem.net

V.L. Zorin, P.V. Kopnin,
E.V. Solovieva

Comparative analysis of serums and mediums for fibroblasts cultivation

Известно, что процесс клеточной экспансии значительно зависит от состава культуральной среды, способствующей не только получению необходимого количества клеток, но и их размножению без потери морфо-функциональных свойств. Культуральная среда, в зависимости от задач исследования, стандартно дополняется определенным количеством сыворотки животного происхождения. Являясь источником ростовых факторов, цитокинов, гормонов и липопротеидов, сыворотка служит фактором, определяющим пролиферативный и функциональный потенциал клеток. В настоящее время наряду с классической прописью, включающей использование сывороток животного происхождения, все чаще рассматривается использование промышленных культуральных сред — бессывороточных и низкосывороточных.

В этой связи нами проведена оценка большинства имеющихся на российском биотехнологическом рынке бессывороточных и низкосывороточных сред и сред с добавлением сывороток различного про-

исхождения (плодов коров (FBS), крупного рогатого скота (BS), телячьей сыворотки (FCS), сыворотки человека (аутогенной).

В качестве критерия оценки тестируемых сред использовали эффективность колониеобразования фибробластов (ЭКО-ф), полученных из двух источников — кожи и десны человека.

Материал и методы. *Сыворотки и среды.* В табл. 1 представлены сыворотки, источник их происхождения, процентное содержание в культуральной среде. В табл. 2 — промышленные бессывороточные среды и среды, с низким содержанием сыворотки.

Биоптаты дермы и десны (диаметром 2–4 мм) получали от здоровых доноров (n = 10, возраст 25–48 лет) под местным обезболиванием 2% раствором лидокаина.

Выделенные путем ферментативной обработки биоптатов ММСКные клетки десны и кожи культивировали в условиях 37°C, 5% CO₂ в стандартной среде (DMEM/HG, 10–20% FBSd, 40 мкг/мл гентамицина). Замену среды осуществляли 2–3 раза в неделю. Клетки пассировали при достижении 80–90% монослоя.

Клональный анализ проводили после 2-го пассажа. Посев фибробластов производили с плотностью 90 клеток на 25 см² чашки Петри. Клетки культивировали в течение 14 дней (среда DMEM/HG с добавлением тестируемой сыворотки или тестируемая промышленная среда), после чего образовавшиеся колонии окрашивали по стандартной методике красителем KaryoMAX® Giemsa Stain Stock Solution (Gibco, США), затем изучали количество колоний и морфологию составляющих их клеток.

Таблица 1. Сыворотки, используемые для культивирования

№ п/п	Сыворотка	Сокращение	Производитель	Содержание сыворотки для КО, %
1	Аутологичная сыворотка крови донора	HuS	–	20%
2	FBS defined	FBSd	HyClone, США	20%
3	FBS Characterized	FBSch	HyClone, США	20%
4	FBS Research Grade	FBSrg	HyClone, США	20%
5	Fetal clone III	Fcl3	HyClone, США	20%
5	FBS MSC	FBS MSC	Gibco, США	20%
6	FCS	FCS	Eurobio, Европа	20%
7	FBS EU	FBS EU	РАА, Австрия	20%
8	FBSgold	FBS gold	РАА, Австрия	20%
9	FBS ESC tested	FBS ESC	РАА, Австрия	20%
10	FBS USA	FBS USA	РАА, Австрия	20%
11	FBS South America	FBS SA	Biowest, США	20%

Таблица 2. Промышленные культуральные среды

№ п/п	Среды	Производитель	Описание среды
<i>Бессывороточные среды</i>			
1	Stem Pro MSC SFM/StPro	Gibco, США	DMEM, нуклеиновые кислоты
2	Panserin 401/Pan401	PAN-Biotech, США	IMDM, следовые элементы, альбумин, холестерол, витамины, липиды сои
3	Panserin 411/Pan411	PAN-Biotech, США	IMDM, следовые элементы, альбумин, холестерол, липиды сои, витамины, инсулин
<i>Низкосывороточные среды</i>			
4	Mesen Pro RS/MesPro	Gibco, США	DMEM, нуклеиновые кислоты, 2% FBS
5	Advenced MEM/AdvMEM	Gibco, США	MEM, ITS, следовые элементы, 2% FBS
6	Advenced DMEM/AdvDM	Gibco, США	DMEM, ITS, следовые элементы, 2% FBS
7	Advenced DMEM-F12/AdvDM-F12	Gibco, США	DMEM/F12, ITS, следовые элементы, 2% FBS
<i>Полная среда для фибробластов</i>			
8	Quantum 333/Q333	РАА, Австрия	MEM, инсулин, следовые элементы, глюкоза, сыворотка

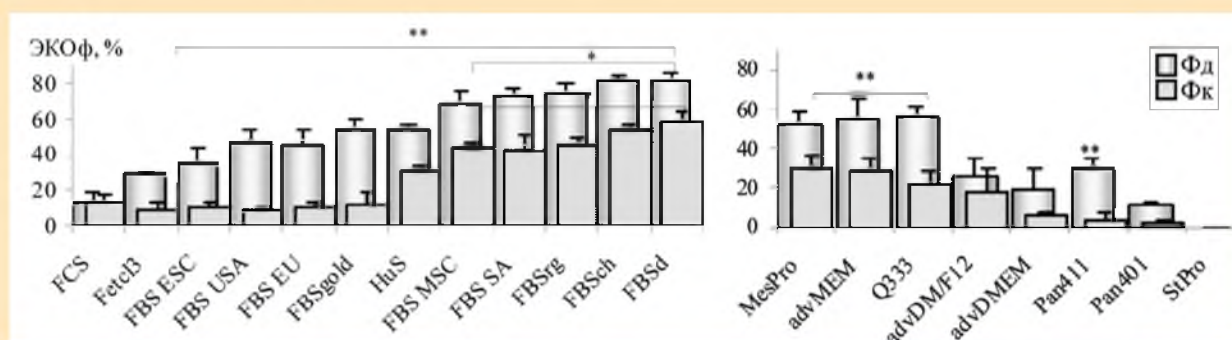
Результаты. В зависимости от используемой сыворотки и промышленных сред ЭКОф кожи варьировала от $13 \pm 2\%$ до $51 \pm 8\%$, десны — от $34 \pm 20\%$ до $75 \pm 6\%$ (рис.). Полученные данные позволили разделить исследуемые сыворотки на две группы. Сыворотки первой группы — FBS MSC, FBS SA, FBSrg, FBSch и FBSdef способствовали высокой ЭКОф кожи ($51 \pm 8\%$) и ЭКОф десны ($75 \pm 6\%$); сыворотки второй группы — FCS, Fetcl3, FBS ESC, FBS USA, FBS EU и FBSgold — низкой ЭКОф кожи ($10 \pm 1\%$) и средней ЭКОф десны ($42 \pm 13\%$). Применение аутосыворотки крови человека (HuS), низкосывороточных сред — AdvMem, MesPro и полной среды для фибробластов — Q333 способствовало среднему уровню ЭКОф: кожи — $31 \pm 3\%$, десны — $54 \pm 4\%$ (HuS); кожи — $26 \pm 4\%$, десны — $54 \pm 2\%$ (AdvMem, MesPro и Q333) (см. рис.). В бессывороточных средах — StPro, Pan411, Pan401 и низкосывороточной AdvDM образование колоний фибробластами кожи, практически, отсутствовало ($4 \pm 2\%$), а ЭКОф десны было достаточно низким ($25 \pm 5\%$).

Следует отметить, что использование культуральной среды с FBS, обеспечивающей высокую ЭКОф, способствовало получению первичной культуры фибробластов (и кожи, и десны) во всех случаях без исключения, в отличие от бессывороточных сред, где данный процесс всегда был безуспешным.

Выводы

1. Самая высокая ЭКОф наблюдается в средах с использованием сывороток группы FBS. Однако следует учитывать, что в зависимости от производителя разные лоты одной партии сыворотки могут значительно варьировать, поэтому перед использованием лоты сыворотки следует тестировать и выбирать наиболее эффективные.

2. Использование аутосыворотки и промышленных сред AdMEM, MesProRS, Quantum 333 может служить перспективной альтернативой FBS. 3. Интересно отметить, что фибробласты, полученные из десны человека, по ЭКОф превосходят фибробласты кожи в 1,5–2,0 раза.



ЭКОф кожи и десны: * — отличие ЭКОф для сывороток первой группы от сывороток второй группы с $p \leq 0,05$;

** — достоверное отличие между фибробластами кожи и десны с $p \leq 0,05$

В.Л. Зорин¹, П.Б. Копнин^{1, 2}, В.С. Комлев³,
А.И. Зорина¹, Е.В. Соловьева¹, И.И. Еремин^{1, 4}

Изучение возможности применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из десны человека, в составе тканеинженерного конструкта для восстановления костных тканей пародонта

¹ Институт стволовых клеток человека», Москва

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

³ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва

⁴ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва
doc_zorin@pisem.net

V.L. Zorin, P.V. Kopnin, V.S. Komlev, A.I. Zorina,
E.V. Solovieva, I.I. Eremin

The study a possibility to use multipotent mesenchymal stromal cells isolated from human gingiva in tissue-engineering construction for periodontal bone repair

Хронический пародонтит в России наблюдается более, чем у 60% населения старше 30 лет. Прогрессирование же поражения пародонта, как известно, приводит к потере зубов, деструкции и атрофии альвеолярных отростков челюстей. Одним из подхо-

дов лечения данной патологии является применение методов пародонтальной хирургии, направленных на ликвидацию патологических зубодесневых и костных карманов, что, практически, всегда требует восполнения убыли костной ткани. Однако, если методы оперативного вмешательства отработаны и стандартизованы, то проблема эффективного восполнения объема костной ткани, по-прежнему остается актуальной. Имеющиеся на сегодняшний день остеопластические материалы не отвечают всем требованиям специалистов. Так, применение аутогенной костной ткани (идеального остеопластического материала) сопровождается нанесением дополнительной травмы пациенту и расширением зоны оперативного вмешательства; недостатком использования синтетических остеопластических материалов является низкая остеоиндукция.

В этой связи, разработка биосовместимого тканеинженерного конструкта (ТИК), содержащего клетки с высокой способностью к остеогенной дифференцировке является одним из наиболее перспективных подходов к решению данной непростой проблемы. В качестве клеточного материала представляется весьма перспективным использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из десны пациента (ММСКд). Выбор данного источника клеток обусловлен легкой доступностью получения биоматериала и малой травматичностью для пациента.

В качестве сравнения использовали ТИК с иммобилизованными на носителе мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, выделенными из костного мозга человека (ММСК_{км}), которые, как известно, обладают высоким остеогенным потенциалом.

Материал и методы. Первичные культуры ММСК_д получали из биоптатов десны и подвздошной кости здоровых доноров (возраст 25–50 лет). Экспрессию генов — коллагена I, III типа, эластина и виментина определяли методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием первичных антиген-специфичных и вторичных флуоресцентно-меченых антител.

Поверхностные маркеры анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В работе использовали флуоресцентные антитела к маркерам гемопоэтических (CD34, CD45), мезенхимных (CD73, CD90, CD105) и эпителиальных (цитокератины 14, 15, 16 и 19, CD324) клеток.

Для функциональной идентификации клеток использовали набор R&D Systems (США), в состав которого входят специфические индукционные среды и антитела (FABP4, агрекан, остеокальцин) для детекции адипо-, хондро- и остеодифференцировки клеток.

Для определения эффективности остеогенеза использовали гетеротопическую модель с подкожным введением трикальцийфосфатного (ТКФ) материала (различные его модификации, синтезированные в ИМЕТ РАН), с иммобилизованным на нем клеточным материалом, бестимусным мышам с последующим иммуногистохимическим анализом срезов полученного биоматериала.

Результаты. Иммунофенотипический анализ клеток, выделенных из десны и костного мозга человека, продемонстрировал отсутствие у них гемопоэтических (CD34, CD45), эпителиальных (цитокератины 14–16, 19) и наличие мезенхимных (CD73, CD90, CD105) поверхностных маркеров. Клетки экспрессировали внутриклеточные маркеры фибробластов — коллагены I, III типа, эластин и виментин. Общий антигенный профиль исследуемых ММСК_д, выделенных из десны и костного мозга — сходен.

Дифференцировочный анализ показал, что ММСК_д, также как и ММСК_{км}, под действием специфических факторов способны дифференцироваться в различных направлениях, приводя к появлению в культурах клеток с фенотипом и белковыми маркерами, характерными для остеобластов, хондроцитов, адипоцитов и миофибробластов. При этом при дифференцировке *in vitro* под действием остеогенных индукционных факторов в течение 14 дней ММСК_д и ММСК_{км} регистрируются основной белок остеобластов — остеокальцин и процессы минерализации.

Гистологический анализ срезов биоматериала, полученных при подкожном введении ТКФ и ТИК бестимусным мышам, показал, что в случае комбинации клеток с носителем наблюдается значительно более выраженная экспрессия остеокальцина, чем при использовании носителя без клеток. При использовании ТИК отмечена также их значительная васкуляризация — одно из важнейших условий нормального остеогенеза. Сравнение эффективности стимуляции остеогенеза ММСК_д и ММСК_{км} показало, что в первом случае остеогенные процессы носят более выраженный характер.

Среди различных модификаций ТКФ наиболее эффективным носителем зарекомендовал себя ТКФ с пористой/фестончатой структурой, обладающей максимальной клеточной емкостью.

Выводы. Полученные результаты позволяют заключить, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из десны, можно рассматривать в качестве оптимального клеточного компонента в тканеинженерном конструкте для восстановления костных тканей пародонта. В качестве носителя оптимально использовать ТКФ с пористой/фестончатой структурой, обладающей максимальной клеточной емкостью. Не вызывает сомнений перспективность использования такого тканеинженерного конструкта, как альтернативного остеопластического материала для восстановления костных тканей пародонта.

А.И. Зорина, В.Л. Зорин, В.Р. Черкасов, Р.В. Деев, А.А. Исаев

Медицинские клеточные технологии в эстетической медицине и реконструктивной хирургии: возможности и тренды

*Институт стволовых клеток человека, Москва
doc_zorin@pisem.net*

A.I. Zorina, V.L. Zorin, V.R. Cherkasov, R.V. Deev, A.A. Isaev

Medical cell technologies in esthetic medicine and reconstructive surgery: opportunities and prospects

В настоящее время официально признанными в мировой практике эстетической медицины являются две технологии, основанные на применении аутогенных клеток пациента. Одна из технологий относится к области пластической и реконструктивной хирургии и представляет собой коррекцию дефектов мягких тканей лица и тела посредством жирового трансплантата (липофиллинг), обогащенного стромально-васкулярной клеточной фракцией (СВКФ), выделенной из жировой ткани пациента. Терапевтическая стратегия данной технологии основана на том, что жировой трансплантат, используемый при стандартном липофиллинге, содержит недостаточное для полноценного приживания количество кровеносных сосудов и стволовых и (или) прогениторных клеток; устранить этот дефицит возможно обогащением данного трансплантата свежесывороточной из жировой ткани стромально-васкулярной клеточной фракцией (СВКФ), что позволяет значительно повысить приживаемость трансплантируемого жира и сохранить его объем.

Известно, что СВКФ — это уникальный клеточный комплекс, содержащий стволовые клетки жировой ткани (которые являются ключевым компонентом СВКФ), эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, перитциты, фибробласты, клетки крови. Положительное влияние СВКФ на репаративные процессы в зоне трансплантации обусловлено кооперативным взаимодействием входящих в его состав клеток и продуцируемых ими факторов роста/цитокинов. Выделяют СВКФ посредством биотехнологических методов («вручную» или посредством Celution Device Cytorig, Therapeutics, Inc., США в течение 1,5 ч, минуя стадию культивирования клеток), в основе которых лежит

ферментативная обработка липоаспирата, концентратия и многократная отмывка нужной клеточной фракции, характеризующейся и высоким содержанием клеток, и высокой жизнеспособностью.

Результаты многочисленных клинических исследований, проведенные учеными разных стран доказали, что данный метод позволяет не только усовершенствовать стандартный липофиллинг, но и значительно расширить его возможности за счет коррекции дефектов мягких тканей, ассоциированных с такими нарушениями, как фиброз и ишемия тканей, что ранее вызывало большие трудности.

Вторая официально признанная в мировой эстетической медицине клеточная технология относится к области терапевтической косметологии и основана на применении аутогенных дермальных фибробластов для коррекции возрастных и рубцовых изменений кожи. В России данная технология разрешена к применению Росздравнадзором ОАО «Институт Стволовых Клеток Человека» (ИСКЧ) с июля 2010 г. («SPRS-терапия»).

Клинические исследования, проведенные ИСКЧ с 2010–2012 гг. на базе ЦНИИС и ЧЛХ (разрешение Ученого совета и Этического комитета ЦНИИС и ЧЛХ № 4/276 от 14.04.2010 г.) при участии ряда медицинских центров («Ланцет», «ЛегаАртис»), продемонстрировали, что после трансплантации в кожу культивированные аутофибробласты полноценно интегрируются в дерму, их биосинтетическая активность сохраняется в течение не менее 12 мес. В результате наблюдается ремоделирование микроstructures дермы, выражающееся в увеличении содержания в ней коллагеновых волокон, увеличении гидратации кожи, усилении функциональной гемомикроциркуляции, увеличении толщины дермы. Клинически перечисленные изменения в микроstructures дермы проявляются увеличением упругости, эластичности и толщины кожи, уменьшением количества и глубины морщин. Клинический эффект имеет нарастающий в течение года характер и сохраняется не менее 2 лет.

Постмаркетинговые клинические исследования, проведенные ИСКЧ в январе 2012 г. (через год после начала применения SPRS-терапии по рекомендации Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения РФ) при участии ряда косметологических клиник г. Москвы, в которых приняли участие 93 человека (14% — мужчины, 86% — женщины, средний возраст — 48 лет) продемонстрировали, что все пациенты без исключения удовлетворены клиническим эффектом. 100% пациентов отметили увеличение толщины кожи и уменьшение глубины морщин, 87% — повышение упругости, эластичности и эффект лифтинга, 73% — уменьшение количества морщин. Не было зафиксировано ни одного случая осложнений, негативных побочных реакций.

Таким образом, полученные результаты позволили заключить, что в арсенале врачей-дерматологов (косметологов) появилась инновационная технология, основанная на принципах регенеративной медицины, которая позволяет восстанавливать утраченные с возрастом структуру и функции дермы за счет уникального биологического механизма собственных клеток кожи пациента — фибробластов.

М.Е. Иванова¹, В.В. Стрельников², А.С. Танас²

Прогнозирование механизма компенсации функций сетчатки при дистрофии во время лечения стволовыми клетками

¹ Диагностический центр «Офтальмик», Москва

² ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

info@oftalmic.ru

M.E. Ivanova, V.V. Strelnikov, A.S. Tanas

Modeling of retinal function compensation in retinal dystrophies during stem cell treatment

Периферические и центральные дистрофии сетчатки — группа заболеваний, характеризующаяся высокой степенью гетерогенности, разным возрастом манифестации, скоростью прогрессирования и подходами к лечению. В связи с этим затруднена их дифференциальная диагностика по клиническим признакам. Полезным инструментом для понимания патогенеза развития дистрофии служит молекулярно-генетическое исследование с последующим созданием карты патологического метаболизма сетчатки. Такой подход всеобъемлющ, требует вовлечения больших вычислительных ресурсов и выверенных баз данных, однако именно он сможет привести к значительному повышению точности прогноза заболевания и к разработке эффективного лечения.

Применение стволовых клеток (СК) весьма перспективно, особенно в таком изолированном органе, как глаз, однако основными сдерживающими факторами являются отсутствие понимания механизма действия, наличие противоречивых результатов исследований, высокий информационный шум и отсутствие четких критериев оценки результатов их применения. Помимо вопросов встраивания ауто- или аллогенных СК в сетчатку встает масса нерешенных вопросов о влиянии генома привнесенных клеток на сохранность остаточной функции сетчатки реципиента.

В связи с чем, **целью** исследования стало прогнозирование механизма действия стволовых клеток у 12 пациентов с генетически подтвержденным диагнозом дистрофии сетчатки.

Материал и методы. В исследование были включены 4 пациента с болезнью Штаргардта, (*P1*: ABCA4 с.3113C>T, с.1622C>T, RDH12 с.482G>A, *P2*: ABCA4 с.2894A>G, с.2828G>A, с.2588G>C, *P3*: ABCA4 с.1957C>T, с.203C>T, EYS с.5053T>G *P4*: GPR143 с.541G>A), две семьи по два сибса с синдромом Ашера (*P5*, *P6*: USH2A с.4174G>T, PROM1 с.1550G>A, *P7*, *P8*: USH1B с.47T>C), трое пациентов с пигментной дегенерацией сетчатки (*P9*: USH2A с.1502A>T, *P10*: USH2A: с.11156G>A, *P11*: USH1B с.1373A>G) и 1 пациентка с периферической витреохориоретинальной дистрофией (ПВХРД) вследствие миопии высокой степени (*P12* ABCA4 с.1117T>G, COL3A1 с.4073G>A). При молекулярной диагностике применялась панель Ion AmpliSeq™ Inherited Disease Panel компании Life Technologies. Пациенты подвергались стандартному офтальмологическому обследованию.

Результаты и обсуждение. В исследуемой группе пациентов рассмотрены 4 вида заболеваний, поразному приводящих к дистрофии сетчатки: болезнь Штаргардта (4 пациента), синдром Ашера (4 пациента), тапеторетинальная абнотрофия сетчатки, или пигментный ретинит, (3 пациента) и близорукость

высокой степени (1 пациент), для каждого из которых описан предполагаемый механизм патогенеза.

