

Министерство образования и науки РФ
Российский фонд фундаментальных исследований
Российская академия наук
Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

«Стволовые клетки и регенеративная медицина»

IV Всероссийская научная школа-конференция

24-27 октября 2011 года

Москва

Данное издание представляет собой сборник тезисов ежегодно проводящейся на базе факультета фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова IV Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». В нем представлены результаты фундаментальных и прикладных исследований, касающихся стволовых клеток, их биологии. Многие из представленных работ посвящены клиническим исследованиям в области регенеративной медицины.

Издание предназначено для врачей и ученых, занимающихся исследованиями в данной области, аспирантов, студентов медицинских и естественнонаучных факультетов высших учебных заведений.

Выполнено в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований 11-04-13454 офи-г.

СОДЕРЖАНИЕ

Оценка безопасности и частота осложнений операций по тканевой инженерии при хроническом повреждении спинного мозга Авдейкин С. Н.	7
Культуры мезенхимальных стволовых клеток лабораторных приматов и перспективы их использования в экспериментальной медицине Агрба В. З.	8
Клинико-экспериментальные результаты применения клеточной терапии в кардиологической практике: современная концепция Ахмедов Ш. Д.	11
Введение наночастиц сложного оксида железа в цитоплазму стволовых клеток для создания нового метода диагностики и лечения патологических состояний Бабич А. В.	13
Возможности применения некоторых молекулярно-биологических методов для анализа мультипотентных мезенхимных стромальных клеток Бигильдеев А. Е.	14
Характеристика мононуклеаров из пуповинной крови человека, сокультивированных с ММСК из жировой ткани человека при пониженном содержании кислорода Бобылёва П. И.	16
Влияние провоспалительного цитокина ФНО-альфа на способность мезенхимальных клеток к хоумингу в поврежденную ткань Болдырева М. А.	18
Факторы микроокружения в реализации свойств ММСК Буравкова Л. Б.	19
Регенерация перелома трубчатой кости крыс после введения клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани Валюшкина М. П.	20
Влияние ММСК на основные морфометрические показатели селезенки в физиологических условиях и при острой кровопотере Глуханюк Е. В.	22
Пролиферативная активность и жизнеспособность лимфоцитов, сокультивируемых с ММСК при различном напряжении O₂ Горностаева А. Н.	25
Изменение миграционных характеристик стромальных клеток жировой ткани в воспалительном окружении Григорьева О. А.	27

- Зависимость количества c-kit+ резидентных стволовых клеток сердца от клинических характеристик больных ишемической болезнью сердца** Дергилев К. В. 28
- Ангиогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани пациентов с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа** Джояшвили Н. А. 29
- Мезенхимные стволовые клетки (МСК) и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК)** Дризе Н. И. 30
- Роль транскрипционного фактора Prrp1 в адипогенезе** Егоров А. Д. 32
- Влияние возраста пациентов на ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани** Ефименко А. Ю. 33
- Альфа-фетопротейн способствует усилению проангиогенных свойств стромальных клеток жировой ткани** Зубкова Е. С. 37
- Создание мультипотентной регенерационной микроткани человека на базе эпителио-мезенхимальных сфероидов аутологичных МСК** Зурина И. М. 38
- Интерлейкин-17 повышает регенеративный потенциал мезенхимальных стволовых клеток** Иванова Д. П. 39
- Культивирование мезенхимальных клеток пуповинной крови человека и сравнение их свойств с мезенхимальными клетками костного мозга человека** Кананыхина Е. Ю. 40
- Экспериментальное обоснование применения культур фибробластов человека в сочетании с коллагеновым матриксом для лечения кондуктивной тугоухости** Кауламбаева М. З. 42
- Лечебный эффект системной трансплантации культивируемых аутогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у больных с резистентными формами туберкулёза лёгких** Кварцхава Д. Д. 43
- Биореактор с пневмоакустическим распылением культуральной среды** Ковалев А. В. 44
- Терапевтическое использование системной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в модели индуцированной эластазой легочной эмфиземы крыс Вистар** Коноплянников А. Г. 45

- Стимуляция пула стволовых кроветворных клеток у мышей введенными различным способом комплексами наноалмазов и кондиционной среды из-под сингенных и ксеногенных культур мезенхимальных стволовых клеток Коноплянников А. Г. 47
- Оптимизация условий остеогенной дифференцировки мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека Логовская Л. В. 48
- Внеклеточная ДНК опухолевых клеток индуцирует в мезенхимных стволовых клетках жировой ткани повышенный уровень экспрессии PPAR γ Лосева П. 50
- Терапевтический ангиогенез в ишемизированной мышце: повышение эффективности с помощью использования комбинированной генной и клеточной терапии Макаревич П. И. 51
- Костный мозг как источник стволовых клеток для регенерации тканей и органов взрослых млекопитающих Михайлов В. М. 52
- Новый метод культивирования *in vitro* тканей глаза крысы для изучения состояния тканей при патологиях *in vivo* Новикова Ю. П. 54
- Элементный гомеостаз стволовых клеток обонятельного эпителия Обухова Л. М. 55
- Получение и характеристика пересеваемой клеточной линии эмбриональных нейробластов ящерицы *Hemidactylus platiurus* Пантелеев Д. Ю. 60
- Исследование вклада в процесс репаративной регенерации клеточных трансплантатов, полученных в условиях 2D и 3D культивирования Петерсен Е. В. 61
- Межклеточный транспорт цитоплазмы и органелл в совместной культуре мультипотентных стромальных клеток и клеток почечных канальцев. Плотников Е. Ю. 63
- Проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у пациентов с ишемической болезнью сердца Повещенко О. В. 64
- Оценка устойчивости ММСК из жировой ткани человека к условиям аноксии Рылова Ю. В. 66
- Влияние условий культивирования сперматогоний хряка на экспрессию генов маркеров полипотентности Савченкова И. П. 67