Наиболее перспективным будет применение стволовых клеток со свойствами, которые должны компенсировать:

- в первом случае транспортную функцию белка-переносчика АТФ в фоторецепторах и пигментном слое;

- во втором случае структурную компоненту базальной мембраны сетчатки, а также кортиевого органа;

- в третьем случае актин-связывающие заякоривающие функции миозина;

- в четвертом случае транспортную функцию белка-переносчика АТФ и сохранность структуры склерального каркаса глаза.

Поэтому необходимо в каждом конкретном случае достигнуть в СК повышенной экспрессии перечисленных факторов, улучшающих жизнедеятельность сетчатки, прежде, чем вводить СК в сетчатку.

Применение СК в лечении дистрофий сетчатки неоднозначно, однако в перспективе может оказаться эффективным. Для этого сначала необходимо описать четкие критерии, по которым можно отслеживать поведение СК в сетчатке с помощью имеющихся диагностических методов, например, адаптивная *in vivo* микроскопия, ОСТ, молекулярные маркеры, выделяемые со слезой и ВГЖ. Затем необходимо наладить создание СК с определенными паттернами экспрессии, необходимыми в каждом конкретном клиническом случае. А. Kvant и М.К. Grudzinska в 2013 г. применили дифференцированные производные эмбриональных стволовых клеток человека для лечения географической атрофии сетчатки (PMID: 23890249), подобная работа проводилась С.М. Ramsden, М.В. Powner (PMID: 23715550). А. Gonzalez-Cordero et al. применяют предшественники фоторецепторов из эмбриональных СК человека (PMID: 23873086), К. Hartmann и О. Raabe показали возможность дифференцировки стволовых клеток из амниотической жидкости в нейронаподобные и даже ретиноподобные клетки для лечения дистрофий сетчатки (PMID: 23862099).

Выводы. Необходима разработка методологии создания генотип-фенотип корреляционных карт в изучении патогенетических путей развития наследственных заболеваний сетчатки с целью компенсации недостающих метаболических путей с помощью различных методик, в том числе стволовых клеток. Необходимо разработать методы, отслеживающие поведение в сетчатке имплантированных СК.

Финансирование: Oftalmic ltd.

М.З. Кауламбаева¹, Г.В. Федотовских²,
Н.Н. Ахметсадыков¹, М.Б. Озбеков¹,
А.Б. Нурмухамбетова¹, С. Жумагаликызы¹

Экспериментальное обоснование применения клеточных технологий для лечения деструктивно-воспалительных заболеваний суставов

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

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

M.Z. Kaulambayeva, G.V. Fedotovskih,
N.N. Achmetsadykov, M.B. Ozbekov,
A.B. Nurmuhambetova, S. Zhumagalikyzy

Experimental justification for the use of cellular technology for the treatment of inflammatory-destructive diseases of joints

Лечение воспалительных заболеваний суставов является одной из актуальных проблем современной медицины. В случаях воспалительно-деструктивных заболеваний или тяжелых травматических повреждений регенеративная способность хрящевой ткани оказывается недостаточной для восстановления поврежденных суставов. Применение методов клеточной трансплантологии в таких случаях может дать хороший результат. Внесение в зону дефекта стромальных клеток-предшественников из костного мозга является одним из способов оптимизации регенеративного процесса в пораженном суставе.

Цель исследования: определить эффективность применения фракции мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) для лечения воспалительно-деструктивных заболеваний суставов.

Материал и методы. В эксперименте использовали кроликов с экспериментальной моделью воспалительно-деструктивных заболеваний коленного сустава, массой тела 3–4 кг, в количестве 15 голов (самцы). Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1 — контрольная группа — без лечения; 2 — испытываемая группа — введение в сустав мононуклеарной фракции аутогенных клеток (МНК) костного мозга кроликов; 3 — испытываемая группа — введение в сустав культивированных ММСК костного мозга кроликов.

На 40 сут. эксперимента подопытных животных усыпляли раствором 2% рометара, затем удаляли правый сустав с эпифизами, который фиксировали в 10% растворе формалина. После фиксации сустав заключали в парафин, готовили гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты. Морфологическое исследование синовиальной оболочки сустава животных контрольной группы показало, что покровный слой клеток на большей части суставной оболочки был слущен. Оставшиеся фрагменты — некротизированы, располагаясь на резко отеком поверхностном коллагеново-эластичном слое. Субпокрывной слой синовиальной оболочки был резко утолщен. В синовиальной оболочке были видны зоны макрофагально-плазмодитарной инфильтрации. Эндотелий капилляров подвергался деструкции, встречались очаги кровоизлияний. В перихондральной части синовиальной

оболочки отмечена выраженная узорчатость хряща с наличием пустых лакун. Таким образом, синовиальная оболочка суставов характеризовалась наличием хронического синовита с деструкцией синовиоцитов, утолщением и воспалительной инфильтрацией субпокрывного слоя.

При морфологическом исследовании синовиальной оболочки суставов животных второй группы были отмечены участки, покрытые крупными пролиферирующими синовиоцитами. Субпокрывной слой рыхлой соединительной ткани содержал множество мелких кровеносных сосудов и характеризовался слабой воспалительной инфильтрацией. Глубокий коллагеново-эластический слой прилегал к слегка узурированной хрящевой поверхности.

При морфологическом исследовании синовиальной оболочки суставов животных третьей группы утолщенный регенерирующий покрывной слой синовиоцитов располагался на резко гипертрофированном субпокрывном слое, богатом сетью кровеносных сосудов. Коллагено-эластические слои синовиальной оболочки были гипертрофированы и прилегали к пролиферирующим элементам хрящевой пластинки.

Заключение. Эффективными трансплантируемыми клетками костного мозга для лечения деструктивно-воспалительных заболеваний суставов в эксперименте были как моноклеарная фракция аутогенных клеток костного мозга, так и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, стимулирующие процессы неоангиогенеза. Необходимо отметить, что при введении ММСК уменьшаются деструктивные изменения и более активен пролиферативный процесс.

Работа была выполнена в рамках научно-технической программы «Инновационные технологии в развитии клеточных трансплантаций и восстановлении функциональной активности органов и тканей» АО Национального научного медицинского центра МЗ РК.

А.И. Ключникова, Н.И. Лисяный, Е.В. Задорожна

Влияние стромально-васкулярной фракции клеток костного мозга на заживление кожных ран у мышей

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова НАМН Украины», Киев, Украина
Goga - dp@ukr.net

A.I. Kluchnikova, N.I. Lisianuy, E.V. Zadorozna

Influence stromal-vascularis fractions of cells of a bone brain on healing of skin wounds at mice

Сегодня стали широкоизвестными данные, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) положительно влияют на регенеративные процессы различных тканей за счет высокого уровня пролиферативного потенциала и способности к дифференцировке в разные зрелые типы клеток (хондроциты, остециты и адипоциты) обеспечивая микроокружение гемопоэтических стволовых клеток. МСК обладают иммуномодулирующими свойствами, что позволяет рассматривать их в качестве средств предупреждения и лечения иммунопатологических процессов. Известно также, что МСК принимают участие в регенерации целостности кожи после повреждений, то есть реализуют репаративный гистогенез в дерме.

Целью работы являлось изучение влияния различных стромально-васкулярных фракций (СВФ) клеток, полученных из костного мозга, на скорость заживления кожных ран у мышей.

Материалы и методы. Стромально-васкулярную фракцию клеток костного мозга получали согласно методике S. Jang и соавт. (2010), после адгезии суспензии клеток в течение 3 и 24 ч инкубации на пластиковых чашках Петри. Культивирование проводили в полной питательной среде ДМЕМ с 10% телячьей сывороткой и 0,02 мл гентамицина в CO₂-инкубаторе. Мышам наносили открытую рану размером 1 см² согласно методике (Н.Л. Курилко и др. 2009).

Проведено несколько экспериментов: животным на 1-е и 3-е сутки после нанесения раны под раневую поверхность вводили клетки СВФ, адгезированные в течение 3 ч, на 21-е сутки культивирования в концентрации $1,6 \times 10^5$ клеток на животное. Мышам второй группы под рану вводили клетки стромально-васкулярной фракции после 24 ч адгезии, на 21-е сут. культивирования в концентрации $0,6 \times 10^5$ клеток на животное. Экспериментальным животным третьей группы под рану вводили питательную среду ДМЕМ – контрольная группа.

Результаты. Установлено, что усредненный диаметр раны в контрольной группе животных на 6-е сут. после нанесения раны составлял $0,94 \pm 0,05$ см, на 10-е сут. уменьшался до $0,78 \pm 0,05$ см, а на 14-е сут. диаметр раны составлял $0,16 \pm 0,08$ см. При введении СВФ клеток костного мозга, которые адгезировались в течение 3 ч на пластике, и затем длительно культивировались (21 сут.), усредненный диаметр раны на 6-е сут. равнялся $1,0 \pm 0,04$ см, на 10-е $0,93 \pm 0,01$ см, а на 14-е сут. уменьшился до $0,66 \pm 0,06$ см, что указывает на то, что клетки, полученные после 3-часовой адгезии, угнетают регенерацию кожи, тогда, как введение клеток, полученных из костного мозга после 24 ч адгезии ускоряют заживление кожной раны. Так, диаметр раны у животных третьей группы на 6-е сут. составлял $0,77 \pm 0,10$ см и был достоверно меньше, чем в контроле, на 10-е сут. уменьшался до $0,49 \pm 0,03$ см, а на 14-е сут. диаметр раны уменьшился до $0,08 \pm 0,05$ см, что указывает на достоверное ускорение заживления раны.

Полученные результаты показали, что введение стромально-васкулярной фракции клеток костного мозга, адгезированных в течение 3 ч или 24 ч к пластике и после длительного культивирования (21 день), по разному влияют на заживление кожной раны у линейных мышей – клетки, сорбирующие на пластике быстро (3 ч), тормозят регенерацию, а клетки 24-часовой адгезии обладали стимулирующей способностью к заживлению ран. Следовательно, в составе стромально-васкулярной фракции адгезированных клеток костного мозга имеется, как минимум две популяции клеток, с разной биологической активностью, которая выявляется после длительного культивирования. Вероятно эти клетки находятся на разных стадиях превращения в ММСК или же это разные по функции предшественники ММСК.

Выводы. Среди стромально-васкулярной фракции адгезированных клеток костного мозга мышей содержатся клетки, которые способны подавлять или стимулировать заживление ран у животных, то есть способны влиять на регенеративные и, вероятно, воспалительные процессы в коже.

И.С. Колбай¹, Л.Х. Махмудова¹, Н.О. Кудрина¹,
У.Н. Капышева², Ш.К. Бахтиярова²

Сравнительный анализ методов оценки пролиферативной активности мононуклеаров костного мозга крыс, на фоне трансфузии аллогенных мононуклеарных клеток

¹РГП «Центральная лаборатория биоконтроля, сертификации и предклинических испытаний

²РГП «Институт физиологии человека и животных»
КН МОН РК, Республика Казахстан
clbspi@nur.kz, Lola_makhmudova@mail.ru

I.S. Kolbay, L.Kh. Makhmudova, N.O. Kudrina,
U.N. Kapysheva, Sh.K. Bahtiyarova

The comparative analysis of the methods for evaluation of proliferative activity of rats' bone marrow mononuclears on the background of allogeneic mononuclear cells transfusion

Физиологическое состояние и функциональная активность клеток характеризуется показателями кинетики клеточного цикла и пролиферативной активностью [Кольман Я., 2000]. О пролиферативной активности предложено судить по величине суммарной доли S и G₂/M фаз клеточного цикла методом проточной цитометрии [Camplejohn R.S., 1995; Steck K., 1999], а также путем выявления количества клеток, находящихся в M фазе клеточного цикла. Для этих целей используют антитела к фосфорилированной форме гистона H3, экспрессия которого наблюдается при митозе [Кудрявцев И.В., 2012]. Анализ доступной литературы показал отсутствие работ по исследованиям пролиферации и кинетике клеточного цикла мононуклеарных клеток (МНК), оценке соотношения фаз клеточного цикла в различные сроки после трансплантации мононуклеарной фракции КМ реципиента, без предварительного подавления иммунитета. В связи с этим, целью данной работы явилась оценка количества МНК КМ, находящихся в различных фазах клеточного цикла до и после трансплантации аллогенных МНК КМ, без подавления иммунитета реципиента.

Материал и методы. Исследование проведено на беспородных белых крысах 4-месячного возраста. В первую группу вошли контрольные животные (I), во вторую — животные, которым выполнялось введение МНК КМ — 3 мес. (II), в третью — 6 мес. после введения (III) и в четвертую 9 мес. после введения (IV). Во всех сериях животные были без иммунной компрометации. МНК КМ получали путем промывания раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) бедренных костей. Полученную суспензию наслаивали на градиент фиколла 1,077 (Sigma, США), центрифугировали, собирали интерфазу, проводили подсчет МНК КМ. Для эксперимента использовали суспензии, в которых жизнеспособных МНК КМ было не менее 95%. Суспензию МНК КМ вводили в хвостовую вену, из расчёта $3,0 \times 10^6$ клеток на 1 кг массы тела. Анализ фаз клеточного цикла проводили на цитофлуориметре FACS Calibur (Beckton Dickinson, США) с использованием ПО CellQuestPro. ДНК окрашивали йодистым пропидием (ИП) (Beckton Dickinson, США) и антителами к гистону H₃ (Beckton Dickinson, США), в качестве диплоидного контроля использовали лимфоциты периферической крови донора. Пролиферативный индекс рассчитывали по формуле: $PI = S + G_2/M$. Полученные данные обработаны статистически с использованием непараметрического критерия

Фишера — Стьюдента, изменения считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты. Анализ данных по распределению МНК КМ по фазам клеточного цикла позволил установить, что при окрашивании ДНК ИП у крыс контрольной группы (I) $67,0 \pm 3,0\%$ находилось на стадии G₀/G₁, $10,0 \pm 1,0\%$ — в фазе S, $16,0 \pm 1,0$ — на стадии G₂/M, пролиферативный индекс составил $27,4 \pm 4,5$. Во II группе не выявлено статистически достоверных изменений, $73,0 \pm 2,0\%$ МНК КМ находились на стадии G₀/G₁, $9,0 \pm 0,8\%$ — в фазе S, $17,0 \pm 2,0\%$ — на стадии G₂/M, пролиферативный индекс составил $26,57 \pm 2,76$. В III группе не было выявлено статистически достоверных изменений $72,2 \pm 2,0\%$ МНК КМ находились на стадии G₀/G₁, $9,0 \pm 0,8\%$ в фазе S, $17,0 \pm 2,0\%$ на стадии G₂/M, пролиферативный индекс составил $27,2 \pm 2,7$. В IV группе выявлено статистически достоверное ($p \leq 0,001$) увеличение МНК КМ, $81,09 \pm 0,9\%$ в фазе G₀/G₁, на стадии S и G₂/M статистически достоверное снижение — $4,0 \pm 0,3\%$ и $12,0 \pm 1,0\%$ соответственно. Пролиферативный индекс статистически достоверно был снижен — $17,02 \pm 1,14$. По данным окрашивания антителами к H3, выявлено достоверное ($p \leq 0,001$) увеличение процента H3-гистонпозитивных МНК КМ у реципиентов в динамике, по сравнению с контролем. Так, у крыс группы I показатель составил $1,06 \pm 0,15\%$, во II группе — $0,42 \pm 0,11\%$, в III группе — $0,47 \pm 0,16\%$, в IV группе — $0,55 \pm 0,11\%$.

Заключение. Результаты исследования позволили установить, что внутривенное введение аллогенных МНК КМ не демонстрирует статистически достоверных изменений в пролиферации МНК КМ реципиента к третьему и шестому месяцу после трансфузии по данным ДНК-цитометрии. К девятому месяцу после трансфузии имеется тенденция МНК КМ к переходу в фазу покоя (G₀/G₁), а также, вероятно всего, эффект от введения МНК КМ у экспериментальных животных, согласно нашим данным, проявляется и сохраняется не более трех календарных месяцев. Считаем, что наряду с традиционными методами оценки распределения по фазам цикла в ДНК-цитометрии необходимо использовать дополнительные методические подходы в оценке пролиферативной активности популяции, в том числе для характеристики количества клеток в состоянии митоза проводить окрашивание фосфорилированной формы гистона H3. В данном случае сочетанные подходы в выявлении пролиферирующих клеток позволили точно установить как суммарное значение пролиферативного индекса, так и уровень МНК, находящихся на стадии митоза.

Данное исследование проведено в рамках бюджетного финансирования Республики Казахстан.

Ф.А. Коновалов, А.А. Исаев, Е.А. Померанцева

ПГД: рациональное репродуктивное решение при носительстве моногенных заболеваний

Институт Стволовых Клеток Человека, Москва
fedorkonov@yandex.ru

F.A. Konovalov, A.A. Isaev, E.A. Pomerantseva

PGD: a rational reproductive choice for carriers of single-gene disorders

Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) — группа методов диагностики наследственных

заболеваний у эмбриона человека до его переноса в полость матки. ПГД позволяет семьям с носительством наследственного заболевания управлять риском зачатия больного ребенка в контролируемых условиях лаборатории, где такой риск может быть адекватно оценен и исключен.

В докладе подробно рассмотрены подходы, применяемые в ПГД различных типов генных мутаций: точечных замен оснований, небольших делеций или инсерций, крупных делеций с неточно известными краями, экспансий триплетных повторов. Большинство методик, применяемых в ПГД моногенных заболеваний, так или иначе основаны на ПЦР; вместе с тем, применение ПЦР в ПГД имеет ряд особенностей как при разработке теста, так и при интерпретации результатов. В ПГД недопустимо следование лишь общим принципам разработки тест-систем, применяемым в молекулярной генетике. Классический пример — риск неамплификации аллеля (ADO), который следует компенсировать с помощью фланкирующих маркеров с обеих сторон от мутации. Учитывая этот и ряд других принципов, выработанных на практике и рекомендованных международными сообществами (в частности, ESHRE, Европейским сообществом эмбриологов и репродуктологов), ПГД может быть доведена до уровня рутинного метода в надежной специализированной лаборатории.

Основным техническим препятствием к проведению ПГД является фактор, строго говоря, не имеющий непосредственного отношения к применяемым в ПГД методикам, а именно сложность постановки молекулярного диагноза — выявления конкретной мутации, приводящей к развитию заболевания. Даже в тех случаях, когда косвенная диагностика мутации по сцепленным гаплотипам может заменить собой прямую, и знание точной молекулярной природы мутации для проведения ПГД не обязательно, необходимо по меньшей мере определить ген и гаплотип, ассоциированный с заболеванием в конкретной семье; в случае ряда клинических диагнозов (например, анемия Фанкони, синдром Альпорта) таких генов-кандидатов может быть несколько, и прямой поиск неизвестной мутации в них требует значительных усилий и средств. Надежду на постановку точного молекулярного диагноза в таких случаях дают методы, основанные на секвенировании нового поколения (NGS).

Популярность ПГД в качестве репродуктивного решения стабильно растет. Это объясняется не только повышением технологичности метода, но и рядом фундаментальных преимуществ ПГД по сравнению с альтернативными подходами в группах риска. Немаловажным преимуществом ПГД по сравнению с пренатальной диагностикой, помимо очевидного снижения риска искусственного прерывания беременности, является возможность одновременного анализа нескольких эмбрионов. Это позволяет проводить одновременно с тестом на мутацию анализ на гистосовместимость (гаплотипирование HLA) или на хромосомные aberrации (aCGH), и рассчитывать при этом на относительно высокую вероятность найти эмбрион, удовлетворяющий обоим критериям.

Согласно статистике ESHRE, в мире проведено несколько десятков тысяч циклов ПГД на моногенные заболевания, завершившихся рождением здорового ребенка. Собранные с 1997 г. данные свидетельствуют о том, что именно ПГД становится рационально обоснованным выбором для семей из групп риска, плани-

рующих беременность и рождение здорового ребенка.

К.В. Котенко, И.И. Еремин, А.А. Пулин,
И.И. Наделяева, С.Э. Восканян, В.С. Рудаков,
П.С. Еремин, Т.С. Слободина, Н.Л. Лазарева,
Ю.А. Жгуты

Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток крысам после обширной резекции печени

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России,
Москва
cd105@mail.ru

K.V. Kotenko, I.I. Eremin, A.A. Pulin, I.I. Nadelyaeva,
S.E. Voskanyan, V.S. Rudakov, P.S. Eremin,
T.S. Slobodina, N.L. Lazareva, Y.A. Zhgutov

Transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells after extensive resection of the liver on rats model

Обширная резекция печени является на сегодняшний день основным методом, позволяющим добиться заметного продления жизни, а в ряде случаев и радикального излечения больных с новообразованиями печени, раком проксимальных отделов внепеченочных желчных протоков. В то же время обширные резекции печени (ОРП) продолжают оставаться операциями высокого риска, который обусловлен опасностью развития тяжелых форм послеоперационной печеночной недостаточности.

Эффективные методы борьбы с послеоперационной печеночной недостаточностью не разработаны. Это делает актуальным поиск новых способов восстановления функции органа.

В настоящее время все большее внимание уделяется возможности аутотрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), у пациентов с раком печени, как при обширных резекциях печени, так и при эмболизации портальной вены, циррозе печени, а также гепатоцеллюлярной карциноме. Разными исследователями показана высокая эффективность применения ММСК и мононуклеаров, выделенных из костного мозга при борьбе с синдромом печеночной недостаточности различной этиологии.