- Трансплантация микроглия-подобных клеток трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза и болезни Альцгеймера Салафутдинов И. И. 69
- Терапевтический потенциал клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при регенерации дефектов периферических нервов Салафутдинов И. И. 70
- Сравнительный анализ матриксных и остеоиндуктивных свойств спектра 3D-материалов в тканеинженерных конструкциях с аутологичными ММСК Сергеева Н. С. 71
- Влияние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на активацию лимфоцитов периферической крови *in vitro* Суздальцева Ю. Г. 73
- Опыт клинического применения мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из стромы пуповины новорожденного, для лечения хронических ран Суздальцева Ю. Г. 74
- Использование фторуглеродных эмульсий, стабилизированных проксанолом и фосфолипидами, для введения в стволовые клетки лекарственных веществ Темнов А. А. 76
- Опыт получения и использования пептидов, секретируемых стволовыми клетками костного мозга Темнов А. А. 78
- Роль пероксида водорода в регуляции поляризации и миграции фибробластов Тюрин-Кузьмин П. А. 79
- Три стратегии высокодозной терапии с аутологичной трансплантацией кроветворных стволовых клеток в лечении рассеянного склероз Шевченко Ю. Л. 80
- Пространственно-временные характеристики активации эфринового рецептора EphA2 в отдельных клетках Шаронов Г. В. 82
- Характеристика мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани пациентов с онкологическими заболеваниями Шашкова О. А. 83
- Экспрессия T-кадгерина в клетках меланомы стимулирует миграцию мезенхимальных стромальных клеток при сокультивировании Юрлова Е. И. 85

Оценка безопасности и частота осложнений операций по тканевой инженерии при хроническом повреждении спинного мозга

Авдейкин С.Н., Брюховецкий А.С.

ЗАО Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «НейроВита», Москва

Введение. Большинство исследователей клинического применения стволовых клеток (СК) высоко оценивают эффективность этих технологий и говорят об их безопасности. Мы решили проанализировать безопасность и частоту осложнений при операциях по тканевой инженерии у пациентов с повреждением спинного мозга (ПСМ).

Целью исследования являлась оценка безопасности и анализ частоты осложнений операций по тканевой инженерии спинного мозга

Методы. В исследование вошел 81 пациент с ПСМ. В 1-ю (опытную) группу были включены 47 пациентов (35 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 18 до 59 лет, получивших оперативное лечение с применением технологии тканевой инженерии с 2004 по 2010 годы. Пациентам с ПСМ выполнялись реконструктивные операции на СМ по имплантации системы, состоящей из гетерогенного матрикса «СфероГель» ТМ и аутологичных СК (нейральных и гемопоэтических) в дозе до 2×10^6 (патент № 2336901). Во 2-ю группу (контроль) вошли 34 пациента (22 мужчины и 12 женщин, в возрасте от 18 до 60 лет), получивших традиционное хирургическое лечение (декомпрессионная ламинэктомия, радикуломиелолиз, дренирование кист). К моменту операций у всех пациентов, вошедших в исследование, давность травмы превышала 1 год.

Результаты. Средняя продолжительность оперативного вмешательства в 1-й группе составила 5,48 часа, во 2-й группе 3,2 часа. В интраоперационном периоде общее количество осложнений в 1-й группе отмечено в 51 % случаев (24 пациента). Наиболее частыми 27,7 % (13 пациентов) были гемодинамические нарушения в ответ на манипуляции на спинном мозге, в 19,1 % случаев (9 пациентов) операции осложнились кровопотерей, которая составила более 20 % объема циркулирующей крови (ОЦК); осложнения, связанные с нефизиологичным положением на операционном столе в 4,2 % случаев (2 пациента). Во 2-й группе интраоперационные осложнения отмечены в 11,6 % случаев (4 пациента) — это случаи, связанные с кровопотерей более 20 % ОЦК.

В раннем послеоперационном периоде общее количество осложнений в 1-й группе составило 53,2 % (25 пациентов). Из них: обострение уро-

инфекции в 21,2 % случаев (10 пациентов); ликворрея была отмечена в 12,7 % (6 пациентов); усиление проявлений вегетативной гиперрефлексии в 12,7 % случаев (6 пациентов); респираторные осложнения в 6,4 % (3 пациента); восходящий отек спинного мозга был отмечен в 6,4 % (3 пациента); асептический менингит в 6,4 % случаев (3 пациента). Во 2-й группе количество осложнений составило 41,2 % (14 пациентов). Из них наибольшее количество осложнений было вызвано обострением уроинфекции 23,5 % (8 пациентов); респираторные осложнения у 11,7 % (4 пациентов); кровопотеря составила более 20 % ОЦК в послеоперационном периоде 5,9 % (2 пациента).

Заключение. Применение СК при тканевой инженерии СМ достаточно небезопасный метод, осложнения при таких операциях встречаются более чем в 50 % случаев, соответственно такие виды лечения должны выполняться условиях многопрофильного специализированного стационара. Количество осложнений может быть сокращено до уровня осложнений традиционного хирургического лечения в случае правильного их прогнозирования, совершенствования техники таких видов лечения.

Культуры мезенхимальных стволовых клеток лабораторных приматов и перспективы их использования в экспериментальной медицине

Агрба В. З.¹, Лапин Б. А.¹, Порханов В. А.², Коноплянников А. Г.³, Кальсина С. Ш.³, Карал-оглы Д. Д.¹, Агумава А. А.¹, Леонтьук А. В.¹, Игнатова И. Е.¹

¹ НИИ медицинской приматологии РАН, Сочи, РФ

² Краевая клиническая больница им. Очаповского, Краснодар, РФ

³ ФГБУ МНРЦ Минздравсоцразвития России, Обнинск, РФ

В настоящее время во многих странах экспериментальные исследования на животных ограничены и регулируются этическими комитетами. Вместе с тем, в ряде случаев необходимость использования животных в медико-биологических исследованиях не вызывает сомнений. Это прежде всего касается обезьян, объединенных с людьми в один эволюционный отряд приматов. Эволюционная близость, анатомо-физиологическое сходство обезьян и человека позволяют переносить результаты исследований на них в человеческую практику и рассматривать эти данные как наиболее адекватно отражающие аналогичные процессы у человека [2].