Цель исследования: разработать модель ОРП и оценить безопасность и эффективность трансплантации аллогенных ММСК для ускорения регенерации и восстановления функциональной активности печени.

Материал и методы. Исследования были проведены на крысах породы Wistar весом 255–300 г. Животным под общим наркозом выполняли гепатэктомию в объеме 70% по стандартной методике. Культуры ММСК были получены от животных той же породы по стандартной методике. В работе были использованы культуры ММСК 2–4 пассажа. Животные были разделены на 2 группы по 10 животных в каждой: исследуемой группе животных интраоперационно в нижнюю полую вену были введены 2,5 млн ММСК; контрольной группе животных был введен физиологический раствор. Для оценки эффективности восстановления печени производилось мониторингирование биохимических маркеров: аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) в динамике: на 1, 2, 4 и 7-е сут. после операции.

Результаты и обсуждение. Во всех группах оперированных животных наблюдалось увеличение

уровня печеночных ферментов в 3–5 раз в первые сутки после операции. Дальнейшее мониторирование уровня ферментов показало восстановление нормальных показателей в группе животных, которым вводили ММСК, начиная со вторых сут. наблюдения. В контрольной группе уровни печеночных ферментов оставались повышенными в течение всего периода наблюдения. Необходимо отметить, что вес регенерируемой печени и ее линейные размеры у контрольной группы животных были незначительно ниже по сравнению с исследуемой группой.

Выводы: трансплантация ММСК сразу после выполнения ОРП восстанавливает нормальное функциональное состояние печени у модельных животных, что подтверждается данными биохимического анализа уровней печеночных ферментов.

Полученные данные могут служить составной частью основы для разработки протоколов клинических исследований по оценке эффективности и безопасности трансплантации ММСК после выполнения ОРП.

К.В. Котенко, П.С. Кызласов, И.И. Еремин,
М.Б. Мурзабеков, А.А. Пулин, И.И. Наделяева,
П.С. Еремин, Т.С. Слободина, Ю.А. Жгуттов,
Н.Л. Лазарева

**Инновационный малоинвазивный способ
лечения стриктур уретры с помощью
регенеративных клеток жировой ткани**

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
cd105@mail.ru

K.V. Kotenko, P.S. Kyzlasov, I.I. Eremin,
M.B. Murzabekov, A.A. Pulin, I.I. Nadelyaeva,
P.S. Eremin, T.S. Slobodina, Yu.A. Zhgutov,
N.L. Lazareva

**Innovative minimally invasive administration
of adipose derived regenerative cells
for the treatment of urethral strictures**

Стриктура уретры является одним из старейших и самых сложных урологических заболеваний. Актуальность лечения стриктур уретры не вызывает сомнения. Частота встречаемости в структуре заболеваний мочеполовой системы составляет около 6% и не имеет тенденции к снижению, из них 45% являются ятрогенными и возникают как следствие перенесенных трансуретральных вмешательств, простатэктомии, брахитерапии и т. д. Больные со стриктурами уретры нуждаются в длительном специализированном лечении. До недавнего времени основными методами лечения таких больных являлись сложные пластические операции, такие, как Хольцова – Мариона, Соловова, Русакова и др., большинство из которых не гарантирует полного выздоровления, а также характеризуются частыми рецидивами, в том числе в раннем послеоперационном периоде. Неудовлетворительные результаты лечения больных со стриктурами уретры наблюдаются часто и достигают 16–25%. Длительное пребывание в стационаре больных, оперированных по поводу посттравматических стриктур уретры, диктует необходимость поиска новых малоинвазивных методик, позволяющих достаточно быстро и эффективно восстановить адекватное самостоятельное мочеиспускание и сократить сроки как стационарного лечения, так и социальной и трудовой реабилитации больных. Основным кандидатом на роль патогенетического терапевтического и

профилактического средства может рассматриваться собственная жировая ткань пациента и регенеративные клетки (стромально-вазкулярная фракция), содержащиеся в ней.

Цель исследования: оценка эффективности и безопасности эндоскопического введения стромально-вазкулярной фракции под слизистую оболочку уретры с целью коррекции основного патологического состояния.

Дизайн исследования. На первом этапе был разработан протокол пилотного клинического исследования, получивший одобрение Ученого Совета и локального этического комитета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Критерии включения: мужчины в возрасте от 18 до 75 лет включительно; наличие верифицированной не ранее года до включения стриктуры уретры; умеренная или выраженная степень нарушения мочеиспускания (обструктивный тип); подписание бланка добровольного информированного согласия.

Критерии исключения: противопоказания для местной анестезии (например, повышенная чувствительность к местным анестетикам); рецидив злокачественной опухоли и (или) метастазов; уровень простат-специфического антигена более 0,008 нг/мл.

Эффективность исследуемого метода оценивалась в шести контрольных точках (на 1, 3, 7 сут. и 1, 3, 6 мес. после процедуры введения клеточного продукта) по следующим критериям: максимальная скорость мочеиспускания, мл/сек; объем остаточной мочи, мл; ретроградная уретроцистограмма; качество жизни (SF-36, русскоязычная версия); результаты в баллах по вопроснику для выявления нарушения мочеиспускания (International Prostatic Symptom Score, IPSS);

Получение жировой ткани проводили на передней брюшной стенке, под местным обезболиванием методом шприцевой липосакции. Выделение стромально-вазкулярной фракции (СВФ) из липоаспираатов осуществлялось путем ферментативной обработки в стерильных условиях по стандартной методике. СВФ, сразу после выделения, вводилась однократно эндоскопически под слизистую оболочку уретры в область стриктуры после механической дилатации (бужирования) под визуальным контролем.

Результаты. В исследуемую группу были включены 7 пациентов в возрасте от 24 до 74 лет, с верифицированным диагнозом стриктура уретры. Протяженность стриктур составляла от 3 до 5 см, скорость мочеиспускания до операции была от 2 до 4,5 мл в секунду. После подписания ИС всем пациентам была выполнена процедура бужирования и липосакции. Липоаспирааты были получены в объеме от 40 до 80 мл. Количество выделенных СВФ составляло 80–340 млн. Клетки СВФ были введены в подслизистый слой уретры в 5–8 точках, общий объем инъекции составил 5 мл. Осложнений, связанных с процедурой введения СВФ, отмечено не было.

Через месяц после выполнения процедуры скорость мочеиспускания составила 26–38 мл в с. Рентгенографически было выявлено восстановление проходимости уретры на всем протяжении. За период наблюдения (6 мес.) рецидивов заболевания, а также других серьезных нежелательных реакций и серьезных нежелательных явлений отмечено не было.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности и безопасности предложенно-

го метода. Они были положены в основу создания протокола инициативного открытого несравнительного когортного исследования с автоматизированной процедурой выделения СВФ на аппарате Celution (Cytos Therapeutics Inc., США; регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12193 от 24.05.2012). Протокол исследования получил одобрение Независимого междисциплинарного Комитета по этической экспертизе клинических исследований и был зарегистрирован в международной базе данных клинических исследований на сайте www.clinicaltrials.gov (NCT 01889888). В настоящее время осуществляет набор третьей когорты пациентов.

А.В. Куликов¹, И.Д. Кирпатовский², Д.А. Куликов^{1,3}, Л.В. Архипова¹, Г.Н. Смирнова¹, П.А. Куликова⁴

Пересадка алло- и ксеногенных эндокринных тканей в иммунопривилегированные области организма

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино

²Российский университет дружбы народов, Москва

³Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва

⁴Факультет фундаментальной медицины Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, Москва
kulikov@iteb.ru

A.V. Kulikov, I.D. Kirpatovsky, D.A. Kulikov,
L.V. Arkhipova, G.N. Smirnova, P.A. Kulikova

Transplantation of allo- and xenogeneic endocrine tissues into immune privileged areas of the body

Попытки восстановить утраченные либо поврежденные функции организма за счет пересадки тканей и органов от других особей имеют длительную историю. Несмотря на значительные успехи в этой области, ряд факторов ограничивает повсеместное распространение трансплантационных операций: техническая сложность хирургического вмешательства, несовместимость донора и реципиента, необходимость иммуносупрессивной терапии, нехватка донорского материала и др. Отказаться от подбора доноров, использования иммунодепрессантов (значительно снизить дозы) позволяет помещение трансплантата в зоны, которые в силу анатомических и физиологических особенностей изолированы от воздействия иммунной системы. Такие зоны называются относительно иммунопривилегированными, в первую очередь к ним относятся передняя камера глаза, некоторые отделы центральной нервной системы, тестикулы.

Целью настоящей работы явилась разработка способов пересадки тканей в иммунопривилегированные области организма для коррекции экспериментальных патологических состояний.

Объект исследования — крысы-самцы Вистар. В качестве доноров ксеногенного материала в ряде опытов использовали мышей SHK, кроликов Шиншилла, длиннохвостых якутских сусликов *Citellus Undulatus*.

Были разработаны методики пересадки тканей в иммунопривилегированную переднюю камеру глаза, под белочную оболочку семенника. Показано, что од-

нократная пересадка фетальной или эмбриональной инсулинпродуцирующей ткани согласно разработанной методикой ведет к:

- стойкой компенсации (субкомпенсации) аллоксанового сахарного диабета у экспериментальных животных (при аллогенной трансплантации — до 89% случаев, при ксеногенной — до 76% случаев);
- частичному восстановлению продукции инсулина поджелудочной железой реципиента;
- увеличению размеров островков Лангерганса реципиента в $2,4 \pm 0,5$ (через 3 нед. после пересадки аллогенной ткани эмбриональной поджелудочной железы, на этом сроке также наблюдается тенденция к увеличению количества островков на 17%).

Пересадка аллогенной ткани тимуса позволяет:

- значительно снизить темп необратимой возрастной инволюции тимуса реципиента в разных возрастных группах, другими словами, замедлить «скорость старения» Т-клеточного звена иммунной системы;
- добиться достоверного снижения смертности после облучения в летальной дозе (8 Гр) и ускоренного восстановления иммунного статуса организма после облучения в сублетальной дозе (4 Гр).

- увеличить среднюю (на $19 \pm 5\%$) и максимальную (до 21%) продолжительность жизни животных.

Показано функционирование трансплантатов на всех сроках проведения экспериментов — до 20 месяцев после операции. В результате тестов установлено, что помещение инсулинпродуцирующих тканей под белочную оболочку семенника не оказывает значимого влияния на сперматогенез и фертильность реципиента.

Пересадка тканей в иммунопривилегированные области организма позволяет обеспечить длительное функционирование трансплантата и компенсировать различные экспериментальные патологические состояния. Данный подход отличается технической и технологической доступностью, его реализация не требует подбора доноров и назначения иммунодепрессантов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ Президиума РАН «Поддержка инноваций и разработок», 2007, 2009, 2011 г., «Фундаментальные науки — медицине» 2012, 2013 гг.

Н.И. Лисяный

Различная функциональная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их предшественников

ГУ «Институт нейрохирургии им. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев, Украина

N.I. Lisyanyi

Different functional activity of multipotential mesenchymal stromal cells and their precursors

Общеизвестно, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки взрослых особей (ММСКв) обладают не только способностью к спонтанной и индуцированной дифференцировке в различные типы клеток, но и регулируют пролиферативные и иммунные процессы активностью. Источником ММСКв являются различные ткани взрослого организма, в основном, это костный мозг и жировая ткань, содержащие большое количество адгезивных к пла-

стику фибробластоподобных клеток, при длительном культивировании которых образуются ММСКв. Пока что нет единого стандартного протокола получения из адгезивных клеток костного мозга или жировой ткани МСКв. Длительность культивирования, количество пассажей адгезивных размножающихся клеток не одинаково в работах разных авторов и исчисляется десятками дней, что предполагает прохождение нескольких стадий перехода адгезивных фибробластных или других клеток в ММСКв в процессе культивирования. Можно предположить и выделить как минимум 4 таких стадии трансформации адгезивных клеток в ММСКв и 4 типа клеток: первичные, адгезивные фибробластные клетки («спящие» ММСКв), активированные пролиферирующие фибробласты, предшественники ММСКв (проММСКв), активированные ММСКв (зрелые ММСКв), которые способны к дифференцировке в другие типы клеток.

Пока что каждая из этих стадий развития ММСКв из адгезивных клеток четко не охарактеризована и для каждого типа клеток, участвующих в генерации ММСКв, вероятно, имеются свои фенотипические характеристики и различная функциональная активность, которая может реализоваться как путем контактного взаимодействия, так и синтеза активных молекул (цитокинов, NO и ИДО).

Имеются многочисленные данные о различных, иногда противоположных, свойствах ММСКв и их предшественников, в частности, о влиянии на иммунные, регенеративные процессы в организме. Так в проведенных нами исследованиях (Лисяный Н.И. и др., 2013) показано, что супернатанты 24–48-часовой культуры первого пассажа адгезивных клеток жировой ткани подавляют пролиферацию лимфоцитов при действии ФГА, а супернатанты 3–4 суточной культуры или второго пассажа клеток, наоборот, стимулируют как спонтанную, так и индуцированную ФГА пролиферацию лимфоцитов.

Функциональные отличия между различными типами предшественников ММСКв показано и на модели заживления кожных ран в эксперименте на мышах и крысах. Так, 2-кратное введение в область кожной раны на спине мышей или крыс адгезивных клеток 24 или 48 ч инкубации первичного пассажа («спящие» ММСКв) приводило к достоверному торможению заживления кожной раны. Тогда как введение длительно культивируемых клеток (15–25 сут. культивирования) или клеток 3–4 пассажа приводило к стимуляции регенерации кожи и более быстрому заживлению раневого кожного дефекта. Следовательно, как клетки, так и супернатанты крат-ковременных (24–48) культур первичных пассажей тормозят пролиферацию лимфоцитов и регенерацию клеток кожи, задерживают заживление ран. Клетки и супернатанты после длительного культивирования адгезивных клеток, стимулируют эти процессы, что совпадает с известными данными о способности ММСКв тормозить или стимулировать иммунные и пролиферативные процессы.

Полученные нами экспериментальные данные и многочисленные литературные данные указывают на различия в функциональной активности адгезивных клеток жировой ткани и костного мозга в зависимости от условий выделения, длительности культивирования и количества пассажей, что свидетельствует об этапности генерации ММСКв, а также о наличии нескольких переходящих друг в друга предшественников ММСКв.

Особенностью представленных результатов является то, что влияние на регенеративные процессы в коже и функцию клеток иммунной системы может осуществляться как непосредственно клетками, так и продуцируемыми ими гуморальными факторами, что согласуется с известными данными о широком спектре цитокинов, продуцируемых ММСКв.

По-видимому, дальнейшие исследования в этом направлении позволят детализировать стадии генерации ММСКв и уточнить отдельные типы предшественников ММСКв и их биологическую активность, что будет иметь как теоретическое, так и практическое значение и расширит область применения ММСКв не только как потенциальных источников для получения в процессе дифференцировки других типов клеток (миоцитов, гепатоцитов, нейроцитов и т.д.), но и для более широкого использования предшественников ММСКв, например, для индукции и регуляции регенеративных и иммунных процессов в организме, для изучения природы регуляторных гуморальных факторов, продуцируемых ММСКв и для получения рекомбинантных их аналогов, пригодных для клинического применения.

Н.И. Лисяный, И.А. Гнедкова, Л.Н. Бельская,
А.И. Ключникова, Д.Н. Станецкая, Е.В. Задорожная,
В.М. Семенова, Л.И. Стайно, Д.М. Егорова,
В.В. Васлович, М.А. Гнедкова,
А.А. Шмелёва

Изучение биологических свойств клеток стромально-васкулярной фракции, выделенной из жировой ткани

ГУ «Институт нейрохирургии
им. А.П. Ромоданова»,
Киев, Украина
irinagned@mail.ru

N.I. Lisyany, I.A. Gnedkova, L.N. Belskay,
A.I. Kluchnikova, D.N. Stanetskay, E.V. Zadorozhnyay,
V.M. Semenova, L.I. Stayino, D.M. Egorova,
V.V. Vaslovich, M.A. Gnedkova,
A.A. Shmeleva

Study of biological properties of stromal vascular fraction cells isolated from adipose tissue

Клеточная терапия является перспективным методом лечения многих дегенеративных, травматических и воспалительных заболеваний ЦНС. В настоящее время хорошо изучены мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), которые широко исследуются для решения различных клинических задач, в частности, в лечении дегенеративных заболеваний ЦНС. Известно, что клетки стромально-васкулярной фракции (СВФ), полученные из жировой ткани, содержат ММСК, обладают целым рядом недостаточно изученных биологических свойств. Поэтому целью исследования являлась оценка влияния клеток СВФ жировой ткани взрослых мышей и крыс на иммунные реакции, регенеративные процессы в коже и опухолегенез в головном мозге.

Из жировой ткани мышей и крыс была получена СВФ клеток, согласно общепринятому протоколу. Изучена динамика адгезии к пластику выделенных клеток и сопоставлена их адгезивная и фагоци-

тарная активность. После культивирования клеток СВФ, выделенных из жировой ткани, на 8–10 сут. был получен монослой фибробластов и фибробластоподобных клеток, которые при добавлении ретиноевой кислоты дифференцировались в нервные клетки. Клетки СВФ были изучены в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ), реакции хозяин против трансплантата (РХПТ), а также оценено их влияние на рост внутримозговой глиомы крыс (штамм 101.8) и регенерацию экспериментальной раны у крыс.

Было установлено, что клетки, адгезированные к пластику, достоверно угнетали клеточный иммунный ответ в РХПТ и пролиферативный ответ периферических лимфоцитов в аутологичной, сингенной, аллогенной и ксеногенной системах. Супернатанты адгезированной фракции различных сроков культивирования обладали различными иммунологическими свойствами: 24-часовые супернатанты подавляли пролиферативный ответ лимфоцитов в СКЛ и индуцированный митогеном пролиферативный ответ лимфоцитов, тогда, как супернатанты после 7-дневного культивирования стимулировали пролиферативный ответ в СКЛ. Супернатант клеток 72 ч. культивирования подавлял пролиферативный ответ аутогенных лимфоцитов, но усиливал индуцированный митогеном пролиферативный ответ аллогенных лимфоцитов мышей. Супернатант СВФ достоверно увеличивал показатели стимулируемого фагоцитоза. Экспериментами по моделированию раневого процесса было показано, что клетки и супернатант СВФ ранних пассажей усиливали воспаление, а поздних (7–14-суточные) стимулировали более быстрое заживление ран.

Совместное введение клеток СВФ с опухолевыми клетками достоверно тормозило рост экспериментальной внутримозговой глиомы крыс штамм 101.8. Морфологическими и ультрамикроскопическими методами были выявлены очаги некроза и морфологические признаки апоптоза части опухолевых клеток в этих опухолях.

Таким образом, клетки СВФ, содержащие ММСК, обладают широким спектром биологического действия, в том числе иммуномодулирующими свойствами. Это может быть связано с тем, что ММСК, находящиеся в составе СВФ, полученной из ЖТ, продуцируют обширный спектр как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов и супрессорных факторов. В зависимости от исходного состояния мишеней и окружающих тканей, их антигенных и трансформирующих свойств, ММСК могут оказывать действие различной направленности. Известно также, что ММСК используют различные механизмы супрессии и активации. Так, в частности, многообразны механизмы иммуносупрессии — через индукцию Т-регуляторных клеток, продукцию ММСК TGF β , PgE2, ИДО и NO. Другой фактор, определяющий иммунорегуляторный эффект ММСК — растворимая форма HLAG5. Нейтрализация антителами HLAG5 подавляет генерацию CD4CD25FoxP3⁺-Т-клеток. Стимуляция регенеративных процессов ММСК и их предшественниками связывается также с синтезируемыми ими цитокинами, в том числе с гепатопротекторным фактором.

Таким образом, комплексными иммунологическими, морфологическими и ультрамикроскопическими методами удалось выделить и изучить некоторые

свойства клеток СВФ жировой ткани, а также отметить перспективность их изучения для решения задач регенераторной медицины.

Л.С. Литвинова¹, В.В. Шуплецов¹,
Н.Н. Шушарина¹, В.Н. Лейцин¹, Р.Г. Васильев^{2,3},
А.Е. Родниченко^{2,3}, И.Ф. Лабунец^{2,3},
С.Н. Кульков⁴

**Пористая керамика на основе ZrO₂ или Al₂O₃:
физические свойства и предварительная
оценка биосовместимости**

¹ ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный
университет им. И. Канта»,
Калининград, Россия

² ГУ «Институт генетической и регенеративной
медицины НАМН Украины»,
Киев, Украина

³ ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева
НАМН Украины»,
Киев, Украина

⁴ Томский государственный университет,
Томск, Россия
rvasiliev@ukr.net

L.S. Litvinova, V.V. Shupletsova, N.N. Shusharina,
V.N. Leitsin, R.G. Vasyliov, A.E. Rodnichenko,
I.F. Labunets, S.N. Kulikov

**Porous ceramics based on ZrO₂ or Al₂O₃:
physical properties and preliminary evaluation
of biocompatibility**

Пористая керамика является перспективным материалом для медицинского применения в области травматологии и ортопедии при восполнении дефектов кости критического размера. При этом пористая керамика может выступать как в качестве непосредственно остеопластического материала, так и как 3D скаффолд при создании тканеинженерного эквивалента кости.

Цель исследования: определить физические свойства и получить предварительные результаты по оценке биосовместимости (отсутствие или наличие цитотоксичности; способность поддерживать пролиферацию и направленную остеогенную дифференциацию ММСК из жировой ткани) керамических имплантатов (на основе ZrO₂ или Al₂O₃), изготовленных методом шликерного литья и прессования, с последующим отжигом и спеканием.

Материал и методы. В экспериментах были использованы образцы из высокопористой оксидной керамики (на основе ZrO₂ или Al₂O₃), изготовленные методом шликерного литья и прессования, с последующим отжигом и спеканием. Для исследования физических свойств керамических имплантатов были использованы следующие методы:

1) электронная Оже-спектроскопия (ЭОС) — для определения качественных данных об элементах, присутствующих в имплантатах;

2) энергодисперсионный анализ (ЭДС) — для определения элементного состава имплантатов;

3) спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) — для определения фазового состава имплантатов.

Предварительная оценка биосовместимости имплантатов из высокопористой керамики была выполнена в экспериментах *in vitro* с использова-

нием ММСК из жировой ткани мышей линии FVB (самцы 4–6 месячного возраста). ММСК из жировой ткани выделяли ферментативным методом и культивировали в среде DMEM: F12 с 2 мМ глутамина и 10% фетальной сыворотки коров. Для экспериментов использовали культуру ММСК 4-го пассажа. Для оценки цитотоксичности имплантатов и определения жизнеспособности культивируемых на их поверхности или в их составе ММСК использовали двойное окрашивание клеток флюоресцеин диацетатом (FDA) и пропидиум йодидом (PI) через 24 ч, 48 ч и 14 дней после засева. Для этого 10^4 ММСК засевали на пластик в лунки 24-луночной планшеты (контроль), на поверхность или внутрь имплантатов и инкубировали в указанные временные точки после засева в течение 10 мин в растворе Хэнкса, содержащем FDA (2 мкг/мл) и PI (1 мкг/мл), после чего клетки отмывали и исследовали при помощи инвертированного флюоресцентного микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss). Также проводили направленную остеогенную дифференциацию (по общепринятому протоколу D. Prockop, 2004) ММСК, культивируемых на поверхности или в составе имплантатов в течение 14 дней с последующей оценкой по активности щелочной фосфатазы с использованием субстрата BCIP/NBT (Sigma). Для подтверждения соответствия использованных в эксперименте клеток предъявляемым к ММСК критериям параллельные культуры были исследованы для определения фенотипа клеток и их способности к направленной дифференциации в адипогенном и остеогенном направлении при монослойном культивировании (по стандартным методикам с оценкой дифференциации цитохимическим окрашиванием Oil Red O Alizarin Red S соответственно; D. Prockop, 2004). Фенотип определяли на проточном цитофлуориметре-сортере «BD FACSAria» с ПО FACSDiva 6.1.1 с использованием анти-мышинных моноклональных антител к CD44, CD45, CD73, CD90 и Sca-1 (все — Becton Dickinson, США).

Результаты. Одним из важных аспектов использования пористой керамики в качестве материала для костных имплантатов, является фактор образования прочного соединения с костной тканью. Клетки из жировой ткани, использованные для предварительной оценки биосовместимости пористых керамических имплантатов, обладали способностью к направленной дифференциации в адипо- и остеогенном направлении и имели следующий фенотип: CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, Sca-1⁺ и CD45⁻. Комбинированное окрашивание FDA/PI ММСК из жировой ткани, культивируемых на поверхности или в составе имплантатов показало отсутствие цитотоксичности у всех исследованных образцов керамики. Микроскопическое наблюдение показало, что ММСК способны пролиферировать при культивировании в составе исследуемых керамических имплантатов с формированием монослоя на поверхности имплантата или кластеров клеток в порах имплантата. Также культивируемые на поверхности и (или) в составе имплантатов ММСК были способны к направленной дифференцировке в остеогенном направлении, что подтверждено окрашиванием на щелочную фосфатазу — ранний и ключевой маркер остеогенной дифференциации ММСК.

Выводы

1. Экспериментально подтвержден заявленный элементный состав образцов.
2. Продемонстрирована высокая степень клеточной адгезии на поверхности имплантатов.
3. Имплантаты не проявляют цитотоксических свойств.
4. Имплантаты поддерживают пролиферацию и направленную остеогенную дифференциацию ММСК.

М.М. Литвинова^{1,2}, Е.Л. Дадали³, К.Г. Шевченко²,
А.В. Поляков³, А.А. Исаев²

Результаты генетического скрининга новорождённых на наличие наиболее частых наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования

¹ ГБОУ ВПО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

² Институт стволовых клеток человека, Москва

³ ФГБУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва
LitvinovaMM@hsci.ru

M.M. Litvinova, E.L. Dadali, K.G. Shevchenko,
A.V. Polyakov, A.A. Isaev

Newborns genetic screening results for the most frequent autosomal recessive hereditary disorders

В настоящее время профилактическое генетическое тестирование приобретает все большую популярность. Однако основное внимание превентивного подхода обычно сконцентрировано на определении генетической предрасположенности к широко распространенным заболеваниям. При этом неоправданно малое внимание уделяется профилактическому генетическому тестированию моногенных заболеваний.

Между тем, известно, что около 5% детей рождается с тем или иным врожденным пороком или страдает наследственным заболеванием. Такая неутешительная статистика связана со многими факторами, одним из которых является передача родителями мутаций ДНК своим будущим детям. Согласно современным представлениям, каждый человек несёт в своём генетическом аппарате от 7 до 10 мутаций в генах, определяющих развитие наследственных заболеваний. В таких случаях принято говорить о скрытом гетерозиготном носительстве мутаций, чаще всего не приводящем к развитию какой-либо клинической симптоматики у самого носителя. Однако при его вступлении в брак с обладателем мутаций в тех же генах в семье возникает высокий генетический риск рождения больного ребёнка. На сегодняшний день единственный способ предупреждения подобных ситуаций — это проведение превентивного (скринингового) генетического тестирования, направленного на своевременное выявление скрытого носительства мутаций в генах наиболее частых моногенных заболеваний. И чем раньше подобная диагностика будет осуществлена, тем более эффективной она может оказаться.

Цель исследования. Оценить частоту гетерозиготного носительства мутаций в генах наиболее

частых моногенных заболеваний и состояний среди жителей России.

Материал и методы. Для решения обозначенной выше проблемы Институтом Стволовых Клеток Человека в содружестве с Медико-Генетическим Научным Центром РАМН была разработана программа профилактического генетического обследования «Гемаскрин», включающая в себя поиск наиболее частых мутаций в генах четырёх моногенных заболеваний (муковисцидоз, фенилкетонурия, проксимальная спинальная мышечная атрофия, нейросенсорная несиндромальная тугоухость) и двух состояний (синдром Жильбера и лактазная недостаточность), представляющих собой наиболее распространённые на территории России болезни с аутосомно-рецессивным типом наследования (табл. 1).

Материалом для исследования послужила пуповинная кровь 319 новорожденных детей.

Результаты. По итогам обследования группы новорожденных носительство мутаций в генах четырёх тестируемых моногенных заболеваний (CFTR, PAH, SMNt, GJB2) составило 9,4%, т.е. каждый 11-й житель России согласно результатам анализа представленной выборки является гетерозиготным носителем мутации хотя бы в одном из тестируемых генов (1/11). Частота носительства отдельно по заболеваниям представлена в табли-

це 2 и в целом совпадает с данными, полученными другими авторами. По результатам скрининга у двух из 319 новорожденных была выявлена мутация c.35delG гена *GJB2* в гомозиготной форме, что свидетельствовало о наличии у тестируемых несиндромальной нейросенсорной тугоухости. При последующем обследовании детей диагноз был подтверждён клинически. Таким образом, частота выявления моногенных заболеваний из группы тестируемых составила 0,63% (1/159). У каждого из девяти обследованных детей был подтвержден диагноз синдром Жильбера, каждый второй оказался гомозиготным по полиморфизму гена *LCT*, а значит, был предрасположен к появлению признаков лактазной недостаточности (табл. 2).

Выводы. По итогам проведения скрининга для 174 из 319 новорождённых детей результаты генотипирования оказались полезными для поддержания их здоровья. В 32 случаях результаты ДНК-диагностики были важны для планирования деторождения в их будущих семьях. Таким образом, проведение генетического скрининга новорожденных представляет собой эффективный инструмент для профилактики наследственных заболеваний в семьях бессимптомных носителей и может способствовать улучшению качества и продолжительности жизни в популяции в целом.

Таблица 1. Состав программы профилактического обследования «Гемаскрин»

Заболевание/состояние	Ген	Мутации/полиморфизмы
Муковисцидоз	CFTR	del21kb, delF508, delI507, 1677delTA, 2143delIT, 2184insA, 394delIT, 3821delT, L138ins, G542X, W1282X, N1303K, R334W, 3849+10kbC>T, 604insA, 3944delTG, S1196X, 621+1G>T, E92K
Фенилкетонурия	PAH	R408W, IVS12+1G>A, IVS10-11G>A, P281L, R261Q, R252W, IVS4+5G>T, R158Q
Проксимальная спинальная мышечная атрофия	SMNt	del ex.7-8
Нейросенсорная несиндромальная тугоухость	GJB2	c.35delG, c.-23+1G>A (IVS1+1G>A), c.313_326del14, c.235delC, c.358-360delGAG (Glu120del)
Синдром Жильбера	UGT1A1	c.862-6799_862-6786(TA)5/6/7/8
Лактазная недостаточность	LCT	c.-13910T>C

Таблица 2. Результаты генотипирования 319 новорожденных на наиболее частые моногенные заболевания и состояния России по программе «Гемаскрин»

Общее количество анализов: 319	Случаи выявления						
	Гетерозиготы		Гомозиготы			Гомозиготы	
Заболевания					Состояния		
	чел.	частота	чел.	частота		чел.	частота
Муковисцидоз (CFTR)	6	1,9% (1/53)			Синдром Жильбера (UGT1A1)	37	11,6% (1/9)
Фенилкетонурия (PAH)	6	1,9% (1/53)			Лактазная недостаточность (LCT)	135	42,3% (1/2)
Проксимальная спинальная мышечная атрофия (SMN)	7	2,2% (1/46)					
Аутосомно-рецессивная нейросенсорная тугоухость (GJB2)	11	3,5% (1/29)	2	0,6% (1/159)			
Итого	30	9,4% (1/11)	2	0,6% (1/159)		172	53,9% (1/2)

Л.Д. Любич

Иммуногенные свойства фетальных нейроклеток у мышей

ГУ «Институт нейрохирургии им. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев
Liubichld@mail.ru

L.D. Liubich

Immunogenic properties of mice foetal neurocells

Использование клеточных технологий для лечения заболеваний ЦНС, в частности, трансплантация нейральных стволовых клеток (НСК) и нейральных клеток-прекурсоров (НКП), предполагает отсутствие иммунообусловленных осложнений, которые могут развиваться в ответ на пересаживаемые клетки. Вопрос о возможной способности аллогенных НСК и НКП вызывать иммунную активацию в отдаленном периоде после трансплантации остается до конца не решенным. Данные относительно иммуногенных свойств НСК *in vivo* неоднозначны, дискуссионным остается вопрос об экспрессии антигенов гистосовместимости НСК и НКП. Существуют свидетельства того, что НСК человека распознаются и вызывают иммунный ответ в алло- и ксеногенных системах *ex vivo*, то есть уровень их иммунологического потенциала является достаточным для активации периферических лимфоцитов реципиента. Для угнетения иммунных реакций при трансплантации применяют различные подходы: назначение иммуносупрессивных препаратов, моделирование иммунологической толерантности у реципиента, применение для трансплантации генетически модифицированных НСК.

Целью данной работы была оценка иммуногенных свойств фетальных НКП. Для этого решали следующие задачи: 1) сравнение способности фетальных НКП генерировать иммунный ответ при аллогенном внутрибрюшинном и внутримозговом введении; 2) оценка их способности вызывать нейроспецифические иммунные реакции к маркерным антигенам нервной системы (общий белок миелина (ОБМ), S-100, нейрон специфичная енолаза (NSE) при сингенной и аллогенной внутримозговой трансплантации; 3) оценка возможности угнетения иммунных реакций при внутримозговом введении фетальных нейроклеток с помощью циклоспорина — циклического полипептида с выраженным иммуносупрессивным действием, ингибирующим развитие реакций клеточного типа и Т-зависимое образование антител.

Материал и методы. НКП получали из мозга мышей 13–15 сут эмбрионального развития (E13–15). Клеточные суспензии НКП мышей-доноров вводили внутрибрюшинно или внутримозгово мышам-реципиентам C57BL/6 в количестве 1×10^6 клеток на животное. Экспериментальных животных разделили на группы: 1) внутрибрюшинное введение аллогенных НКП доноров СВА; 2) внутримозговое введение аллогенных НКП доноров СВА; 3) внутримозговое введение сингенных НКП доноров C57BL/6; 4) интактные (контрольные) животные C57BL/6. Части животных проводили иммуносупрессию сандиммуном (циклоспорин А для парентерального введения, «Novartis Pharma AG», Швейцария) в количестве 100 мкг на животное на 0-е, 3-е, 6-е сут. Через 6, 12, 18 и 37 сут после введения клеток исследовали аллоиммунные и антигенспецифические реакции.

Результаты и обсуждение. Как внутрибрюшинное, так и внутримозговое введение аллогенных НКП генерировало аллоцитотоксические иммунные реакции, однако внутрибрюшинное введение НКП вызвало более выраженный клеточный и гуморальный аллоиммунный ответ, по сравнению с внутримозговым.

Клеточные аллоцитотоксические иммунные реакции генерировались в ответ на внутримозговое введение фетальных НКП с максимальным проявлением на 6–12 сут. после иммунизации и дальнейшим постепенным снижением к 37 сут. Поскольку уровень гуморальных аллоцитотоксических иммунных реакций уменьшался практически до нормального, начиная с 18 сут., назначение сандиммуна существенно не влияло на данные показатели у животных.

В ответ на внутрибрюшинное введение фетальных НКП клеточные аллоцитотоксические иммунные реакции достигали максимума на 6–12 сут. после иммунизации и постепенно снижались к 37 сут. Назначение сандиммуна уменьшало эти проявления, начиная с 12 сут. Гуморальные аллоцитотоксические иммунные реакции достигали максимума на 12–18 сут. и уменьшались с 18 по 37 сут. исследования. Под влиянием сандиммуна уровень аллоцитотоксических антител к 37 сут снижался к норме.

У животных с внутримозговым введением фетальных НКП развивался специфический иммунный ответ на маркерные антигены клеток нервной системы (ОБМ и NSE), нарастающий к 37 сут. При влиянии сандиммуна уровень нейроаутоантител постепенно снижался к норме с 18 сут. по 37 сут.

После системного (внутрибрюшинного) введения фетальных НКП зафиксирован повышенный уровень антител к ОБМ (18 сут.) и S-100 (37 сут.). Коррекция сандиммуном уменьшала уровень нейроаутоантител к 37 сут. к норме.

Таким образом, внутримозговое введение аллогенных НКП, по сравнению с системным, вызывало более выраженный иммунный ответ на маркерные антигены клеток нервной системы, нарастающий к 37 сут. Напротив, в группе животных с внутримозговым введением сингенных НКП уровень аутоантител ко всем тестируемым НСБ не отличался от нормального на протяжении всего срока исследования.

Выводы. Системное (внутрибрюшинное) введение аллогенных фетальных НКП (E13–15) вызывало развитие более выраженного клеточного и гуморального аллоиммунного ответа, чем локальное (внутримозговое) их введение. Аллогенная трансплантация фетальных НКП, в отличие от сингенной, генерировала специфический иммунный ответ на маркерные антигены клеток нервной системы. Вероятно, наряду с антителами к аллоантигенам в реакциях иммунного отторжения могут принимать участие также аутоантитела к нейроантигенам, что указывает на необходимость учитывания рисков иммунообусловленных осложнений после нейротрансплантации НКП при заболеваниях ЦНС.

Использование иммуносупрессорного препарата «Сандиммун» позволяет значительно снизить проявления аллоцитотоксических реакций и гуморальной нейросенсибилизации при введении нейроклеток, что обосновывает показания к обязательному применению иммуносупрессии при клинической нейротрансплантации клеток фетального мозга.

Л.Д. Любич, В.М. Семенова, Н.И. Лисяный

Изучение нейрогенной дифференцировки клеток фетального головного мозга in vitro

ГУ «Институт нейрохирургии им.

акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины», Киев, Украина

Liubichld@mail.ru

L.D. Liubich, V.M. Semenova, N.I. Lisyany

Study of the neurogenetic differentiation of foetal brain cells in vitro

Актуальным направлением лечения дегенеративных заболеваний ЦНС является разработка и создание клеточных технологий с использованием нейральных стволовых клеток (НСК) и нейроцитов-прекурсоров (НКП) для восстановления нормальной микроархитектуры нервной ткани. Условием эффективности клеточной терапии является достаточный объем и адекватный клеточный состав трансплантируемого материала, поэтому особое значение приобретает разработка методов получения в условиях культивирования клеточных популяций с оптимальными характеристиками.

Цель исследования: изучение дифференцировочного потенциала нейроцитов фетального головного мозга при культивировании в различных условиях.

Материал и методы. Материалом для исследования служили НКП фетального головного мозга крысы 12–16 сут. гестации (E12–16). Все манипуляции с экспериментальными животными проводили, придерживаясь Закона Украины «О защите животных от жестокого поведения», «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и другой научной целью», с учетом принципов биоэтики и норм биологической безопасности.

Нейроциты культивировали в бессывороточной среде DMEM/F12 (Sigma, Германия). Для индукции дифференцировки в культуры добавляли: препарат инсулин-трансферрин-селенит (ИТС) (PanEco Ltd, Россия), содержащий 0,05 мг/мл инсулина, 0,0275 мг/мл трансферрина, 0,0335 мг/мл селенита; ретинола ацетат (0,2 мг/мл, завод витаминных препаратов, Киев); фетальную сыворотку коров (ФСК) (1% раствор, Украина); ретиноевую кислоту (2×10^{-6} моль/л, Sigma, Германия). В контрольные культуры факторы дифференцировки не добавляли. Культуры содержали в CO₂-инкубаторе при 37°C, наблюдали в инвертированном микроскопе (БИОЛАМ П-3, Россия).

Для цитологического исследования на 7, 14, 30 сут. кластеры нейроцитов переносили в пробирки, центрифугировали (3 мин 1000 об./мин), осадок ресуспендировали в среде DMEM/F12 и наносили на адгезивные стекла. По окончании опытов культуры фиксировали в 10% растворе формалина и окрашивали тионином по Нисслю. Иммуногистохимически в нейроцитах выявляли виментин (маркер прогениторных нейроцитов) и глиальный кислый фибриллярный белок (GFAP, маркер глиобластов и астроцитов) с помощью наборов «Sigma Immunochemicals VIMENTIN» и «Sigma Immunochemicals GFAP» (Германия). Цитологические препараты изучали на цитонализаторе изображения «IBAS-2000» (Германия).

Результаты и обсуждение. В контрольных культурах в течение всего периода наблюдения

нейроциты сохраняли шаровидную форму без признаков дифференцировки. В бессывороточной среде DMEM/F12 на 7–9 сут. определялось снижение, а на 10–12-е сут. — нарастание и стабилизация содержания нейроцитов, что отражает наличие среди них долгоживущих НСК. При этом наблюдалось массовое прикрепление к субстрату округленных нейроцитов с минимальным фенотипом, расположенных изолированно или в виде микроагрегатов. НКП длительно сохраняли округлую форму без признаков цитодифференцировки и выявляли экспрессию виментина, подтверждающего их принадлежность к пулу прогениторных нейроцитов. В ходе культивирования доля виментин-положительных клеток увеличилась с $28,6 \pm 3,6\%$ на 2 сут. до $77,0 \pm 13,9\%$ на 16 сут.

В культурах нейроцитов в присутствии индукторов дифференцировки установлено, что наличие в питательной среде ретинола ацетата индуцировало формирование нейросфер; клетки характеризовались морфологической и иммунофенотипической гетерогенностью. При сочетанном последовательном добавлении ИТС и ретинола ацетата в этот срок в культурах появлялись униполярные клетки грушевидной формы с короткими конусовидными отростками (доля таких клеток составляла 8,5%).

При добавлении в культуральную среду ретиноевой кислоты среди округленных недифференцированных клеток появлялись отростчатые клетки с обильной цитоплазмой и наличием отростков — коротких конусовидных, а также длинных хорошо выраженных, с признаками ветвления. В ядрах 20–30% нейроцитов треугольной формы выявлялись четко выраженные крупные ядрышки, характерные для нейробластных форм. С увеличением срока культивирования возрастала доля НКП, экспрессирующих виментин — маркер прогениторных клеток с 25% до 80–85%. Количество клеток, экспрессирующих GFAP — маркер глиобластов и астроцитов увеличивалось с 60% до 80%.

Таким образом, в культурах НКП фетального мозга крысы в процессе культивирования наблюдалось увеличение пула прогениторных виментин-положительных нейроцитов, а в присутствии ретиноевой кислоты установлена индукция их дифференцировки по нейрональному и глиальному типу.

Выводы. Подбор условий культивирования позволяет получить культуры нейроцитов с заданными свойствами: обогащенные виментин⁺ нейрогенными предшественниками, сохраняющими свою полипотентность и способность к дифференцировке в нейрональном и глиальном направлениях.