В связи с указанным целью настоящего исследования явилось создание банка культур мезенхимальных стволовых клеток (МСК) лабораторных

приматов и попытки их клинического применения в эксперименте на обезьянах.

Все исследования на животных проводили в строгом соответствии с требованиями комитета по биоэтике и федеральным законом РФ о защите животных от жестокого обращения.

Было использовано 7 половозрелых самцов обезьян 3-х видов: макаки резус (*Macaca mulatta*), павианы гамадрилы (*Papio hamadryas*) и макаки яванские (*Macaca fascicularis*). Аспирацию костного мозга для культивирования в асептических условиях проводили из головки плечевой кости транквилизированных животных. Культивирование осуществляли в стандартных условиях в ростовой среде RPMI 1640 (фирма «Sigma»), с добавлением антибиотиков, 20 % эмбриональной сыворотки коров (фирма «Sigma»), 0,5 % 100х-концентрации витаминов и 0,5 % 50х-кратного концентрата аминокислот (фирма «Sigma»). На 3-е сутки культивирования на 24 часа в культуру вводили деметилирующий препарат 5-азациитидин (в концентрации 3мМ)- индуктор дифференцировки полипотентных МСК в направлении развития кардиомиоцитов, чтобы предупредить возможную спонтанную реализацию остеогенного потенциала МСК. Иммунофенотипическая характеристика клеток изучалась с помощью проточной цитофлюорометрии на проточном цитометре (фирма «Beckman Coulter Epics XL-MCL»). Для типирования клеток использовали меченные флюорохромами МАТ: CD34- PE, CD45RA-PE, CD90- FITC, HLA-DR-FITC (фирма «Becton Dickinson»), специфичные к клеткам обезьян.

Пролиферация клеток костного мозга обезьян после эксплантации в культуру наблюдалась через 3–4 дня, к 7-м суткам культивирования формировалась сеть вытянутых фибробластоидных клеток, а к 10 суткам — сливной монослой, в котором клетки упаковывались правильно, параллельно друг другу, не изменяя размера и морфологии. После введения в культуру 5-азациитидина клетки меняли морфологические характеристики, увеличивались в размерах (в длину и ширину), нарушалась их правильная упаковка. На клетках культур не определялись маркеры гемопоетических клеток CD34, CD45, HLA-DR, а экспрессия CD90 антигена была на уровне 94,6–97,9 %, что свидетельствовало об их стволовости. Предваряя испытания МСК обезьян в клинической практике на животных, обезьянам 3-х видов (павианы гамадрилы, макаки резус и макаки яванские) были введены системно, капельно МСК в количестве 1–2 млн/кг. Вводимые клетки представляли смесь МСК от разных обезьян одного вида, а также в 3-х случаях макакам яванским были введены МСК макаков резус. При этом ни в одном из случаев не наблюдалось клинической картины иммуно-

логического конфликта, т. к. МСК являются иммунопревелигированными, не несут на своей поверхности антигены ГКГС П типа и обладают иммуносупрессивной и противовоспалительной активностью [1]. Аналогичные явления наблюдали и другие исследователи, которые вводили ксеногенные стволовые клетки животным [5]. Попытки использования МСК обезьян в качестве заместительной клеточной терапии проводили при экспериментальном инфаркте миокарда, полученном на павианах и макаках резус путем наложения лигатуры на переднюю коронарную артерию. Воспроизведенный инфаркт миокарда был подтвержден на ЭКГ. У обезьян с экспериментальным острым инфарктом миокарда в сыворотке крови появлялся ранний маркер повреждения миокарда тропонин-1, повышалась активность креатининфосфокиназы (КК) и КК МВ фракция, а также активность печеночных ферментов АлАТ и АсАТ. Двум обезьянам (павиану гамадрилу и макаке резус) с развившимся инфарктом миокарда ввели системно аллогенные МСК в количестве 2 млн\кг. Через 1 месяц наблюдения клиническое состояние обезьян было удовлетворительным, маркеры повреждения миокарда определялись на исходном уровне, а на ЭКГ отмечались остаточные явления перенесенного инфаркта миокарда.

Кардиотоксичность противоопухолевых препаратов — одно из серьезных осложнений лекарственного лечения больных с онкологическими заболеваниями. Известно, что антрациклины (доксорубин и др.) и близкие к ним препараты приводят к развитию кардиомиопатии. В основе их повреждающего действия лежит прямое повреждение миоцитов. Введение аллогенных МСК в качестве кардиомиопротектора оказалось обнадеживающим. Животные, получившие доксорубин в суммарной дозе 5,7 мг\кг и 8,3 мг\кг и МСК как до, так и сразу после введения препарата выжили. В то же время обезьяна, не получившая экранизацию сердца с помощью МСК, погибла от дозы доксорубина 8,3 мг/кг через неделю после введения препарата. На окрашенных гематоксилином — эозином гистологических срезах сердца определялась васкуляризация и капилляризация миокарда, как следствие трансплантации МСК, что подтверждается и данными литературы [3,4,6].

Литература

1. Круглов П. В., Лохматова Е. А., Зарицкий Ф. Ю. Мезенхимальные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. //2006, № 3 (5), 36–41.