Ю.А. Медведев, А.В. Люндуп, К.В. Баласанова,
Н.М. Золотопуп, П.А. Елистратов, М.М. Удалова

Создание тканеинженерной конструкции на основе никелида титана и ММСК десны для пластики костных дефектов в челюстно-лицевой области

ГБОУ ВПО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

U.A. Medvedev, A.V. Lundup, K.V. Balasanova,
N.M. Zolotopup, P.A. Elistratov, M.M. Udalova

Development of tissue engineering construct based on nikelid titanium and mesenchymal stromal cells of gingival for correction of bone defects in maxillofacial region

Актуальность. По данным клиники ЧЛХ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, существует большое количество пациентов с костными дефектами нижней стенки глазницы и передней стенки гайморовой пазухи. Такие дефекты могут быть следствием травм, резекций челюстных костей по поводу онкологических заболеваний, а также по поводу токсических фосфорных остеонекрозов. В челюстно-лицевой хирургии имеется серьезная проблема устранения подобных дефектов. Преимущества аутогенной трансплантации кости известны. Однако, неизбежность нанесения дополнительной травмы и костного дефекта в месте забора материала, увеличение времени оперативного вмешательства ограничивают дальнейшее ее применение. Альтернативой могут служить имплантаты из резорбируемых и нерезорбируемых, биологических и синтетических материалов, однако, поиски оптимального матрикса продолжаются. Эндопротезы из никелида титана хорошо зарекомендовали себя в клинике в течение последних двух десятилетий. В нашей клинике для устранения обширных костных дефектов передней стенки верхнечелюстного синуса и нижней стенки глазницы успешно применяются имплантаты из сетчатого и пористого никелида титана. Однако, остается нерешенной проблема прямого контакта искусственного материала с полостью гайморовой пазухи, так как требуется время для «обрастания» эндопротеза слизистой оболочкой, выстилающей остальные стенки синуса изнутри. С другой стороны, уже разработана новая клиническая платформа регенеративной медицины, позволяющая лечить целый спектр трудноизлечимых заболеваний, используя методы клеточной терапии и тканевой инженерии.

Основной задачей в области костной трансплантации является не только устранение дефектов костной ткани, но и профилактика воспалительных процессов вокруг имплантата, предотвращение образования вторичных костных дефектов.

Цель: изучить возможность использования эндопротезов из никелида титана в качестве каркасов для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), полученных из десны.

Материал и методы. В качестве источника ММСК использовали ткани десны (подслизистый слой). Каркасами послужили пластины из сетчатого и пористого никелида титана, размером 15×15×2 мм.

Образцы десневого материала размерами 3×3×1 мм получали из клинически здоровой десны, помещали в транспортную среду (DMEM с анти-

биотиком). В стерильных условиях предварительно измельченный десневой материал инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы II типа при 37°C 16 ч, с последующим удалением эпителия. Суспензия клеток фильтровалась через стандартный клеточный фильтр, отмывались и культивировались при 5% CO₂ и 37°C в DMEM + 10% FBS (DMEM; Gibco-BRL, Grandisland, США) с добавлением 0,292 мг/мл глутамина (Invitrogen, Carlsbad, США), 100 U/ml пенициллин G, 100 мкг/мл стрептомицина и высевались в 25 см² флаконы (Costar, Cambridge, США). Эпителиальные клетки не обнаруживались ни в первичной, ни в пассированных культурах. Были взяты 2 6-луночные плашки, в которые поместили по 2 сетчатых и по 2 пористых эндопротеза, на каждый из которых были посеяны клетки. Смена культуральной среды и микроскопический контроль осуществлялся каждые 72–96 ч.

Результаты. На пористом эндопротезе из никелида титана отмечается полное заполнение микропространств клетками. На сетчатом эндопротезе отмечается заполнение промежутков между нитями слоем ММСК десны.

Выводы. Подобраны образцы сетчатого и пористого эндопротезов из никелида титана, которые пригодны для культивирования на них ММСК, выделенных из десны. Это позволяет создать тканеинженерную конструкцию для проведения экспериментальных операций на моделях повреждения костной ткани в челюстно-лицевой области.

В.Н. Мещанинов, И.В. Гаврилов, Т.Ю. Вержбицкая,
А.М. Попов

Использование индукции гемопоэтических стволовых клеток для коррекции биовозраста

ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия», Минздрава России, Екатеринбург

V.N. Meshchaninov, I.V. Gavrilov, T.U. Verzhbickaya,
A.M. Popov

Using the induction of hematopoietic stem cells for correction the bioage

Поиски геропротекторов идут в разнообразных направлениях (Анисимов В.Н. и др., 2006; Скулачев В.П., 2009; Москалёв А.А., 2010; Коркушко О.В. и др., 2011; Исаев Н.К. и др., 2013). Перспективным направлением в геронтологии является использование в качестве геропротекторов различных популяций стволовых клеток. Об этом свидетельствуют данные о роли стволовых клеток в регенерации организма, о наличии возрастной динамики этих процессов (Галицкий В.А., 2009). Представляется интересным изучение геропротекторных свойств у биоактивных метаболитов, способных влиять в организме человека на различные клеточные популяции стволовых клеток. Данные наших предварительных исследований на животных позволяют предполагать, что такими цитостимулирующими свойствами могут обладать L-аргинин и интерлейкин-2 (Гаврилов И.В. и др., 2011).

Цель исследования. Оценить возможности использования потенциальных активаторов стволовых клеток интерлейкина-2 и L-аргинина для коррекции биологического возраста человека.

Материал и методы. В исследование включено 52 пациента мужского (30) и женского пола (22) с календарным возрастом от 29 до 89 лет. В исследование привлекались пациенты с полиорганной патологией (от 5–7 хронических заболеваний в стадии стойкой ремиссии). В качестве геропрофилактической терапии использовались разработанные нами схемы применения препаратов «Вазотон» (L-аргинин, ООО «Алтайвитамины») курс 14 дней по 1 капсуле 500 мг энтерально 2 раза в сутки и Ронколейкин (рекомбинантный интерлейкин-2 человека, ООО «БИОТЕХ», СПб) курс 5 внутримышечных инъекций по 500 тыс. МЕ в течение 10 дней: по 1 инъекции через сутки. Общие биохимические показатели, отражающие обмен белков, липидов, углеводов, исследовали на биохимическом иммуноферментном анализаторе (Chem Well, Awareness Technology, США) в сыворотке крови пациентов с использованием реактивов «SPINREACT» (Испания). В периферической крови пациентов определяли общие гематологические показатели (гематологический анализатор ERMA PCE 90VET, Walpole, США) и содержание гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) по маркеру CD34⁺ методом 5-цветной проточной цитометрии на приборе «FACS Canto II» (Becton & Dickinson, США) (Gratama J.W. et al., 2001; Lu F.Z. et al., 2005; Bernardo M.E., 2007). Для оценки геропрофилактического эффекта определяли биовозраст (программа «BIOAGE Polinom», Microsoft Excel, Свидетельство № 2012613817) (Токарь А. В. и др. 1990; Гаврилов И.В. и др., 2012). Статистическая обработка результатов исследований проводилась методами вариационной статистики с применением программного комплекса Stata 6.0 (Stata Corporation, США) на персональном компьютере в операционной системе Microsoft Windows XP Home Edition.

Результаты и обсуждение. Под действием интерлейкина-2 у пациентов мужского пола в сыворотке крови наблюдалось повышение содержание общего белка (5,5%, $p < 0,05$), в крови наблюдалось повышение содержания лейкоцитов (18,1%, $p < 0,001$), лимфоцитов (9,9%, $p < 0,05$), гранулоцитов (25,5%, $p < 0,001$), снижение содержания клеток, несущих маркер гемопоэтических клеток CD34⁺ (-12,5%, $p < 0,05$). Интерлейкин-2 вызвал у пациентов мужского пола существенное снижение выраженности признаков биовозраста: -14,9% ($p < 0,001$).

Под действием аргинина у пациентов женского пола в сыворотке крови наблюдалось повышение содержания триглицеридов (69,1%, $p < 0,01$), общего белка (8,0%, $p < 0,01$), альбуминов (5,2%, $p < 0,05$), в крови наблюдалось повышение содержания лимфоцитов (14,0%, $p < 0,05$), эритроцитов (8,6%, $p < 0,01$), гематокрита (5,6%, $p < 0,05$), повышение содержания CD34⁺ клеток (49,5%, $p < 0,001$). Под действием аргинина у пациентов женского пола снижался биовозраст (-6,0%, $p < 0,05$). Под действием аргинина у пациентов мужского пола в сыворотке крови наблюдалось снижение содержания холестерина (-11,2%, $p < 0,05$), мочевой кислоты (-10,7%, $p < 0,05$), в крови наблюдалось повышение содержания лимфоцитов (11,8%, $p < 0,05$), гематокрита (3,7%, $p < 0,05$), снижение моноцитов (-26,7%, $p < 0,05$), гранулоцитов (-19,0%, $p < 0,01$), повышение CD34⁺ клеток (24,4%, $p < 0,001$).

Выводы. Установлено, что интерлейкин-2 и L-аргинин способны достоверно изменять метаболизм и темп старения человека. Наиболее выраженный геропрофилактический эффект обнаружен у интерлейкина-2 у пациентов мужского пола, что может быть опосредовано стволовыми гемопоэтическими клетками (CD34⁺).

Е.О. Осидак, М.С. Осидак, М.С. Бартов, А.С. Карягина, В.Г. Лунин, С.П. Домогатский

Эктопический остеогенез индуцированный rhBMP-2 в составе коллаген-фибронектинового матрикса

ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

ФГБУ «РКНПК» Минздрава России, Москва
egorosidak@gmail.com

E.O. Osidak, M.S. Osidak, M.S. Bartov, A.S. Karyagina, V.G. Lunin, S.P. Domogatskii

The osteogenic effect of bone morphogenetic protein-2 on collagen scaffold with fibronectin

Восстановление тканей в области повреждения может быть существенно ускорено путем привлечения клеток, способных его стимулировать. В процессах клеточной миграции, пролиферации и дифференциации ключевую роль играет группа активных белковых соединений — факторов роста. Костные морфогенетические белки (Bone Morphogenetic Proteins, BMP), являющиеся плейотропными факторами роста, стимулируют формирование новой костной ткани. В частности, BMP-2 индуцирует дифференциацию некоторых мультипотентных клеток в хондрогенные и остеогенные, а также способствует пролиферации остеобластов. Рекомбинантный аналог BMP-2 человека (rhBMP-2) широко используется в клинических исследованиях.

Чтобы обеспечить продолжительное действие введенного rhBMP-2 в зоне повреждения костной ткани, необходимо поддерживать его локальную концентрацию на постоянном уровне. Для локализации и продолжительности воздействия рекомбинантного rhBMP-2 в клинике используют коллагеновую губку, при этом доза вводимого местно rhBMP-2 в среднем составляет около 12 мг, что примерно в тысячу больше количества эндогенного BMP-2. Поскольку емкость коллагенового носителя по отношению к rhBMP-2 невелика (около 1 мг rhBMP-2 может связаться с 10 мг коллагена), то использование такого избыточного количества rhBMP-2, несвязанного с коллагеном, приводит к быстрому высвобождению 30–50% рекомбинантного белка в первые дни после имплантации. Для обеспечения более продолжительного высвобождения необходимо снизить количество используемого rhBMP-2, а также обеспечить дополнительные места связывания для фактора роста внутри самого имплантата.

Цель исследования: оценка кинетики высвобождения rhBMP-2 из коллагенового носителя, содержащего фибронектин, а также исследование физиологических реакций организма, возникающих при его введении.

Материал и методы. Рекомбинантный BMP-2 получали с помощью микробиологического синтеза и очищали по оригинальной технологии (1). В эксперименте *in vitro* использовали 0,5% раствор очищенного

нативного крысиного коллагена и фибронектин плазмы крови человека (Имтек, Россия); свежую плазму крови человека, антикоагулированная ЭДТА. Высвобождение rhBMP-2 из носителей оценивали, инкубируя их в фиксированном объеме цельной плазмы крови человека при постоянном перемешивании. В каждую экспериментальную группу входило по 5 образцов. Перед сменой омывающего раствора часть его отбирали для определения количества вышедшего из геля rhBMP-2. Количественное содержание rhBMP-2 в исследуемых растворах оценивали с помощью специфичной ИФА тест-системы (ООО фирмы «Имтек»). *In vivo* исследование проводилось на 30 крысах-самцах Wistar. Носитель, коллаген-фибронектиновый матрикс, получали в результате инкубации при 37°C 0,5% стерильного раствора очищенного нативного крысиного коллагена (Имтек, Россия) с фибронектином плазмы крови человека и rhBMP-2 в количестве 100 мкг. В ходе эксперимента носители имплантировали подкожно в паховую область и наблюдали в течение 42 дней. В определенные временные промежутки по 2 крысы выводили из эксперимента передозировкой углекислого газа в CO₂ камере, после чего область имплантации материалов тщательно исследовали макроскопически. Коллагеновые гидрогели извлекали; ткани, контактировавшие с ними, фиксировали в 10% формалине, готовили срезы и анализировали методами классической гистологии. Количественное содержание rhBMP-2 в извлеченных гидрогелях оценивали с помощью специфичной ИФА тест-системы (ООО фирмы «Имтек»).

Результаты и обсуждение. Измерение кинетики высвобождения rhBMP-2 из коллагеновых носителей *in vitro* было проведено для коллагенового и коллаген-фибронектинового гидрогеля при инкубации в плазме крови человека при температуре +37°C. Как и ожидалось, коллаген-фибронектиновый матрикс продемонстрировал эффективное удержание rhBMP-2 *in vitro* при инкубации в человеческой плазме крови, но в отличие от аналогичных систем доставки, применяемых в клинике, удалось избежать фазы быстрого высвобождения рекомбинантного фактора роста. Около 20% от введенного rhBMP-2 высвободилось из коллагенового имплантата в течение недели. Аналогичный результат был получен при удержании rhBMP-2 коллаген-фибронектиновым матриксом *in vivo*. Согласно гистологическим данным, мягкие ткани интегрируются с коллагеновым гелем, начиная уже с третьих сут. Сосудистая реакция с клеточной пролиферацией в области имплантации коллагенового гидрогеля направлена на формирование собственного внеклеточного матрикса. Минимальные воспалительные процессы сменяются интенсивным образованием новой соединительной ткани, активно проникающей вглубь материала. А на 42 день после операции было отмечено наличие формирующейся костной ткани. По результатам гистологического исследования можно сделать вывод, что разработанный коллаген-фибронектиновый матрикс для доставки rhBMP-2 обладает всеми преимуществами коллагеновых носителей: биосовместим, проницаем для клеток, способствует их адгезии и пролиферации.

Сеть фибрилл коллагена и фибронектина, входящих в состав коллаген-фибронектинового матрикса, обеспечивает все условия для презентации rhBMP-2 в малых количествах, при которых сохраняется био-

логическая активность связанного с фибронектином и коллагеном рекомбинантного фактора роста. Использование малых количеств rhBMP-2 для регенерации костной ткани позволит минимизировать риск возникновения таких побочных явлений, как неуправляемый рост костной ткани в спинномозговой канал, остеолит, и, как следствие, потеря фиксации имплантата, отек тканей шеи и горла, дисфагию, а также повышенный уровень антител к BMP-2.

1. Шарапова Н.Е., Котнова А.П., Галушкина З.М. и др. Получение рекомбинантного костного морфогенетического белка 2 человека в клетках *Escherichia coli* и тестирование его биологической активности *in vitro* и *in vivo*. Молекулярная биология 2010: 44(6): 1036–44.

А.Г. Попандопуло¹, А.С. Кавелина¹, О.Н. Иванова², Г.И. Дрожжина², В.К., Гринь¹, Н.В. Пасечникова²

Морфологические аспекты культивирования лимбальных клеток на амнионе

¹ ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины», Донецк, Украина

² ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины», Одесса, Украина
annakavelina@mail.ru

A.G. Popandopulo, A.S. Kavelina, O.N. Ivanova, G.I. Drozhzhina, V.K. Grin, N.V. Pasechnikova

Morphological aspects of the cultivation of limbal cells on the amnion

Введение. В последние годы в клинической медицине заметно возрос интерес к использованию тканей, представляющих собой биогенные стимуляторы. Одной из таких тканей является амниотическая оболочка — самый внутренний слой зародышевых оболочек человека. Амниотическая мембрана (АМ) человека обладает высокой прочностью и пластичностью и не препятствует прохождению лекарственных веществ из конъюнктивальной полости, что дает возможность использовать ее в качестве универсального биологически активного барьера. Кроме этого, амниотическая оболочка является полупрозрачной и позволяет беспрепятственно наблюдать за динамикой патологического процесса в роговице.

Имеется множество противоречивых публикаций по поводу правильного расположения амниона на поверхности глаза. Оболочка может быть пришта к глазной поверхности основной мембраной эпителия обращенной вверх и стромальной стороной, обращенной вниз к глазу (предпочтительная техника) или стромальной стороной амниона вверх. Использование свойств АМ и послойное культивирование клеток роговицы приближает к идее о создании искусственной роговицы.

Цель. Провести сравнение послойного культивирования лимбальных и эпителиальных клеток роговицы человека на стромальной и базальной сторонах амниона.

Материал и методы. Для исследования использовали криозамороженную АМ и первичные культуры, выделенные из кадаверных роговиц человека. С помощью фазово-контрастной микроскопии в процессе культивирования были выделены для исследования две субпопуляции клеток роговицы: лимбальные стволовые клетки (ЛСК) и клетки плоского эпителия роговицы человека. Идентификацию

двух субпопуляций подтверждали иммуногистохимическими окрашиваниями на специфические маркеры (P63-маркер недифференцированных стволовых клеток, цитokerатин 19, цитokerатин 3/12-маркер дифференцированных стволовых клеток, виментин, α -SMA, кератинсульфат). Клеточные культуры были протестированы на контаминацию возбудителями инфекций. После размораживания до комнатной температуры мембрану трижды промывали в растворе PBS (Sigma, США). Затем аккуратно расправляли на стерильной фольге и разрезали на небольшие кусочки размером 1×1 см². В 4-луночную плату (μ -Slide 8 well, IBIDI, GmbH) помещали два образца базальной мембраной вверх и два стромальной стороной. Наносили на поверхности амниона по 10 тыс. ЛСК в 0,2 мл питательной среды DMEM/F12 1:1 (Sigma, США), содержащей 10% ЭТС, L-глутамин (Sigma, США), пеницилин 100 ед/мл (Дарница, Украина), стрептомицин 100 ед/мл (Дарница, Украина), эпидермальный и фактор роста фибробластов 10 нг/мл (Sigma, США), инсулин 5 мкг/мл (Sigma, США), трансферрин 5 мкг/мл (Sigma, США), изопротеринол 5 мкг/мл (Sigma, США), гидрокортизон 5 мкг/мл (Sigma, США). Смену сред проводили каждые 48 ч в течение 12 сут. Культивирование осуществляли в стандартных условиях в CO₂ инкубаторе, с влажностью 95% при температуре 37°C. На протяжении этого периода наблюдали за сменой активности пролиферации клеток, их морфологией. После достижения конфлуэнтного лимбального монослоя на поверхности АМ, наносили суспензию клеток плоского эпителия роговицы человека и культивировали в течение 3–5 дней. Визуализацию клеточных линий на амнионе осуществляли с помощью инвертируемого светового микроскопа Leica PMIL, рабочей станции с обработкой изображения LEICA QWIN 500 Standart, видеокамеры JVC-C 1380, светового микроскопа Olympus AX 50 и видеокамерой Olympus DR 70.

Для оценки морфологической структуры амниона и культивированных клеток роговицы человека использовали иммуногистохимию с окрашиванием специфических маркеров.

Результаты. Не составляет сложности определить базальную мембрану и стромальную сторону при первичной заготовке амниона во время кесарева сечения и помещения на нитроцеллюлозную бумагу. Стромальная сторона АМ липкая как стекловидное тело, а сторона базальной мембраны блестящая и не липкая.

Определенную трудность составляет дифференцировка сторон у АМ после криозамораживания. Стромальная сторона амниона утрачивает свою липкость. В нашем исследовании для культивирования двух субпопуляций клеток роговицы использовали криозамороженную АМ.

Результаты проведенного экспериментального исследования *in vitro* свидетельствуют о повышенном потенциале пролиферации и дифференциации субпопуляций ЛСК роговицы человека. Специфические маркеры, характерные для этого вида клеток, не экспрессируются в клетках плоского эпителия.

Для базальных лимбальных клеток характерна цилиндрическая форма, среди этих клеток большое количество камбиальных, т.е. стволовых. Такие клетки имели высокую пролиферацию (в логарифмической фазе роста время удвоения составляло 14–16 ч), отчетливо идентифицированы ядра с

четкими видимыми ядрышками. Шиповатые клетки полигональной формы вклинивались между базальными клетками и составляли совокупность плотно сформированного слоя. Следующий слой плоских клеток, чьи ядра имеют палочковидную форму, расположены параллельно поверхности пласта.

Культивирование двух субпопуляций клеток роговицы на стромальной стороне и базальной мембране АМ существенно не отличалось.

Выводы. В экспериментальном исследовании достигнута цель получения двух монослоев клеточных субпопуляций на поверхности как стромальной, так и базальной сторон амниона. Культивирование клеток роговицы человека благоприятно осуществляется на любой из поверхностей АМ с учетом правильно подобранных питательных сред.

Таким образом, можно надеяться, что созданная модель искусственной роговицы сможет стать альтернативой кератопластики и способна стимулировать процессы репаративной регенерации при повреждении роговой оболочки.

И.В. Потапов¹, Е.В. Скоробогатова²,
З.М. Дышлевая², А.В. Приходько¹, А.А. Исаев¹

Сиблинговые банки пуповинной крови на основе модели персонального хранения пуповинной крови

¹ Институт Стволовых Клеток Человека, банк пуповинной крови «Гемабанк», Москва

² Российская детская клиническая больница, Москва
ivp@gemabank.ru

I.V. Potapov, E.V. Scorobogatova, Z.M. Dyshlevaya,
A.V. Prihodko, A.A. Isaev

Sibling cord blood banks based on the model of personal storage of umbilical cord blood

Пуповинная кровь (ПК) является ценным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), криоконсервированные образцы используются для трансплантации у детей и взрослых при патологии системы кроветворения и иммунной системы, в т.ч. для лечения злокачественных заболеваний. Подавляющее большинство трансплантаций проводилось с использованием образцов донорских (неперсонифицированных) банков (ДБ). Это стало возможным благодаря объединению ДБ ПК, находящихся на территории всего земного шара, в интернациональные регистры.