2. Лапин Б. А. Культуры лимфоидных и стволовых клеток приматов и их использование в медико-биологических исследованиях. // В кн.: *Фундаментальные прикладные исследования медицинской приматологии*. Сочи-Адлер, 2011, 12–15.
3. Романов Ю. А., Смирнов В. Н. «Мезенхимальные стволовые клетки: биология и перспективы клинического применения» // В кн.: *Биология стволовых клеток и клеточные технологии*, Москва «Медицина» «Шико» 2009, стр 193–205.
4. Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Кришенинникова М. Е. и др. «Экспериментальное обоснование эффективности применения стволовых и прогениторных клеток косного мозга для регуляции восстановительных процессов в органах при остром и хронических повреждениях». // *Вестник РАМН*, 2004, № 9, стр. 44–47 Calibri (Основной текст).
5. Niemeyer P, Szalay K, Luginbuhl R, Sydka NP, Kasten P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. // *Acta Biomater.* 2010 Mar;6 (3):900–8. Epub 2009 Sep 18.
6. Tomita S., Li R. K., Weisel R. D. et al. // *Circulation.* — 1999.-Vol.100, N19.- Suppl.-P.247–256.

Клинико-экспериментальные результаты применения клеточной терапии в кардиологической практике: современная концепция

Ахмедов Ш. Д., Евтушенко А. В., Афанасьев С. А., Попов С. В., Карпов Р. С.

НИИ кардиологии СО РАМН, г.Томск

Рандомизированными и контролируемыми клиническими испытаниями было доказано, что клеточная терапия улучшает функциональное восстановление сердца у больных ИБС после перенесённого острого инфаркта миокарда. Тем не менее, до настоящего времени отмечается противоречивость в объяснении положительных механизмов действия после проведенного клеточного лечения, а также до конца не изучены отдаленные клинические результаты у больных с хронической сердечной недостаточностью различного генеза.

В проведении клинических испытаний, которые проводились на базе НИИ кардиологии СО РАМН, можно выделить три этапа. На первом этапе исследований, с 2003 по 2005 г. г. оценивалась и обсуждалась сама ме-

тодика получения клеточного материала- аутологичные мононуклеарные клетки костного мозга (МККМ) и их внутрисердечного интраоперационно-го введения больным кардиохирургического профиля (n=35). Проводился анализ ближайших клинико-диагностических результатов лечения с помощью таких исследований, как ЭХОКГ и радионуклидных методов.

Второй этап клинической работы проходил с 2006 по 2008 г. г., и включал в себя изучение оптимального количества внутрисердечного введения самих клеток, а также способов их доставки к сердцу: интраоперационный, и внутрикоронарный в условиях ангиографического кабинета. При этом впервые с помощью радиоизотопной метки вводимых клеток был изучен хоуминг эффект- распределение клеток в организме человека после их внутрисердечного введения. Во время этого этапа исследования впервые изучалось клиническое воздействие фетальных клеток (ФК) (n=30), которые отличаются от МККМ другим фенотипом, а также по количеству и качеству к CD маркерам. Было показано, что в отдаленном послеоперационном периоде показатели внутрисердечной гемодинамики у пациентов с ишемической кардиомиопатией достоверно были лучше после лечения ФК, в сравнении с группой больных после лечения МККМ и контрольной группой (АКШ и резекция аневризмы сердца).

Третий этап клинической работы начинается с 2009 г. и продолжается по настоящее время. Он подразумевает выполнение «гибридных» операций у больных с ИБС и ДКМП. Перед операцией у больных производится забор красного костного мозга, выделение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и их культивации в условиях CO₂ инкубатора в течение 2–3 недель. Затем выполнение самой операции, где после коррекции митральной и трикуспидальной недостаточности у больных с ДКМП (n=5), либо после резекции постинфарктной аневризмы сердца внутрисердечно вводятся культивированные МСК с целью предотвращения дальнейшего патологического ремоделирования миокарда. На этом этапе исследования стоят вопросы об оценки приживаемости вводимых в миокард клеток, а также о дифференциации этих клеток в кардиомиоциты. В связи с этим проводится отдельный блок экспериментальных работ на лабораторных животных, где отрабатываются условия подготовки постинфарктноремоделированной сердечной мышцы к интрамиокардиальной трансплантации клеточного материала.

Выводы: восьмилетнее исследование показало, что использование клеточной терапии в сочетании с традиционным кардиохирургическим лечением хронической сердечной недостаточности улучшает показатели внутрисердечной гемодинамики. Для дальнейшего изучения этого направления

в эксперименте необходимо получение финансовой поддержки со стороны РАМН, а для эффективного продолжения клинических изысканий - принятие регулируемого закона Минздравсоцразвития РФ.

Введение наночастиц сложного оксида железа в цитоплазму стволовых клеток для создания нового метода диагностики и лечения патологических состояний

Науменко В. Ю.¹, Бабич А. В.², Темнов А. А.²

¹РГМУ, Москва, ул. Островитянова, д. 1

²НИИ Скорой Помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Сухаревская пл., д. 3

В предыдущих наших исследованиях была показана способность мезенхимальных стволовых клеток при введении их в организм мигрировать в зоны повышенной пролиферации и острых повреждений тканей. Исходя из этого, перспективной может оказаться разработка новых методов диагностики и лечения, основанных на использовании стволовых клеток, содержащих в своей цитоплазме наночастицы, обладающие магнитно-резонансными свойствами.

Целью данной работы являлась разработка метода маркирования стволовых клеток наночастицами сложного оксида железа для последующей их регистрации магнитно-резонансными и фотодинамическими методами, а так же проведение оценки метаболической активности стволовых клеток, содержащих исследуемые наноструктуры.

Материалы и методы. Мезенхимальные стволовые клетки выделялись из костного мозга донора, затем культивировались в присутствии суперпарамагнитных наночастиц сложного оксида железа со средним диаметром 4,8 нм в различных концентрациях в среде *dmem*. Для 5 различных концентраций наночастиц сложного оксида железа в образцах были получены данные по пролиферативной активности методом МТТ при разных временах инкубации после внесения коллоидного раствора, содержащего наноструктуры: 7 часов, 1, 2, 3, 7 и 8 дней. Присутствие наночастиц в стволовых клетках фиксировалось методами люминесцентной микроскопии при облучении УФ на длине волны 320 нм и регистрации на длине волны 520 нм и ЭПР спектроскопии в переменном магнитном поле и постоянной частоте 9,4 ГГц при падающей на объект мощности не более 5 мВт после многократного отмывания образцов раствором Хэнкса.

Результаты. Результаты эксперимента по микроскопии и ЭПР показали присутствие наночастиц в цитоплазме клеточных структур с сохранением нормальной формы клеток. Было показано, что при концентрациях наночастиц менее 0,3 г/л стволовые клетки полностью сохраняют свою метаболическую активность на протяжении 8 дней инкубации в CO₂ инкубаторе при 37° С. Работы по созданию методики продолжаются.

Возможности применения некоторых молекулярно-биологических методов для анализа мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Бигильдеев А. Е., Шипунова И. Н., Жиронкина О. А., Сац Н. В., Мамонов В. Е., Петинати Н. А., Паровичникова Е. Н., Дризе Н. И., Савченко В. Г.

*ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития,
Москва, Россия*

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) в последние годы активно изучаются в связи с их применением в клинической практике и регенеративной медицине. ММСК — гетерогенная популяция стромальных предшественников, выявляемая в культуре. Эти клетки характеризуют с помощью культуральных, иммунохимических и молекулярно-биологических методов.

При трансплантации ММСК для понимания механизмов их взаимодействия с клетками организма необходимо изучение экспрессии целого спектра генов в этих клетках. Так, для того чтобы объяснить механизмы эффективного применения ММСК в лечении и профилактике острой реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), возникающей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГКС), изучают уровень экспрессии генов, участвующих в регуляции иммунного ответа. Наиболее распространенным методом анализа является метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени. Задачей метода является определить количество мРНК исследуемых генов в ММСК. Это достигается посредством синтеза кДНК и последующей амплификацией фрагментов кДНК изучаемых генов, с одновременным количественным анализом получаемого продукта. Этим методом были выявлены, например, корреляции между экспрессией некоторых генов в ММСК доноров ГСК и эффективностью применения данных клеток для лечения острой РТПХ.

Для оценки гетерогенности культивируемых ММСК их генетически маркируют с помощью самоинактивирующегося лентивирусного векто-

ра, несущего маркерный ген зеленого флуоресцентного белка. Поскольку вирус встраивается в геном клетки в случайном месте, можно проследить за потомством каждой зараженной клетки. Для этого ММСК на каждом пассаже клонируют и определяют сайты интеграции провируса с помощью Саузерн-блот гибридизации и ПЦР, опосредованной лигированием (ОЛ-ПЦР) в каждом клоне. Метод ОЛ-ПЦР позволяет установить локусы ДНК, содержащие сайты интеграции провируса в клонах ММСК. Это дает возможность проанализировать клональный состав культуры ММСК, проследить за судьбой индивидуальных клонов в культуре по мере пассирования, а также оценить безопасность, надежность и эффективность использования данных генетических конструкций для генотерапии. Детальный анализ сайтов интеграции позволяет оценить вероятность активации протоонкогенов, что очень важно для клинического применения генетически модифицированных ММСК. Метод ОЛ-ПЦР состоит в следующем: ДНК клонов фрагментируют рестриктазой и обогащают полученную смесь фрагментами ДНК, содержащими области интеграции вектора. К обогащенной ДНК лигируют синтетический адаптер и проводят 2 стадии ПЦР со смещенными праймерами. При этом прямые праймеры комплементарны последовательности вектора, а обратные — последовательности адаптера. Далее анализируют набор продуктов ПЦР, полученный для отдельных клонов, на электрофореze, где каждая полоса соответствует одному сайту интеграции вектора. Установление нуклеотидной последовательности выделенных из геля фрагментов ДНК позволяет точно определить место интеграции провируса в геном и количество интеграций в каждом клоне.

С помощью метода ОЛ-ПЦР в нашей лаборатории было показано, что культура ММСК состоит из множества сменяющих друг друга небольших короткоживущих клонов, и большие, долгоживущие клоны с высоким пролиферативным потенциалом встречаются редко. Также были охарактеризованы сайты интеграции использованного лентивектора.

Описанные методы могут эффективно применяться для изучения свойств ММСК.

Характеристика мононуклеаров из пуповинной крови человека, сокультивированных с ММСК из жировой ткани человека при пониженном содержании кислорода

Бобылёва П. И.^{1,2}, Горностаева А. Н.¹, Андреева Е. Р.¹

¹ ГНЦ РФ ИМБП РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе 76-а;

² Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Моделирование кроветворного микроокружения костного мозга предполагает создание возможности наработки гемопоэтических предшественников, что может быть использовано в клинике для повышения эффективности трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В этой связи большое значение имеет подбор условий культивирования гемопоэтических клеток. Заменой стромы костного мозга может служить фидерный слой из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). В данной работе использовались ММСК из жировой ткани человека (жтММСК), т. к. по своим свойствам они сходны с костномозговыми ММСК и в то же время являются более доступными. Очень важным является тот факт, что концентрация кислорода в костном мозге гораздо ниже, чем в атмосфере, что может существенным образом влиять на состояние клеток.

Источником гемопоэтических предшественников в настоящей работе служила фракция мононуклеаров из пуповинной крови человека (пкМНК). В течение 2 недель проводили сокультивирование пкМНК с жтММСК в среде с атмосферным содержанием кислорода (20 % O₂, нормоксия) и в условиях пониженного содержания кислорода (5 % O₂, гипоксия).