Наряду с ДБ ПК, существуют и банки персонального хранения (ПБ), в которых владельцами образцов являются физические лица. Количество хранящихся в таких банках образцов по всему миру оценивается более, чем 1,2 млн. Родители ребенка, образец ПК которого находится в ПБ, сознательно делают выбор в их пользу, поскольку при необходимости они всегда смогут использовать данный образец для трансплантации. Особенно актуально это для семей, где имеется старший ребенок, которому требуется трансплантация ГСК. Таким образом, ПБ выглядят выгоднее в некоторых аспектах: имеется гарантированная возможность использования преимуществ родственных трансплантаций и отсутствуют длительные (до 2 мес.) сроки подбора HLA-совместимого донора. С другой стороны, услуги ПБ оплачиваются из кармана самих родителей.

В последние годы ведутся активные дискуссии по созданию т.н. семейных банков ПК — гибридов донорских и частных банков. Их целевая аудитория — семьи, имеющие детей с гематологическими заболеваниями. Заготовка ПК (оплачивается государственными механизмами) в такой семье с большой вероятностью может привести к родственной трансплантации этого образца, отдаленные результаты которых лучше, чем неродственных.

Иллюстрацией такого подхода может стать клинический случай.

Ребенку М., мужского пола, 2009 г.р. в мае 2010 г. был поставлен диагноз «Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз». С 01.06.2010 начата химиотерапия. На фоне проводимого лечения у ребенка отмечался минимальный гематологический ответ. Было проведено HLA-типирование ребенка и его родной сестры, рожденной в 2011 г, образец ПК которой был сохранен в ПБ «Гемабанк». Дети HLA-идентичны. Принято решение о родственной трансплантации ГСК при достижении донором веса более 10 кг. Аллогенная трансплантация костного мозга (КМ) и ПК была проведена 26.01.12 в отделении трансплантации костного мозга Российской детской клинической больницы. Финальный объем трансплантата составил 140 мл (КМ 80 мл, ПК 60 мл). Клеточные характеристики трансплантата: NC — 3×10^8 /кг (КМ $2,2 \times 10^8$ /кг, ПК $0,8 \times 10^8$ /кг, CD34+ — $5,6 \times 10^6$ /кг (КМ $5,2 \times 10^6$ /кг, ПК $0,4 \times 10^6$ /кг). Приживление зафиксировано на +20 день. В настоящее время трансплантат функционирует удовлетворительно, РТПХ нет, ремиссия, полный донорский химеризм.

Таким образом, ПБ ПК могут служить базой для государственных программ по лечению ряда тяжелых гематологических заболеваний, позволяя при этом значительно экономить и время, и средства на поиске доноров в международных регистрах, повышая эффективность работы регистровых банков ГСК.

Е.Ю. Рогульская, Ю.А. Петренко, Е.Б. Ревенко,
А.Ю. Петренко

**Морфофункциональные свойства
мультипотентных мезенхимальных
стромальных клеток жировой ткани взрослого
человека при культивировании в присутствии
тромбоцитарного лизата**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков, Украина
yu.a.petrenko@gmail.com*

O.Y. Rogulska, Y.A. Petrenko, O.B. Revenko,
A.Y. Petrenko

**Morphofunctional properties of human adult
adipose tissue multipotent mesenchymal
stromal cells during culture in the presence
of platelet lysate**

Жировая ткань (ЖТ) является доступным источником мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) для регенеративной медицины. Перспектива использования ММСК ЖТ в клинической практике предполагает исключение из состава среды культивирования ксеногенных компонентов, таких как фетальная сыворотка крупного рогатого скота (ФС), что обуславливает необходимость поиска альтернативных компонентов, способных обеспечить

оптимальный рост и дифференцировку клеток.

Целью настоящей работы было оценить пролиферативные и дифференцировочные свойства, а также эффективность колониеобразования ММСК ЖТ человека при культивировании в присутствии аллогенного тромбоцитарного лизата (ТЛ).

В работе использовали ММСК ЖТ человека 3–4-го пассажей. Для приготовления ТЛ цельную кровь взрослых доноров подвергали двукратному центрифугированию, после чего полученную и обогащенную тромбоцитами плазму замораживали для разрушения тромбоцитов и высвобождения тромбоцитарных факторов роста (PDGF). После размораживания полученный ТЛ центрифугировали, фильтровали и использовали в дальнейших исследованиях. ММСК ЖТ культивировали в присутствии 10% ТЛ или 10% ФС крупного рогатого скота. Метаболическую и пролиферативную активность ММСК ЖТ на разных этапах культивирования оценивали с использованием редокс-индикатора Alamar Blue, а также прямого подсчета клеток. Колониеобразующую активность ММСК ЖТ оценивали при культивировании клеток с низкой посевной плотностью в средах, содержащих 15% ФС или 10% ТЛ. Адипогенную и остеогенную дифференцировку проводили в течение 21 сут в средах, содержащих специфические индукторы. Эффективность остеогенной и адипогенной дифференцировки оценивали по экспрессии клетками щелочной фосфатазы или накоплению липидов, позитивно окрашивающихся Oil Red O.

При культивировании ММСК ЖТ в присутствии ЭС в течение 7 сут. количество клеток в культурах увеличивалось в 1,5–2,2 раза. В присутствии ТЛ увеличение данного показателя было более выраженным (4,7–5,2 раза). При оценке эффективности колониеобразования ММСК ЖТ было установлено, что в присутствии 10% ТЛ количество образовавшихся колоний в 1,6 раз превосходило показатели, полученные с использованием ФС. Оценка дифференцировочных свойств ММСК ЖТ после экспансии в средах, содержащих ЭС или ТЛ, показала различия в эффективности остеогенной дифференцировки клеток. Так, после культивирования ММСК ЖТ в присутствии ФС количество дифференцированных в остеогенном направлении клеток составляло 45–60%, а после экспансии в среде с ТЛ — более 85%. Вместе с тем, значимых отличий в эффективности адипогенной дифференцировки клеток в исследованных группах выявлено не было. Спонтанная дифференцировка в остеогенном и адипогенном направлениях также не отличалась между группами и составляла менее 4%.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования ТЛ в качестве альтернативы ксеногенной эмбриональной сыворотке для культивирования ММСК ЖТ человека. Данный подход культивирования представляется перспективным для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

ИСКЧ
10 лет



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

www.hsci.ru





- Крупнейший банк персонального хранения стволовых клеток пуповинной крови в РФ и СНГ
- Около 20 000 семей доверили Гемабанку хранение уникального биологического материала
- Активное участие в исследованиях клеток пуповинной крови



- Первый в Европе геннотерапевтический препарат, кодирующий синтез фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF 165) для лечения хронической и критической ишемии нижних конечностей
- «Первый в классе» препарат для терапевтического ангиогенеза. Локальное введение препарата способствует формированию новых сосудов в зоне ишемии
- Новые сосуды – новые возможности



- Общероссийская сеть медико-генетических центров нового образца
- Широкие возможности диагностики и профилактики наследственных заболеваний
- Активное применение принципов управления здоровьем; профилактический подход в медицинской генетике



- Генетический скрининг, который проводится на основе уникального ДНК-чипа «Этноген»
- Одномоментное исследование на 66 наследственных моногенных заболеваний и их носительство, а также выявление предрасположенности к развитию 6 многофакторных патологий
- Направленность на генетическую специфику жителей России, высокая информативность



- Высотехнологичный банк хранения репродуктивных клеток человека, включающий в себя современную лабораторию, донорский и персональный банк хранения
- Расширенное генетическое тестирование доноров
- Партнерство с одним из крупнейших мировых банков спермы California Cryobank (США)



- Уникальный персональный комплекс диагностических и лечебных процедур для восстановления кожи при ее естественных и приобретенных изменениях, основанный на применении собственных клеток кожи пациента – фибробластов
- Первая и единственная клеточная технология, одобренная регуляторными органами РФ для персонализированного применения при коррекции возрастных изменений кожи
- Инновационная технология защищена 4 патентами; опубликовано более 20 работ в российских и мировых журналах

А.В. Родина, Е.Ю. Москалева, Т.Х. Тенчурин,
А.Ю. Хоменко, Т.Е. Григорьев, С.Е. Северин

Характеристика биосовместимости полимерных матриц из хитозана и полилактида с мезенхимальными стволовыми клетками человека

НИЦ «Курчатовский институт» НБИКС-центр,
Москва
alla.rodina@bk.ru

A.V. Rodina, E.Yu. Moskaleva, T.H. Tenchurin,
A.Yu. Khomenko, T.E. Grigorev, S.E. Severin

Chitosan and polylactide scaffolds biocompatibility characterisation for human mesenchymal stem cells

Эффективность полимерных материалов в качестве носителей для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) определяется в первую очередь их адгезивными свойствами и отсутствием токсического воздействия на клетки. Удобными критериями оценки биосовместимости полимерных носителей являются сохранение способности клеток к пролиферации и дифференцировке при культивировании на полимере. ММСК пролиферируют медленно, поэтому важно выяснить, можно ли в качестве критерия биосовместимости материала потенциального носителя и ММСК использовать параметры его взаимодействия с клетками эпителиального происхождения и фибробластами.

Цель исследования: сравнение биосовместимости волокнистых и пленочных носителей на основе хитозана и полилактида для клеток человека эпителиального происхождения линии MCF-7, для фетальных фибробластов LECN и ММСК.

Материал и методы. Клетки человека линии MCF-7 и легочные фетальные фибробласты человека LECN культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. ММСК выделяли из липоаспирата подкожной жировой клетчатки здоровых добровольцев в соответствии со стандартным протоколом. Для определения уровня экспрессии отдельных маркеров ММСК, их инкубировали с мечеными ФИТЦ антителами к соответствующим антигенам, затем измеряли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитофлуориметра EPICS-XL. Размер фракции SP (суррогатный маркер стволовых клеток) в культурах ММСК определяли после окрашивания роданином-123 с помощью проточной цитометрии. Для оценки биосовместимости в лунки 24-луночного планшета с полимерами (хитозан, полилактид в виде пленочных и волокнистых материалов размером 1×1 см) и без (контроль), вносили по 100 тыс. клеток в 500 мкл полной культуральной среды и инкубировали в течение 24, 72, 96 ч. Морфологию и жизнеспособность клеток определяли с помощью световой микроскопии и регистрировали цифровой камерой. Для оценки уровня адгезии через 3 сут. клетки снимали с пластика с помощью 0,05% раствора трипсина в растворе Версена и определяли их количество с помощью камеры Горяева. Выживаемость клеток после инкубации на полимерных матрицах оценивали с помощью МТТ-теста по методу Mosmann.

Результаты. При исследовании способности клеток линий MCF-7 и LECN к адгезии на пленочных материалах из хитозана и полилактида, было

обнаружено, что количество прикрепившихся клеток через 24 ч составило 30% на пленке из полилактида и 10% на пленке из хитозана. При этом распластывались и имели морфологию, характерную для эпителиальных клеток и фибробластов, только клетки на пленке из полилактида. При культивировании клеток линий MCF-7 и LECN в течение 72–120 ч на волокнистых и пленочных полимерах показано, что клетки прикреплялись и пролиферировали на всех полимерах, но наиболее активно — на пленочных материалах (скорость пролиферации клеток линии LECN на пленках была в 5 раз выше по сравнению с волокнистыми материалами). Наиболее высокая скорость пролиферации наблюдалась при культивировании клеток на пленке из полилактида. При сопоставлении выживаемости клеток линии LECN с уровнем гидрофильности поверхности полимеров, определяемой по значениям угла смачивания, оказалось, что скорость пролиферации достоверно коррелировала со степенью гидрофильности и волокнистых и пленочных полимеров ($p \leq 0,001$).

Для анализа биосовместимости пленки из полилактида с ММСК использовали недифференцированные ММСК после шестого пассажа. Предварительный анализ поверхностных антигенов ММСК с помощью проточной цитофлуориметрии показал, что клетки ММСК экспрессируют типичный набор поверхностных антигенов CD44, CD75, CD90, CD105, менее 8% клеток экспрессировали HLA-DR и, кроме того, 1% клеток — рецептор АФП (маркер эмбриональных клеток), в то время как экспрессия CD14, CD34, CD45 не выявлялась. Фракция SP в ММСК составляла 15%, в присутствии верапамила она уменьшалась до 7%. Окрашивание клеток ММСК суданом III после длительного культивирования в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки без добавления индукторов дифференцировки, показало, что содержание адипоцитоподобных клеток с липидными вакуолями в такой культуре составляет менее 1%, что свидетельствует о низком уровне спонтанной дифференцировки клеток. Через 24 ч культивирования ММСК на пленке из полилактида уровень прикрепления клеток составил 40% (40 тыс. кл./см²). На этом носителе клетки сохраняли жизнеспособность в течение 96 часов культивирования.

Выводы. Культивирование клеток на волокнистых полимерах из полилактида и хитозана неэффективно из-за их низких адгезивных свойств. Для предварительной оценки биосовместимости полимерных материалов и ММСК можно и целесообразно использовать перевиваемые линии клеток, такие как MCF-7 и LECN. ММСК с высокой эффективностью прикрепляются к матрицам из полилактидной пленки и остаются жизнеспособными в течение длительного времени, что позволяет рассматривать такие пленки в качестве эффективного носителя клеток.

А.Ю. Рябов¹, И.С. Фадеева², Н.О. Вежнина²,
М.Г. Васильев³, Ю.Б. Юрасова⁴, Е.Д. Склянчук⁵,
М.В. Лекишвили³, В.С. Акатов²

Экспериментальное исследование биологических мембран ксеногенного происхождения

¹ Стоматологический центр «Интердентос», Королев

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

³ ФГБУ ЦИТО им. Н.Н. Приорова, Москва

⁴ Российская детская клиническая больница, Москва

⁵ Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва
riabov2003@mail.ru

A.Yu. Ryabov, I.S. Fadeeva, N.O. Veznina, M.G. Vasiliev,
Yu.B. Yurasova, E.D. Sklyanchuk, M.V. Lekishvili,
V.S. Akatov

Experimental study of the xenogenic origin biological membranes

Введение. В хирургии полости рта в последнее десятилетие широко используются различные барьерные мембраны биологического и синтетического происхождения, используемые при операциях по направленной регенерации костной ткани в различных клинических ситуациях. Важными факторами, влияющими на успешный результат лечения, являются время резорбции мембраны, а именно продолжительность ее барьерной функции (предотвращение врастания мягких тканей в структуру регенерата кости), токсическое (антигенное) влияние на окружающие ткани, а также отсутствие отрицательного влияния мембраны на структуру слизисто-надкостничного лоскута, например, его истончение.

Дополнительными факторами, определяющими выбор барьерной мембраны, для врача может являться ее стоимость и доступность, а также простота применения (синтетические мембраны стоят очень дорого, и не всегда являются резорбируемыми).

Цель исследования: провести экспериментальную оценку для определения антигенных свойств и времени биодеградации (окончания барьерной функции) биологических барьерных мембран из тканей половозрелого быка (перикард, диафрагма, твердая мозговая оболочка).

Материал и методы. В эксперименте использовали барьерные мембраны органического происхождения М-П (перикард), М-ТМО (твердая мозговая оболочка), М-Д (диафрагма), изготовленные по методике ЦИТО им. Н.Н. Приорова (механическая и химическая обработка с целью удаления элементов крови, лиофилизация из замороженного состояния, радиационная стерилизация). В качестве экспериментальных животных использовали крыс линии Wistar, самцов массой 180–200 г, полученные данные усреднялись. Животные содержались в стандартных условиях (температура 21±3°C, влажность 30–70%, 12-часовой период освещения, корм и вода — ad libitum). Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с требованиями этического комитета Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пущино).

Для исследования биосовместимости и степени кальцификации биоматериалов мы использовали известную модель подкожной имплантации биоматериалов крысам (Lee et al. 1998). Эксперименталь-

ные образцы мембран рассекались на фрагменты размером 7×10 мм и помещались в пористые камеры, изготовленные из титановой сетки, с размерами ячеек 50 мкм.

Фрагменты образцов имплантировали подкожно крысам по 6 штук в каждую крысу (по 2 образца каждого варианта М-П, М-ТМО и М-Д) вдоль спины через разрез в нижней части спины под золотил/ксилазиновым наркозом (6 мг/12 мг на 1 кг веса). Животные были разделены на 3 группы по 3 крысы в группе, их выводили из эксперимента в сроки 30, 45 и 70 сут. После эксплантации материал исследовался морфологически.

Результаты. По данным гистологического и иммуногистохимического исследования образцов наиболее выраженная инкапсуляция наблюдалась в группе М-П, так же как и наименее выраженное разрушение структуры и прорастание соединительной тканью, при этом в группах М-П и М-Д определялся нарастающий ангиогенез и минерализация, а инфильтрация была меньше в группе М-П.

Группа М-ТМО показала самую маленькую минерализацию и отсутствие структуры, а также не выраженную инфильтрацию и ангиогенез. Следовательно, наименее активным процессам, в целом, подвержены образцы из ТМО.

Выводы. Все имплантируемые материалы биосовместимы. Наиболее быстро и полно (30 сут. — 80%) подвергается резорбции материал М-ТМО (твердая мозговая оболочка). При этом данный материал в целом истончается, но не теряет своих прочностных характеристик.

В материале М-П (перикард) на поверхности, прилегающей к мышце (в 66% случаев) наблюдалось образование гетеротопической кости (тонкая пластинка). Без гистологического анализа можно сделать предположение о том, что наблюдался частичный остеопластический эффект. При этом более выраженный к 45 сут. имплантации кальциноз (по сравнению с группами М-ТМО и М-Д) свидетельствует о том, что резорбция ткани через стадию минерализации в данной группе происходила быстрее, и, следовательно, формирование пограничной эктопической кости также наступило быстрее, чем в других группах. Наименее выраженными прочностными характеристиками обладает материал М-Д (диафрагма).

А.А. Савченко¹, А.Г. Борисов¹, И.И. Гвоздев¹,
А.В. Мошев¹, О.Г. Тоначева², В.Н. Кошечев¹,
В.Д. Беленюк¹

Применение хемилюминесцентного анализа при изготовлении дендритной вакцины

¹ ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера»
СО РАМН, Красноярск

² КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского», Красноярск

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, I.I. Gvosdev,
A.V. Moshev, O.G. Tonacheva, V.N. Koshcheev,
V.D. Belenyuk

Use of the chemiluminescent analysis in made dendritic vaccine

Противоопухолевая вакцина на основе дендритных клеток (дендритная вакцина) является относительно новым способом лечения больных с онкологическими

заболеваниями. Дендритная вакцина состоит из двух основных компонентов: собственно дендритных клеток (получают из крови пациента) и опухолевых белков, источником которых является опухолевая ткань больного. Эффективность дендритной вакцины при онкологических заболеваниях и сложность получения дендритных клеток диктуют необходимость разработки методов оценки степени «созревания» дендритных клеток. Маркером стадии развития дендритных клеток может явиться снижение их фагоцитарной активности. Фагоцитоз сопровождается реакцией «респираторного взрыва» с участием НАДФН-оксидазы и образованием активных форм кислорода. Интенсивность синтеза активных форм кислорода в фагоцитирующих клетках можно определить с помощью хемилюминесцентного анализа.

Целью исследования явилась оценка степени незрелости дендритных клеток при получении дендритной вакцины с помощью хемилюминесцентного анализа.

Материал и методы. На базе НИИ медицинских проблем севера СО РАМН и Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского проведено исследование хемилюминесцентной активности дендритных клеток 45 больных раком почки в возрасте от 38 до 62 лет. В качестве контрольной группы были обследованы 33 здоровых донора аналогичного возрастного диапазона. Исследования проводились в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (WMA, 1964). Из периферической крови практически здоровых людей и больных раком почки стандартным методом выделяли моноциты с последующей инкубацией в RPMI 1640 с добавлением 10% аутосыворотки. Дифференцировка моноцитов в дендритные клетки осуществлялась с помощью гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (100 нг/мл) и α -интерферона (1000 ед./мл). Культивирование осуществляли 5 дней, затем добавляли фактор некроза опухоли- α (TNF α) с последующей инкубацией в течение 3 дней. Стадии созревания дендритных клеток определяли методом проточной цитометрии. Маркером дифференцировки моноцитов в дендритные клетки являлась экспрессия CD83⁺CD14⁺CD80⁺CD86⁺-антигенов. Хемилюминесцентную активность дендритных клеток определяли в периоды 5 и 8 дней после начала инкубации. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл сливной донорской сыворотки AB(IV)Rh(-), 50 мкл люминола или люцигенина (Sigma, США) в концентрации 10^{-5} М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси клеток (1 млн./мл) и 240 мкл раствора Хенкса (ПанЭко, Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хенкса — для индуцированной. Исследование люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции проводили в течение 90 минут на хемилюминесцентном анализаторе CL3606M (СКТБ “Наука”, Красноярск). Результаты хемилюминесцентного анализа характеризовали по следующим параметрам: время выхода на максимум интенсивности хемилюминесценции, значение максимума интенсивности хемилюминесценции, площадь под кривой хемилюминесценции. Для всех полученных данных определяли медиану (Me) и интерквартильный разброс (C_{25} — C_{75}). Проверку

гипотезы о статистической достоверности величин исследуемых показателей в независимых выборках проводили с помощью критерия Mann-Whitney. Достоверность изменения величин исследуемых показателей в зависимости от стадии созревания дендритных клеток оценивали по критерию Wilcoxon. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Результаты и обсуждение. При сравнительной оценке хемилюминесцентной активности незрелых дендритных клеток больных раком почки выявлено снижение интенсивности хемилюминесценции и площади под хемилюминесцентной кривой как спонтанной, так и индуцированной хемилюминесцентной реакции относительно контрольной группы. При сравнительной оценке хемилюминесцентной активности дендритных клеток до и после трехдневной инкубации с TNF α выявлено значимое снижение интенсивности спонтанной хемилюминесценции, интенсивности зимозан-индуцированной хемилюминесценции, площади под хемилюминесцентной кривой и индекса активации зрелых дендритных клеток относительно незрелых как в контрольной группе, так и в группе больных раком почки.

Таким образом, установлено, что в процессе созревания дендритные клетки утрачивают хемилюминесцентную активность, а следовательно, и способность к фагоцитозу. Метод хемилюминесценции может быть применен для определения стадии созревания дендритных клеток.

Грант на исследование предоставлен Красноярским краевым фондом поддержки научной и научно-технической деятельности.

В.Н. Сими́рский¹, М.К. Duncan²

b-1 интегрин как потенциальная мишень при генной терапии вторичной катаракты

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

² University of Delaware, Newark, DE, 19716, USA
simir@mail.ru

V.N. Simirskii, M.K. Duncan

b-1 integrin as a potential therapeutic target for secondary cataract

Для большинства тканей позвоночных описана небольшая популяция стволовых клеток, которая обеспечивает их постоянное обновление и регенерацию. В хрусталике глаза позвоночных такие клетки локализованы в эпителии хрусталика (ЭХ) экваториальной области. После удаления катаракты в капсуле хрусталика сохраняется небольшое количество клеток ЭХ, которые могут разрастаться по искусственному хрусталику и вызывать вторичное помутнение. Для предотвращения развития вторичной катаракты необходимо тем или иным способом подавить пролиферацию и элиминировать эти клетки.

Пролиферация, миграция и дифференцировка стволовых клеток во многом контролируется их микроокружением. Центральными звеньями в системе «стволовая клетка-микроокружение» являются трансмембранные белки интегрины. Они служат одновременно механосенсорами и механотрансдукторами, а также являются рецепторами внеклеточного матрикса. Функциональный рецептор состоит

из двух субъединиц: α и β , причем β 1 интегрин является ключевым в системе адгезии, так как образует комплексы практически со всеми α интегринами. Мы изучили роль β 1 интегрин в морфогенезе и дифференцировке хрусталика мыши.

С помощью Cre-Lox-системы были получены три типа локального (conditional) нокаута гена β 1-интегрин в хрусталике зародышей мыши, которые различались по контролю экспрессии Cre-рекомбиназы.

1. Генная конструкция с энхансером гена Pax6 обеспечивала нокаут во всех клетках хрусталика, начиная с момента его индукции (8.5 сут эмбрионального развития). Инвагинация эктодермы и формирование хрусталикового пузырька протекали нормально, однако ЭХ отсутствовал вследствие дифференцировки всех его клеток в волокна. Позже клетки хрусталика подвергались апоптозу, и у взрослых мышей наблюдалась анофтальмия.

2. Генная конструкция с промотором гена α A-кристаллина обеспечивала нокаут только в дифференцированных клетках хрусталика (волокнах), начиная с 10.5 сут. развития (начало дифференцировки первичных волокон). Хрусталик формировался относительно нормально, однако у взрослых мышей развивалась катаракта из-за нарушения пространственной организации волокон.

3. Комбинация промотора гена α A-кристаллина и энхансера гена Pax6 обеспечивала нокаут во всех клетках хрусталика, начиная с 10.5 сут. развития. В хрусталике зародышей выявлены апоптоз клеток ЭХ и развитие фиброза. У взрослых мышей наблюдалась микрофтальмия.

Таким образом, эффект нокаута гена β 1-интегрин в хрусталике глаза зависит от времени инициации нокаута и его клеточной локализации. Очевидно, β 1 интегрин участвует в поддержании жизнеспособности клоногенных клеток ЭХ, предотвращая их апоптоз и преждевременную терминальную дифференцировку в волокна. Наши данные свидетельствуют о возможности использования β 1-интегрин в качестве мишени при генной терапии вторичной катаракты для элиминации остаточных клеток ЭХ.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 12-04-00186-а) и Национальным Институтом глаза США (National Eye Institute, грант EY015279).

В.В. Соловьева, И.И. Салафутдинов, Е.Е. Черенкова, С.Ф. Хайбуллина, А.А. Ризванов

Генетическая модификация стволовых клеток из жировой ткани человека плазмидой pEGFP-N2 не влияет на секрецию цитокинов/хемокинов

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

V.V. Solovyova, I.I. Salafutdinov, E.E. Cherenkova, S.F. Khaiboullina, A.A. Rizvanov

Genetic modification of human adipose derived stem cells with pEGFP-N2 plasmid DNA does not affect cytokines/chemokines secretion

Введение. Одним из перспективных источников стволовых клеток является жировая ткань. Стволовые клетки из жировой ткани (adipose derived stem

cells, ADSC) секретируют множество трофических и протекторных факторов, что является одной из причин, обуславливающих их терапевтическую эффективность при трансплантации. В то же время, для повышения эффективности клеточной терапии рассматривается возможность генетической модификации стволовых клеток вирусными и невирусными векторами. Однако влияние генетической модификации на секрецию цитокинов стволовыми клетками из жировой ткани недостаточно исследовано.

Цель исследования. Провести анализ секреции цитокинов/хемокинов стволовыми клетками из жировой ткани человека, генетически модифицированными плазмидой pEGFP-N2.

Материал и методы. Образцы подкожной жировой клетчатки были получены в ходе плановой косметологической операции (липосакции). Стволовые клетки из жировой ткани были выделены с помощью ферментативной обработки, как описано ранее [Zuk et al., 2002]. Выделенные клетки культивировали с использованием среды α MEM, к которой было добавлено 10% сыворотки крови плодов коровы, 2 mM L-глутамин, 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Москва), при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂.

Генетическую модификацию (трансфекцию) клеток ADSC плазмидным вектором pEGFP-N2 (BD Biosciences Clontech, Германия), экспрессирующим зелёный флуоресцентный белок GFP (англ. Green fluorescent protein), проводили трансфекционным агентом TurboFect (Thermo Scientific™) по методике, рекомендуемой производителем. Эффективность трансфекции определяли по количеству EGFP позитивных клеток методом флуоресцентной микроскопии на инвертированном флуоресцентном микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия). Культуральную среду от клеток, трансфицированных плазмидами, собирали через 24 ч после трансфекции, очищали от остаточного клеточного материала центрифугированием и фильтрованием через 0,45 мкм нейлоновый фильтр. Для мультиплексного анализа каждый исследуемый образец разводили в 10 раз.

Уровень продукции цитокинов/хемокинов INF- γ (cat#MXHIFNG, Bead 20), IL-1 β (cat#HSIL-1B, Bead 24), IL-2 (cat#MXHIL-2, Bead 28), IL-8 (cat#MXHIL-8, Bead 40), IL-10 (cat#MXHIL-10, Bead 44), IL-12 (cat#MXH12P70, Bead 48), MCP-1 (cat#MXHMCP-1, Bead 58) оценивали методом проточной флуориметрии на мультиплексном анализаторе Luminex®200™ с использованием микросфер MILLIPLEX® MAP в соответствии с инструкцией фирмы производителя (Millipore). Концентрации аналитов были рассчитаны с использованием стандартной кривой, с помощью программного обеспечения Luminex IS 2.3.

Результаты. Проведен сравнительный анализ нативных и генетически модифицированных стволовых клеток из жировой ткани человека по уровню продукции Th1-противовоспалительных цитокинов INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-12, Th2-противовоспалительного цитокина IL-10, хемокинов IL-8, MCP-1. Концентрация INF- γ в культуральной среде нативных клеток составила 5 пг/мл, IL-1 β — 4 пг/мл, IL-2 — 3 пг/мл, IL-8 — 1588 пг/мл, IL-10 — 12 пг/мл, IL-12 — 8 пг/мл и MCP-1 — 4954,5. Концентрация INF- γ в культуральной среде генетически модифицированных клеток составила 2 пг/мл, IL-1 β — 5 пг/мл, IL-2 — 4 пг/мл,

IL-8 — 2268 пг/мл, IL-10 — 15 пг/мл, IL-12 — 8 пг/мл и MCP-1 — 3702 пг/мл.

Выводы. Генетическая модификация клеток ASCs с помощью плазмидного вектора pEGFP-N2 не привела к изменению продукции цитокинов/хемокинов по сравнению с нативными клетками. Это свидетельствует об отсутствии нежелательных побочных эффектов генетической модификации, связанных с процедурой трансфекции и переносом векторной рекомбинантной плазмидной ДНК в клетки-мишени.

А.А. Степанов, Е.В. Коротаев, В.И. Рабинович,
Л.П. Астахова, С.А. Пономарев

Влияние отмывания криопротектора диметилсульфоксида на свойства гемопозитических стволовых клеток трансплантационного материала

АУ «Югорский НИИ клеточных технологий с банком стволовых клеток», Ханты-Мансийск
glagolmail@gmail.com

A.A. Stepanov, E.V. Korotaev, V.I. Rabinovich,
L.P. Astahova, S.A. Ponomarev

Influence of cleaning cryoprotectant DMSO of material for transplatation on properties of hematopoietic stem cells

Актуальность. Побочные эффекты, возникающие во время введения трансплантационного материала, содержащего гемопозитические стволовые клетки (ГСК), по механизмам возникновения разделяют на три основные группы: эффекты, которые возникают вследствие раздражения блуждающего нерва при трансфузии холодного трансплантационного материала; эффекты, связанные с цитолизом клеток трансплантационного материала вследствие криоповреждения при хранении; эффекты, связанные с наличием в трансплантационном материале криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО).

Для предотвращения побочных эффектов, связанных с введением пациенту ДМСО с трансплантационным материалом, после размораживания материала производят его отмывание от криопротектора. Один из вариантов данного метода предполагает многократное разведение размороженного материала аутоплазмой с последующим фракционированием и плазмозэкстракцией. Кроме того, в практике применяют автоматизированное отмывание криопротектора. Некоторые исследователи утверждают, что по данным проточной цитометрии, влияние данных манипуляций на жизнеспособность ГСК не значимо. Следует отметить, что проточная цитометрия не позволяет в полной мере оценить способность ГСК к восстановлению кроветворения.

С учетом сказанного выше нами было выполнено стендовое исследование влияния отмывания ДМСО на репродуктивные свойства ГСК трансплантационного материала.

Материал и методы. В качестве материала для исследования был использован концентрат мононуклеаров пуповинной крови (ПК), полученной в ходе естественных родов. Полученный материал был подготовлен к замораживанию путем добавления криопротектора ДМСО в конечной концентрации 7,5%. Далее материал подвергали замораживанию и хранению в жидком азоте. Размораживание материала выполнялось на водяной бане при +40°C в течение

1–2 мин. Сразу после размораживания производился отбор пробы для лабораторного анализа. Далее из криопакета с биоматериалом в стерильных условиях отбирали 2 мл пробы в центрифужную пробирку на 15 мл. Добавлением к образцу раствора RPMI доводили объем до 10 мл. Таким образом, получали пятикратное разведение пробы, а концентрация ДМСО снижалась до 1,5%. Затем пробирку с пробой центрифугировали при 600 оборотах в минуту в течение 20 минут. После центрифугирования 8 мл образовавшегося супернатанта, не содержащего клетки, удаляли. К оставшейся суспензии клеток снова добавляли RPMI доводя объем клеточной взвеси до 10 мл. Таким образом, получали в материале концентрацию ДМСО 0,3%. Снова центрифугировали и снимали супернатант. Полученную суспензию клеток тщательно перемешивали и выполняли исследование количества ГСК и их способности к кроветворению.

Количество ГСК определяли на проточном цитометре CYTOMICS FC 500, с использованием набора реагентов Stem-Kit Reagents. Для изучения колониеобразующей активности ГСК была использована готовая метилцеллюлозная среда MethoCultH4434 Classic, содержащая факторы роста. Подсчет колоний проводился на 14 день культивирования.

Результаты и обсуждение. При исследовании влияния отмывания подвергнутого криохранению и размороженного концентрата ГСК ПК от ДМСО, было выявлено снижение количества ГСК на $18\% \pm 8$ и статистически достоверное снижение колониеобразующей активности ГСК на $45\% \pm 11$ ($p \leq 0,05$). Изменения, происходящие с концентратом ГСК, подвергнутым криохранению и размораживанию, необходимо учитывать при проведении трансплантации и принятии решения о целесообразности отмывания трансплантационного материала от ДМСО.

Вывод. Отмывание трансплантационного материала от ДМСО приводит к снижению количества ГСК и их способности к кроветворению.

О.С. Сотников, Н.М. Парамонова, А.А. Лактионова

Моделирование межнейронной синцитиальной связи in vitro

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург
natapa@bk.ru

O.S. Sotnikov, N.M. Paramonova, A.A. Laktionova

Modeling of interneuronal syncytial connection in vitro

Обнаруженная недавно возможность нейроногенеза из камбиальных малодифференцированных клеток головного мозга взрослых не нарушает твердо установленный факт неспособности высокодифференцированных нейронов делиться. Многочисленные исследования свидетельствуют о возможностях нервных клеток так же, как и других, формировать дву- и многоядерные комплексы, включая гибридные гетерокарионы. Механизмом этого процесса может являться только синцитиальное слияние клеток. До недавнего времени нейрональная доктрина исключала само существование синцитиальной связи в нервной системе. Основным доказательством явилось открытие химических синапсов с помощью электронного микроскопа. Существенные дополнения и видоизменения нейронной теории требуют обнаружение

высокопроницаемых мембранных щелевых контактов, сочетающих электротоническую передачу сигнала и наноскопическую межклеточную цитоплазматическую диффузию, а также плотных контактов, метастабильных по своей сути состояний мембран, которые могут приводить к более протяженным трансмембранным перфорациям, обеспечивающим синцитиальную связь контактирующих клеток.

С целью доказательства существования синцитиальной цитоплазматической связи в нервной системе была разработана модель синцитиальной связи нейронов *in vitro*, приоритет которой был подтвержден патентным свидетельством № 2433484.

Материалом служили нейроны из ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis*, экспериментальное синцитиальное слияние которых добивались без специальных химических реагентов, таких как полиэтиленгликоль, латекса полистирола и пр., без электропорации, электроакустического воздействий и повышения температуры, что является травмирующими агентами для живых клеток.

Предложенный способ моделирования синцитиальной связи нейронов *in vitro* заключается в диссоциации нервных клеток, освобождении их от соединительной капсулы ганглия и глиальных оболочек общеизвестным протеолитическим способом, помещении их в культуральную среду, центрифугировании и инкубации в питательной среде в течение последующих 2-х сут. Далее конгломераты клеток фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом и 1% осмием с последующей дегидратацией этиловым спиртом восходящей концентрации. Забивали в смесь аралдитов по стандартной прописи для электронно-микроскопического исследования. С помощью светового фазово-контрастного микроскопа на полутонких срезах обнаруживали цитоплазматические «ножки» нейронов, соединяющие соседние клетки. В конгломератах насчитывали от 2 ± 3 до 5 ± 7 сцепленных между собой нейронов. На ультраструктурном уровне регистрировали фрагментацию клеточных мембран в области соприкосновения «ножек», образование сквозных межмембранных перфораций, соединяющих цитоплазму соседних клеток. Вблизи таких участков нередко митохондрии, а вдоль сохранившихся мембран, имеющих иногда признаки септальных специализаций, встречались субмембранные цистерны эндоплазматического ретикулула.

Наблюдения показывают, что при такой обработке нейронов, они сохраняют свою жизнеспособность, восстанавливают естественную способность к агрегации и адгезии, а лишившись глиальной изоляции, контактируют с образованием синцитиальной связи, что в дальнейшем могло бы привести, на наш взгляд, к полной редукции межклеточных участков мембран и слиянию соседних нейронов.

Таким образом, предложенная технология межнейронных взаимодействий дает возможность изучать прямые контакты клеток и моделирует образование нейронального синцития в условиях *in vitro*. Это принципиально важно, ибо доказывает, что в нервной системе между нейронами помимо химических синапсов и электропроницаемых контактов существует третий тип коммуникаций — синцитиальная цитоплазматическая связь.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: № 09-01-00473, № 10-04-90000— Bel_a.

А.А. Степанов, Е.В. Коротаев, В.И. Рабинович,
Л.П. Астахова, С.А. Пономарев

Алгоритм получения гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови для аутогенной трансплантации

АУ «Югорский НИИ клеточных технологий с банком стволовых клеток», Ханты-Мансийск
glagolmail@gmail.com

A.A. Stepanov, E.V. Korotaev, V.I. Rabinovich,
L.P. Astahova, S.A. Ponomarev

Algorithm obtaining of the hematopoietic stem cells peripheral blood for autologous transplantation

Введение. Выделение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из периферической крови — малоинвазивный и безопасный метод получения материала для трансплантации в онкогематологии. Однако в периферической крови содержится незначительное количество ГСК. Сочетание медикаментозной мобилизации ГСК в периферический кровоток с современными методами лейкоцитафереза позволяет получить из периферической крови достаточное для трансфузии количество ГСК. Однако реализовать данную задачу часто бывает не просто. Трудности связаны с индивидуальной кинетикой мобилизации ГСК, вследствие специфических изменений костного мозга в результате заболевания и проводившегося лечения. Наиболее сложными вопросами при получении трансплантационного материала является определение момента для проведения лейкоцитафереза, выбор оптимальной продолжительности операции и ее кратности. Использование четкого методического алгоритма позволит оптимально решать эти вопросы в конкретной клинической ситуации.

Цель исследования. Апробировать алгоритм получения ГСК из периферической крови для аутогенной трансплантации.

Материал и методы. Объектом исследования являлись 18 пациентов с онкогематологическими заболеваниями, которым была проведена аутотрансплантация ГСК периферической крови. Для мобилизации ГСК пациентам вводился внутримышечно циклофосфомид однократно 4 г/м^2 поверхности тела. Через 5 сут. назначалось ежедневное подкожное введение филграстима 10 мкг/кг массы тела, включительно до завершения операции получения ГСК на клеточном сепараторе Haemonetics MSC+.

В ходе лечения было необходимо определить оптимальный момент для получения трансплантационного материала. Данная задача решалась путем ежедневного мониторинга количества ГСК периферической крови пациентов в течение мобилизации. Когда количество ГСК в периферической крови превышало уровень ≥ 10 ГСК/мкл, принималось решение о начале лейкоцитафереза. Для определения количества ГСК в периферической крови при проведении лейкоцитафереза, после завершения стандартной программы операции на сепараторе Haemonetics MSC+, венепункцией отбиралась проба периферической крови. Одновременно выполнялось исследование количества ГСК в аликвоте, полученной из продукта лейкоцитафереза. В случае набора трансплантационной дозы лейкоцитаферез завершался. Если трансплантационная доза не была набрана, а количество ГСК в периферической крови сохранялось

не менее 10 ГСК/мкл, лейкоцитаферез продолжали. Если уровень ГСК в периферической крови становился ниже данного значения, но трансплантационная доза не была набрана, лейкоцитаферез прекращали. Затем продолжали введение филграстима и через 8–12 ч проводили повторный лейкоцитаферез, если уровень ГСК в периферической крови достигал не менее 10 ГСК/мкл.

Для определения количества ГСК использовали проточный цитометр CYTOMICS FC 500 с набором моноклональных антител «Stem-KitReagents».

Результаты и обсуждение. У всех 18 пациентов в процессе мобилизации была достигнута целевая концентрация ГСК в периферической крови не ниже 10 ГСК/мкл на 5–17 сут.

У 5 из 18 пациентов, по завершению стандартной программы лейкоцитафереза на цитосепараторе Haemonetics MSC+ была получена трансплантационная доза ГСК/кг.

В конце стандартной программы лейкоцитафереза у 5 из остальных 13 пациентов, которым не была набрана трансплантационная доза, количество ГСК в периферической крови оставалось на уровне ≥ 10 ГСК/мкл. Лейкоцитаферез у этих 5 пациентов был пролонгирован, и трансплантационная доза была получена.

У оставшихся 8 пациентов, которым не удалось набрать трансплантационную дозу при стандартной программе лейкоцитафереза, количество ГСК в периферической крови в конце операции оказалось ниже 10 ГСК/мкл. Операция была остановлена и введение филграстима продолжено. У 6 из этих 8 пациентов через 6–8 ч после окончания первого лейкоцитафереза количество ГСК в периферической крови вновь повысилось более 10 ГСК/мкл. Им был выполнен повторный лейкоцитаферез, и трансплантационная доза в итоге была набрана.

Таким образом, разработанный алгоритм пролонгирования процедуры лейкоцитафереза позволил сократить количество повторных операций, и в итоге удалось получить трансплантационную дозу в 90% клинических случаев.

Выводы. Разработанный алгоритм тактики получения трансплантационной дозы ГСК периферической крови пациентов часто позволяет исключить повторный лейкоцитаферез и снижает медикаментозную нагрузку при выполнении мобилизации.