Неприкрепленные к фидеру пкМНК после 3 дней сокультивирования с жтММСК, а также исходные, не сокультивировавшиеся клетки помещались в полужидкую среду MethoCult H4534, поддерживающую колониюобразование, и культивировались в условиях нормоксии и гипоксии. ПкМНК, содержащиеся в гипоксии, образовывали больше колоний, чем в нормоксических условиях. Соотношение количеств гемопоэтических колоний разных типов (моноцитарные: гранулоцитарные: гранулоцитарно-моноцитарные), образованных в гипоксии пкМНК после сокультивирования с жтММСК — 10: 126: 55, исходными пкМНК — 10: 75: 70; количества колоний, образованных в нормоксии пкМНК, сокультивированными с жтММСК, соотносятся как 10: 45: 90, а образованных исходными пкМНК — 10: 21: 59.

Иммунный профиль исходных пкМНК и неадгезированных к мезенхимным клеткам пкМНК после 3 суток сокультивирования определялся на проточном цитофлуориметре по протоколу «Imtuno 7». В нормоксии и гипоксии иммунный профиль пкМНК изменялся сходным образом. Общее число CD3+ клеток увеличилось, но оставалось в пределах нормы. Количественно изменился субпопуляционный состав Т-лимфоцитов: снизился процент CD3+CD16+CD56+ клеток (Т-NK), увеличилась доля CD3+/CD8+ (Т-киллеров) и CD3+/CD4+ (Т-хелперов) клеток, но для первых она по-прежнему была ниже нормы, а для вторых установилась в пределах нормы. Снизилась доля Т-клеток, экспрессирующих маркёры ранней активации CD25 и CD69, и уменьшилось содержание CD19+ клеток (В-клеток).

Доля живых и мёртвых клеток среди неадгезированных пкМНК, 3 суток сокультивировавшихся с жтММСК, определялась на проточном цитофлуориметре после окраски аннексином V и пропидий йодидом. Среди пкМНК из гипоксии процент апоптических и некротических клеток оказался ниже, чем среди пкМНК, культивировавшихся при атмосферном содержании кислорода. Доля живых пкМНК в гипоксии была выше, чем в нормоксии.

Иммуноцитохимический анализ на маркёры гемопоэтических предшественников выявил, что после 7 дней сокультивирования количество CD34+ клеток было больше в нормоксических условиях, количество CD133+ клеток не зависело от содержания кислорода, но после ещё одной недели культивирования CD34+ и CD133+ клеток в гипоксии стало больше, чем в нормоксии.

Таким образом, гипоксические условия более благоприятны для гемопоэтических предшественников, чем нормоксические, о чём свидетельствует наличие в гипоксической среде большего количества клеток, обладающих маркёрами ранних гемопоэтических, а также присутствие большего количества колониеобразующих единиц разных гемопоэтических линий дифференцировки. Культивирование в условиях пониженного содержания кислорода более благоприятствует гранулоцитарной дифференцировке гемопоэтических предшественников. При сокультивировании с жтММСК снижается доля предшественников, дающих начало гранулоцитарно-монокитарным колониям. Сокультивирование пуповинной крови с жтММСК и в условиях нормоксии, и в гипоксических условиях не приводит к активации лимфоцитов. Пониженное содержание кислорода более благоприятно для поддержания жизнеспособности пкМНК, чем нормоксия.

Влияние провоспалительного цитокина ФНО-альфа на способность мезенхимальных клеток к хоумингу в поврежденную ткань

Макаревич П. И., Болдырева М. А., Цоколаева З. И., Зубкова Е. С.,
Меньшиков М. Ю., Парфенова Е. В.

*Российский кардиологический научно-производственный комплекс,
ул. 3-я Черепковская, д.15 а, Москва, 121552*

Ведущиеся в настоящее время исследования возможности повышения эффективности клеточной терапии с использованием мезенхимальных стромальных клеток (МСК) связаны с разработкой подходов к усилению хоуминга МСК в поврежденную ткань и, поиском биологически активных агентов, усиливающих жизнеспособность клеток после их трансплантации. Фактор некроза опухолей-альфа (ФНО- α) это провоспалительный цитокин, который всегда присутствует в поврежденных тканях и оказывает влияние на экспрессию факторов инвазии и адгезии. Мы показали, что ФНО- α способен вызывать образование МСК жировой ткани (МСК ЖТ) — матриксной металлопротеиназы-9, а также активацию про-матриксной металлопротеиназы-2 с образованием низкомолекулярной активной формы фермента. Также ФНО- α усиливает инвазию МСК ЖТ через Матригель. Оценка воздействия ФНО- α на экспрессию МСК ЖТ молекул адгезии, рецепторов хемокинов и факторов роста показала, что после стимуляции процент МСК ЖТ, экспрессирующих молекулу межклеточной адгезии ICAM-1 возрастает до 100 %, экспрессия других молекул адгезии существенно не меняется, также наблюдается усиление экспрессии на уровне мРНК урокиназы, VEGF, интерлейкина-4, TBS-1, PAI-1 и HGF. Эти эффекты могут опосредоваться активацией транскрипционного фактора NF κ B и MAP-киназы p38, наблюдаемой через 15мин после стимуляции ФНО- α .

Учитывая эти данные, мы предположили, что предкультивирование МСК ЖТ в присутствии TNF- α перед трансплантацией может способствовать усилению их хоуминга. Предстимулированные, меченые мембранным флуоресцентным красителем PKH-26 МСК ЖТ вводили интрааортально мышам линии C57bl на 4 день после операции по созданию ишемии нижней конечности. Для количественной оценки хоуминга проводили подсчет меченых клеток на 3 день после введения на поперечных срезах мышц m. tibialis anterior с последующим подсчетом количества клеток на мышцу. Согласно полученным результатам предстимуляция МСК ЖТ ФНО- α способствует увеличению их хоуминга в ишемизированные мышцы в 1,5 раза. Таким образом предкультивирование с ФНО- α позволяет повысить терапевтический потенциал МСК ЖТ.

Факторы микроокружения в реализации свойств ММСК

Буравкова Л. Б.

ГНЦ РФ – ИМБП РАН, 123007, Хорошевское шоссе, 76а, Москва,
Россия buravkova@imbp.ru

Многочисленные работы указывают на то, что широкий спектр физических и химических факторов микроокружения *in vivo* определяет пластичность и гетерогенность популяций прогениторных клеток в различных тканевых нишах взрослого организма. Моделирование некоторых из этих факторов может быть использовано для модификации дифференцировочного потенциала и неспецифической субселекции этих клеток из гетерогенной популяции, получаемой при выделении из различных тканевых источников. При этом в более ранних предшественниках может запускаться транскрипционная программа дифференцировки и старения. В настоящее время можно с большой долей уверенности сказать, что контроль самоподдержания и мультипотентности стволовых клеток осуществляется при пониженном энергообеспечении, в том числе и за счет низкого уровня кислорода в среде, которое поддерживает так называемые «первичные сигнальные пути и транскрипционные факторы». Такое «базовое» ограничение позволяет стволовым клеткам успешно выживать и воспроизводиться. При этом потенциально возможные функциональные состояния стволовых клеток такие как: коммитирование, дифференцировка, специализация тормозятся. Необходимо отметить, что такое торможение развивается не по принципу «все или ничего» и является обратимым. Это еще раз подтверждает физиологичность эффектов факторов микроокружения, в том числе пониженного содержания кислорода на прогениторные клетки.

Интересным с точки зрения формирования тканевых ниш является взаимодействие стволовых клеток разного генеза и степени коммитирования между собой и с дифференцированными клетками микроокружения. Именно такое взаимодействие определяет самоподдержание прогениторных клеток и/или направление их дифференцировки. Однако механизмы и особенности такого межклеточного взаимодействия в условиях измененного содержания кислорода остаются не до конца понятными. На модели сокультивирования аллогенных прогениторных клеток показано, что в условиях пониженного содержания кислорода ММСК *in vitro* активно поддерживают гемопоэз и усиливают образование очагов кроветворения с последующей дифференцировкой гемопоэтических предшественников. При этом повышается доля стромальных клеток, экспрессирующих VCAM-1, и активируется продукция интерлейкинов (IL-6, IL-8).

В исследованиях *in vitro* показано, что ММСК обладают уникальными иммуномодулирующими свойствами, обусловленными их неиммуногенностью и способностью к подавлению пролиферации и активации лимфоцитов. При сокультивировании с ММСК происходило изменение популяционного состава иммунокомпетентных клеток за счет уменьшения доли ЕК- и ТЕК-клеток, увеличения доли CD34+клеток, а так же снижение активации Т-клеток. Понижение содержания кислорода дополнительно подавляет способность Т-клеток к презентации антигенов (HLA-DR). Анализ собственных и литературных данных указывает на то, что при межклеточном взаимодействии ММСК и различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток задействованы механизмы как контактного, так и опосредованного взаимодействия. Динамические изменения уровня цитокинов, факторов роста и кислорода создают уникальные ниши при таком взаимодействии.

Регенерация перелома трубчатой кости крыс после введения клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани

Валюшкина М. П., Логинов В. И., Андреева. Е.Р., Буравкова Л.Б.

ГНЦ РФ-ИМБП РАН, 123007, Хорошевское шоссе, 76а, Москва, Россия

В настоящее время разрабатываются новые подходы, основанные на возможности использования клеточных технологий для нужд регенеративной медицины. Это связано, в первую очередь, со значительными успехами в исследовании регенеративного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). В большинстве исследований источником этих клеток является костный мозг. Так, ранее нами была продемонстрирована эффективность использования ММСК из костного мозга крыс для ускорения ранних этапов формирования костной мозоли [Андреева и др., 2009; Буравкова и др., 2009]. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани, также содержащая ММСК (жММСК), может являться альтернативным источником стволовых клеток. Возможность применения жММСК для восстановления тканей уже была исследована ранее [Cowan et al., 2004; Masuoka et al., 2006].

Целью нашей работы было исследовать регенеративный потенциал жММСК, предкультивирование которых осуществлялось при 5% O₂ и в стандартных условиях. Клетки выделяли из подкожной жировой ткани 1,5 месячных крыс-самцов линии Вистар, как описано Wan et al. [2008]. Проведённое на втором пассаже фенотипирование показало, что получен-

ные клетки были положительны по CD90, CD54, CD73, CD44 и отрицательны по CD 45 и CD11b.