А.И. Улыбин, П.С. Зубанов, С.В. Костюкова,
А.Е. Зверева, О.Г. Макеев

Применение аутогенных дермальных фибробластов в косметологии

ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России, Екатеринбург
ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург
Prof - SSazonov@yandex.ru

A.I. Ulybin, P.S. Zubanov, S.V. Kostyukova, A.E. Zvereva,
O.G. Makeev

The use of autologous dermal fibroblasts in cosmetology

Введение. Ухудшение качества кожи по мере старения организма во многом определяется снижением активности и количества клеточной составляющей дермы. Поэтому не случайно, что радикальное

решение проблемы коррекции возрастных изменений перенесено в область применения клеточных технологий для заместительной терапии. Целый ряд сложностей, выявленных при изучении последствий применения аллогенных клеток, выводит методы, использующие генетически идентичные реципиенту аутогенные клетки, в число исключительно возможных для практического использования. Однако, как показал многолетний опыт применения таких технологий (напр. Isolagen, США) их применению с целью коррекции возрастных изменений препятствует сложность работы с «взрослыми» клетками и ограниченный восстановительный потенциал клеток стареющего организма.

Ранее нами было показано, что эти ограничения могут быть успешно преодолены при соблюдении следующих условий:

- выбор участка для эксплантации (с наибольшей сохранностью потенциала фибробластов и с близким к лицевой области профилем экспрессии генов, определяющих синтез уникальных вариантов коллагена);

- культивирование в среде, содержащей аутофакторы и регуляторы экспрессии соответствующих генов;

- контроль качества и безопасности клеточного материала, накапливающегося в ходе культивирования.

Цель исследования: обоснование и разработка метода коррекции изменений кожи с использованием собственных (аутогенных) фибробластов кожи пациента, культивированных *in vitro*.

Материал и методы. Клинические исследования проводили с 2005 г. сотрудниками Лаборатории молекулярных и клеточных технологий Уральской госмедицинской академии с привлечением баз косметологических салонов и лечебно-профилактических учреждений Екатеринбурга. Работа выполнялась в соответствии с решением Этического комитета и Ученого совета Уральской госмедицинской академии, утвердивших программу научно-исследовательских работ и протоколы доклинических и клинических исследований клеточных технологий.

Исследование осуществлялось с учетом международных норм GLP и GCP. В испытаниях принимали участие 83 пациента в возрасте от 43 до 65 лет.

Выбор зоны введения клеток для терапевтической коррекции кожи осуществлялся на основании субъективного определения наиболее проблемной области лица самим пациентом и мнения врача-косметолога.

Количество однократно вводимых клеток варьировало в зависимости от объема проблемной зоны и составляло в среднем от 3×10^6 до 15×10^6 . Разовый объем вводимого препарата — 1–3 мл. Клетки вводили пациентам методом «папулы» для крупных морщин, обкалывания мелких морщин или равномерно на площадь проблемной зоны с помощью микроинъекций; введение повторялось 2–4 раза с 7–10-дневными перерывами.

Изменения кожи после трансплантации отслеживались в динамике на протяжении 7 лет. Степень внешней косметической коррекции оценивалась как специалистами, так и самими испытуемыми. Пациенты с периодичностью в 3 мес. заполняли специальную анкету, в которой отмечали степень положительной динамики, побочные эффекты, их выраженность и продолжительность.

Испытуемые оценивали общую степень своей удовлетворенности косметическим эффектом по 10-балльной шкале. За «0» принималась субъективная оценка состояния кожи до начала испытаний. Полная, с субъективной точки зрения пациента, ликвидация признаков старения кожи в зоне введения клеток оценивалась 10 баллами.

Экспертная оценка производилась по аналогичной шкале двумя специалистами с усреднением результатов на завершающем этапе испытания.

Результаты. Все испытуемые после введения аутофибробластов отмечали положительный косметический эффект в проблемной области, заключающийся в уменьшении выраженности крупных и мелких морщин, кожных дефектов, а также в общем улучшении состояния кожи лица в области трансплантации фибробластов.

Наблюдалась стойкая динамика прогрессирования положительного косметологического эффекта с течением времени. Наибольшая его выраженность отмечена к 15–18 мес. после терапии с последующим снижением в течение 4 лет. Примечательно, что 43 пациента обратились повторно, а 26 — более 2 раз с целью косметической коррекции других зон тела (кисти рук, зона декольте, передняя брюшная стенка, колени). Коррекция проводилась с использованием «персональных» клеточных линий, хранящихся в жидком азоте.

Выводы. Положительный клинический эффект применения препаратов фибробластов у пациентов в возрасте 43–65 лет указывает на сохранение восстановительного потенциала фибробластов ягодичной области, что позволяет использовать их для коррекции возрастных изменений кожи. Выраженность и продолжительность позитивного эффекта может быть обусловлена усилением экспрессии вводимыми клетками гена Coll 11A1, кодирующего синтез коллагена XI, не склонного к формированию мультимерных сшивок. Предстоящие исследования в этом направлении должны быть нацелены на оптимизацию схем терапии и объективизацию отдаленных результатов.

Е.Е. Черенкова, И.И. Салафутдинов, А.А. Ризванов

Исследование иммуногенных свойств плазмидного вектора, коэкспрессирующего рекомбинантные белки с помощью 2А-пептидных последовательностей вируса ящура

ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет
rizvanov@gmail.com

E.E. Cherenkova, I.I. Salafutdinov, A.A. Rizvanov

Immunogenicity of plasmid vector co-expressing recombinant proteins using foot-and-mouth disease virus 2A-peptides

Приоритетным направлением генно-клеточной терапии является поиск оптимального вектора — переносчика генетической информации. Идеальная векторная система биобезопасна, бесконтрольно не интегрируется в геном, обеспечивает высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков в системах *in vivo* и *in vitro*. Помимо экспрессии целевых генов широко применяется экспрессия репортерных генов (флуоресцентные белки, маркеры антибиотико-

устойчивости), облегчающих идентификацию модифицированных клеток и позволяющих визуально оценить эффективность трансфекции. В качестве терапевтических агентов выступают гены, кодирующие различные ферменты, факторы роста и молекулы адгезии, повышающие жизнеспособность клеток, модулирующие тропизм и способность к дифференцировке в определенном направлении. Зачастую для достижения максимального терапевтического эффекта необходимо экспрессировать комбинацию терапевтических генов. Таким образом, возникает вопрос об использовании эффективной стратегии ко-экспрессии ряда белков с минимальными затратами энергии.

В 1988 г. двумя независимыми группами ученых — Пеллетье и Соненберга, и Джанга, было показано, что внутренний участок встраивания рибосомы (IRES), первоначально обнаруженный у вирусов эукариот, инициирует связывание с рибосомой и трансляцию по кэп-зависимому механизму (Pelletier, Sonenberg, 1988). С того времени в системах *in vitro* и *in vivo* стали широко использовать бицистронные векторы, в которых трансляция основного полипептида с мРНК первичного транскрипта является кэп-зависимой, а второго — IRES-зависимой. Такие векторы широко используются в генно-клеточной терапии, где один из генов представлен селективным маркером или геном, кодирующим репортерный белок, а второй — целевой. Однако значительный размер IRES-элементов и низкая эффективность инициации трансляции второго полипептида значительно ограничивают их применимость в генной терапии (Chan H.Y. et al., 2011).

Перспективной альтернативой IRES стали векторы, содержащие 2А-пептидные последовательности вируса ящура. Малый размер 2А-пептидного участка (14±20 аминокислот) и способность к саморасщеплению на С-конце без реинициации трансляции позволяет осуществлять синтез нескольких полипептидов с одного транскрипта мРНК и весьма привлекательны для генотерапевтических приложений. Эквивалентная экспрессия всех белков в рамках одной векторной системы, а также небольшой размер пептида, являются очевидными преимуществами по сравнению с IRES. Недостатками такой системы могут стать иммунологические реакции на вирусные пептиды, а также особенности посттрансляционного фолдинга белков (Ryan et al., 1991).

Целью работы стала оценка иммуногенных свойств 2А-пептидного генотерапевтического препарата в системе *in vivo*. В качестве генотерапевтического препарата выступила рекомбинантная плазмида pVEGF-FuP2A-FGF2-FuP2A-EGFP, кодирующая гены сосудистого эндотелиального фактора роста, основного фактора роста фибробластов и зеленого флуоресцентного белка, соединенных в единую открытую рамку считывания при помощи 2А-пептидных последовательностей. Плазмиды представляют собой наиболее биобезопасные генетические векторы — они обладают малой иммуногенностью и не способны 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. Возможность одновременной экспрессии нескольких терапевтических генов позволяет частично нивелировать низкую эффективность трансфекции.

Препарат вводили самцам мышей в возрасте 3 месяцев. Было произведено введение «голой» плазмидной ДНК, а также в присутствии катионного трансфекционного препарата TurboFect in vivo (Fermentas, Канада). Через 28 сут. осуществлялся забор крови из хвостовой вены с последующим получением сыворотки. Выявление антител к чужеродным антигенам проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием очищенных рекомбинантных белков VEGF и FGF2 человека, а также синтетического 2A-пептида CGDVEENPG. Наиболее сильный иммунный ответ на чужеродный пептид был зарегистрирован через 48 дней после повторного введения препарата с использованием трансфицирующего реагента. Также были выявлены антитела на рекомбинантные антигены: сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов, что подтверждает экспрессию рекомбинантных белков в системе in vivo.

И.В. Честков¹, Е.А. Васильева¹, С.Н. Иллариошкин²,
М.А. Лагарькова¹, С.Л. Киселев¹

Создание модели бокового амиотрофического склероза на основе пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

² Научный центр неврологии РАМН, Москва, Россия
ichestkov@vigg.ru

I.V. Chestkov, E.A. Vasilieva, S.N. Illarioshkin,
M.A. Lagarkova, S.L. Kiselev

Generation of cell model system of amyotrophic lateral sclerosis based on patient-specific induced pluripotent stem cells

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — это поздно развивающееся, непрерывно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся специфической гибелью моторных нейронов спинного и головного мозга. На сегодняшний день не существует эффективной диагностики ранних этапов развития данного заболевания. Наиболее распространенная семейная форма БАС (20% от всех семейных случаев) ассоциирована с мутациями в гене Cu/Zn супероксиддисмутазы 1 (SOD1) с аутосомно-доминантным типом наследования. Ранее было показано, что развитие БАС не связано с нарушением или потерей ферментативной активности SOD1. Предполагается, что неправильно свернутый мутантный SOD1 может оказывать специфический токсичный эффект на моторные нейроны, при этом в процесс могут быть вовлечены другие типы клеток, такие как астроциты и микроглия. Технология генетического репрограммирования позволяет получать плюрипотентные стволовые клетки индивидуально для каждого пациента. Полученные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) могут стать неограниченным ресурсом для получения специализированных типов клеток организма. Мы применили технологию репрограммирования для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с семейными формами БАС. Полученные линии иПСК обладают свойствами плюрипотентных клеток и способны к направленной дифференцировке в моторные нейроны.

А.Г. Чоговадзе, А.С. Попова, М.А. Кузнецова,
А.А. Исаев

Возможности профилактики наследования моногенных заболеваний от доноров репродуктивных клеток

Институт стволовых клеток человека, Москва
pgd@hsci.ru

A.G. Chogovadze, A.S. Popova, M.A. Kuznetsova,
A.A. Isaev

The prevention opportunities of inheritance of monogenic diseases from reproductive cells donors

Использование донорской спермы в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) достаточно широко распространено. По данным Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ), в 2010 г. в России было проведено 2751 внутриматочных инсеминаций (ВМИ) с использованием донорской спермы. Опираясь на тенденции 5 последних лет наблюдений, можно сделать вывод, что число ВМИ будет продолжать расти. При этом отсутствие расширенного молекулярно-генетического тестирования доноров спермы приводит в некоторых случаях к рождению больных моногенными наследственными заболеваниями (МНЗ) детей. Точная статистика рождения больных детей в программах ВРТ с использованием донорской спермы остается неизвестной в виду отсутствия общероссийского регистра больных МНЗ и учета таких случаев в ежегодных отчетах клиник ЭКО, предоставляемых в РАРЧ. Тем не менее, можно предположить, что частота рождения больных детей в программах ВРТ с использованием донорской спермы не отличается от общепопуляционной, которая составила в 2011 г., по данным П.В. Новикова — главного эксперта-генетика МЗ РФ, от 7 до 17 больных на 1000 новорожденных — 0,7%—1,7% от всех новорожденных. В развитых странах мира такая статистика также не ведется, однако нередко публикации в СМИ о рождении больных детей, зачатых с использованием донорской спермы. Также, к сожалению, нередко случаи злого умысла доноров — так, например, один больной нейрофиброматозом I типа, зная о своем заболевании, стал донором спермы в нескольких банках, с использованием его спермы родилось 43 ребенка в 10 различных странах Европы, и только в одной Дании родилось 5 больных детей.

Решением этой проблемы может стать расширенное молекулярно-генетическое тестирование доноров. Так, например, в США, существуют официальные рекомендации по панелям для молекулярно-генетического тестирования доноров, принадлежащих определенным этническим группам. Однако, эти панели включают в себя только наиболее частые заболевания, такие как муковисцидоз и спинальная амиотрофия и специфические заболевания отдельных этнических групп, например, болезнь Тея-Сакса или болезнь Кэнавана для евреев-ашкенази, что не может существенно снизить риск передачи ребенку наследственного заболевания. Расширенное молекулярно-генетическое тестирование доноров спермы, например с помощью ДНК-чипа «Этноген», разработанного Институтом Стволовых Клеток Человека позволит значительно снизить риск передачи наследственных заболеваний. Такой подход был

реализован в банке репродуктивных клеток и тканей «Репробанк».

В «Репробанке» каждый донор репродуктивного материала проходит обязательное расширенное молекулярно-генетическое тестирование с помощью ДНК-чипа «Этноген» и в случае обнаружения носительства частых наследственных патологий, донор исключается из базы данных. В дополнение к молекулярно-генетическому тестированию, для максимально эффективной профилактики передачи наследственных заболеваний от доноров спермы, «Репробанк» получает обратную связь от реципиентов донорской спермы на всех этапах: эффективность проведения ВМИ, достижение беременности, информацию о течении самой беременности, а также о здоровье родившегося ребенка. Наличие такой обратной связи позволяет отслеживать эффективность применения донорского репродуктивного материала, а в случае выявления у родившегося ребенка МНЗ, риск которого не был выявлен с помощью молекулярно-генетического тестирования, исключить донора из базы данных и оперативно информировать о риске всех остальных реципиентов репродуктивного материала данного донора.

К.Г. Шевченко, Ф.А. Коновалов, Е.А. Померанцева, А.А. Исаев

Опыт разработки и внедрения генетической диагностики наследственных заболеваний на основе ДНК-микрочипов

*Институт стволовых клеток человека, Москва
konst.shevchenko@gmail.com*

K.G. Shevchenko, F.A. Konovalova, E.A. Pomerantseva, A.A. Isaev

The experience in development and implementation of hereditary diseases genetic diagnosis based on DNA microarrays

В настоящее время по оценкам экспертов ВОЗ средняя частота моногенных наследственных заболеваний в мире составляет 10 случаев на 1000 новорожденных. При этом каждый фенотипически здоровый человек является носителем по меньшей мере 5–7 патологических мутаций, которые могут привести к развитию одного из 8000 известных наследственных заболеваний. Эффективная терапия разработана на сегодняшний день лишь для 50 из них, а тяжелое течение и высокий риск возникновения повторных случаев моногенной патологии делает чрезвычайно актуальной разработку профилактических мероприятий, как в отягощенных семьях, так и для всех пар, планирующих деторождение. Наиболее эффективным способом профилактики является прекоцепционный и неонатальный молекулярно-генетический скрининг как наследственных заболеваний, так и их носительства. Однако, данный метод на сегодняшний день все еще остается достаточно дорогим и трудоемким. Вследствие этого в клинической практике имеется существенный запрос на создание и внедрение новых методов быстрого, точного и недорогого выявления наследственной патологии.

В связи с этим основной **целью** представляемой работы было создание высокопроизводительного, дешевого и достоверного диагностического средства для выявления наиболее распространенных на территории России мутаций, связанных с наследственными

заболеваниями. В качестве базовой была выбрана технология элонгации праймеров на микроматрице (англ. APEX — arrayed primer extension), сочетающая реакцию ПЦР и технологию ДНК-микроматриц. В диагностический набор было заложено 284 мутации, ассоциированные в общей сложности с 66 наследственными моногенными заболеваниями и предрасположенностью к 6 мультифакторным заболеваниям. В рамках разработки был произведен отбор мутаций и полиморфизмов, которые должны детектироваться с использованием ДНК-микрочипа, а также проведены его техническая и клиническая валидация.

В рамках технической валидации были отобраны 13 пациентов с известным генотипом по одному из генетических маркеров, входящих в диагностический набор. В результате были получены предварительные данные о воспроизводимости и достоверности результатов генотипирования, осуществленного с использованием набора.

Клиническая валидация диагностического набора проходила в два этапа, в рамках которых были определены его специфичность и чувствительность. На первом этапе было осуществлено генотипирование образцов синтетической ДНК, содержащих все вошедшие в ДНК-микрочип генетические маркеры во всех трех состояниях (дикий тип, гетерозигота, мутантная гомозигота). В качестве референсного метода определения последовательности использовалось секвенирование по Сэнгеру. Результаты генотипирования отдельных точек, полученные различными методами, были проанализированы и сопоставлены. Специфичность ДНК-микрочипа составила 98%, а чувствительность 96%.

На втором этапе с использованием ДНК-микрочипа было проанализировано 10 образцов геномной ДНК с известным генотипом хотя бы по одному генетическому маркеру. В качестве референсного метода определения последовательности использовался метод MLPA. Результаты генотипирования отдельных точек, полученные различными методами, были проанализированы и сопоставлены. Специфичность диагностического набора по результатам второй фазы клинической валидации составила 98%.

Полученные данные позволили запустить использование разработанного ДНК-микрочипа в качестве скринингового метода для профилактики наследственных заболеваний. Таким образом, нами был разработан уникальный молекулярно-генетический диагностический набор, сфокусированный на популяции, проживающей на территории России, с известными рабочими характеристиками.

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

Исследование влияния стволовых клеток (ММСК, ГСК) на регенерацию селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения

ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздрава России
ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург
Prof-SSazonov@yandex.ru

A.P. Jastrebov, D.U. Grebnev, I.U. Maclakova,
S.V. Sazonov, S.L. Leontyev

Study of the influence of stem cells for the regeneration of the spleen in the conditions of ionizing radiation

Состояние иммунокомпетентных органов является существенным фактором в восстановлении тканей после их повреждения. Предпринимаются различные подходы в восстановлении органов иммунной системы после их повреждения. В нашей лаборатории изучена возможность восстановления ткани селезенки после воздействия экстремально-го фактора использованием клеточных технологий. В настоящем исследовании показано влияние сочетанной трансплантации мультипотентных стромальных мезенхимальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на основные морфометрические показатели селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения (ИИ).

Эксперименты выполнены на 72 белых лабораторных мышах-самцах возраста 3–4 мес., массой 20–25 г и 72 мышах-самцах возраста 3 года, массой 45–50 г. Эксперименты по получению плацентарных ММСК и ГСК выполнены на 36 лабораторных животных мышах-самках возраста 3–4 мес., массой 20–25 г, срок гестации 18 дней. Изучалось воздействие ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр, были выделены опытная и контрольная подгруппы по 9 животных в каждой. Контрольную подгруппу составили животные, не подвергшиеся облучению. Животным опытной подгруппы внутривенно вводилась суспензия ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн кл./кг и 330 тыс. кл./кг, контрольной подгруппе вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 ч после облучения однократно. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сут. после облучения. Производился

анализ морфометрических показателей селезенки: общая площадь лимфоидного фолликула, площадь Т-зоны лимфоидного фолликула, площадь В-зоны лимфоидного фолликула, общая клеточность красной пульпы, а также содержание эритроцитов и лейкоцитов в красной пульпе.

В физиологических условиях на 1 и 7 сут., а также на 1 сут. после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при проведении морфометрического исследования селезенки зрелых и старых лабораторных мышей установлено, что изучаемые показатели существенно не отличались от данных, полученных в контрольных подгруппах.

При проведении морфометрических исследований в селезенке зрелых животных на 7 сут. после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК установлено, что площадь лимфоидного фолликула увеличилась на 22,7%, у старых животных она восстановилась до нормы, В-зона увеличилась на 14,2% и 15,7% соответственно по сравнению с контрольной подгруппой. У зрелых животных отмечено увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов на 14,6%, тогда как у старых не установлено изменения данного показателя по сравнению с контрольной подгруппой. При анализе плотности клеток в красной пульпе обнаружено увеличение изучаемого показателя у зрелых животных на 17,2%, у старых на 14,5%, соответственно по сравнению с контрольной подгруппой. У зрелых животных установлено увеличение содержания эритроидных элементов в красной пульпе на 15,4%, лейкоцитов — на 15,3% относительно контрольной подгруппы. У старых животных содержание эритроцитов в красной пульпе существенно не отличалось от данных в контрольной подгруппе, однако отмечено восстановление лейкоцитов до нормы.

Таким образом, проведенные исследования по изучению действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявили увеличение размеров лимфоидного фолликула за счет увеличения площади В-зоны фолликула. На фоне трансплантации ММСК и ГСК в условиях повреждающего фактора происходит увеличение плотности клеток в красной пульпе селезенки и, как следствие, увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов у зрелых животных. В свою очередь увеличение плотности клеток происходит как за счет увеличения содержания эритроцитов, так и за счет увеличения содержания лейкоцитов. У старых животных отмечено лишь восстановление содержания лейкоцитов.