Экспериментальные животные были разделены на четыре группы по 6 особей в каждой: 1 — крысам осуществляли только перелом; 2 — в область перелома вводили 0,25 мл культуральной среды; 3 — животным в область перелома вводили по 0,25 мл культуральной среды, содержащей по 500 тысяч жММСК, культивирование которых осуществлялось в нормоксической среде (20 % O₂), а крысам 4 группы — вводили жММСК, которые во время культивирования находились в гипоксической среде с 5 % кислорода. Разрешение на проведение эксперимента получено от Комиссии ГНЦ РФ-ИМБП РАН по медицинской биоэтике физиологической секции Российского национального комитета по биоэтике. На 14 день после операции крыс выводили из эксперимента, кости извлекали, фиксировали в 10 % формалине, декальцинировали, заливали в парафин. Из приготовленных образцов готовили гистологические срезы, окрашивали гематоксилин-эозином, толуидиновым синим и пикрофуксином. Морфологический анализ срезов проводили на микроскопе Leica DMIL, а их морфометрию — при помощи программы «SigmaScanPro». При визуальном осмотре места перелома было установлено, что во всех группах сформировалась веретенообразная костная мозоль, которая достаточно прочно скрепляла дистальные костные отломки. Гистологическое исследование показало, что сращение костных отломков во всех группах шло по типу вторичного заживления с образованием фиброзно-хрящевого регенерата. Морфометрический анализ выявил достоверное превышение коэффициента утолщения костной мозоли в 3 и 4 группах животных, которое составило 1,32 и 1,26 раза сравнению с группой 1. Кроме этого, в экспериментальных группах доля площади, занятая хрящевой тканью, в 2 и более раз превышала аналогичный показатель в группах 1 и 2. Эти результаты свидетельствуют о более эффективном заживлении перелома кости при введении клеточных препаратов, т. к. фазой, характеризующей ранний этап репарации, является формирование фиброзно-хрящевого регенерата.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало эффективность введения суспензии жММСК, предварительная экспансия которых проведена *ex vivo* в условиях различного содержания кислорода, для улучшения формирования фиброзно-хрящевого регенерата на раннем этапе формирования костной мозоли при экспериментальном переломе малоберцовой кости у крыс.

Влияние ММСК на основные морфометрические показатели селезенки в физиологических условиях и при острой кровопотере

Булмага И. И., Хрущев С. А., Глуханюк Е. В.

Кафедра патологической физиологии УГМА

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), обладая уникальными свойствами и значительным потенциалом применения в клинике, являются объектом активного изучения в экспериментах как *in vivo*, так *in vitro* [1,3]. Наиболее сложными в плане изучения и, как следствие, спорными являются вопросы исследования роли ММСК при использовании их *in vivo*. В нашем исследовании мы использовали модель острой кровопотери на крысах с внутривенным введением ММСК.

Как известно, один из этапов компенсации включает в себя иммобилизацию незрелых клеток крови [3,5]. Одним из возможных направлений применения стволовых клеток является использование их при кровопотере. С этой точки зрения, весьма интересным является изучение изменения адаптационных процессов при введении ММСК при кровопотере, т. е. своеобразного их модулирующего действия на физиологический адаптационный процесс.

Цель исследования — изучение влияния ММСК на основные морфометрические показатели селезенки в физиологических условиях и при острой кровопотере.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 28 белых лабораторных крысах-самцах возраста 6–8 месяцев, массой 200–250 г. Эксперименты по получению культуры ММСК выполнены на 8 лабораторных животных крысах-самках возраста 3–4 месяца, массой 150–170 г, срок гестации 18 дней. Культивирование проводилось в условиях CO_2 инкубатора при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием углекислого газа 5 %. Смену питательной среды производили каждые 3–4 суток.

Подсчет клеток и их жизнеспособность производили в гемоцитометре (камере Горяева) с помощью 0,1 % раствора трипанового синего. Жизнеспособность полученной культуры составляла 95–97 %.

Для изучения обзорной гистологической картины и морфометрического анализа во всех сериях экспериментов для исследования производилась аутопсия селезенки. Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Заливку проводили в парафин и готовили срезы с соблюдением стро-

гой ориентации, толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван — Гизону.

Гистологические препараты селезенки анализировались с помощью микроскопа Micros MC — 50 (Австрия) при увеличении 10*15, а также с помощью морфометрической программы BioVision 2008 г. по следующим параметрам: средний диаметр лимфоидных фолликулов, расстояние между центрами фолликулов, общее содержание клеточных элементов в красной пульпе, содержание эритроидных элементов в красной пульпе и содержание лейкоцитов в красной пульпе.

Лабораторные животные были разделены на две группы. Первая группа — интактные лабораторные животные. Вторая группа — лабораторные животные, у которых была вызвана острая постгеморрагическая анемия.

В каждой группе были выделены две подгруппы: опытная и контрольная, в каждой из которых по 7 экспериментальных животных. Лабораторным животным опытной подгруппы в хвостовую вену вводились ММСК из расчета 6 млн. кл/кг, суспендированных в растворе хлорида натрия 0,9 % 0,5 мл. Лабораторным животным контрольной подгруппы в хвостовую вену вводился раствор хлорида натрия 0,9 % 0,5 мл. Массивную кровопотерю вызывали кровопусканием из хвостовой вены крысы в объеме 2 % от массы тела, что составляет 25—35 % от объема циркулирующей крови.

Результаты исследования, их обсуждение

В физиологических условиях на 5 сутки после трансплантации ММСК при определении диаметра лимфоидного фолликула, расстояния между центрами фолликулов селезенки, при подсчете апоптотического индекса клеток лимфоидных фолликулов, при подсчете общей клеточности красной пульпы, при определении содержания эритроцитов и лейкоцитов в красной пульпе не установлено достоверных отличий в опытной подгруппе относительно контроля [2, 4].

	Диаметр лимфоидного фолликула, мкм	Расстояние между центрами фолликулов, мкм	AI клеток лимфоидных фолликулов, мкм	Общая клеточность красной пульпы в 0,01мм ²	Содержание эритроцитов в красной пульпе в 0,01мм ²	Содержание лейкоцитов в красной пульпе в 0,01мм ²
NaCl	326,14±12,16	413,29±12,90	1,29±0,69	274,57±8,08	122,71±4,61	153,57±7,63
ММСК	333,43±8,94	426,43±7,96	1,57±0,65	271,14±6,41	118,57±5,92	156,43±6,65

На 5 сутки после острой постгеморрагической анемии в контрольной подгруппе при определении диаметра лимфоидных фолликулов установле-

но достоверное увеличение изучаемого показателя относительно контроля ($352,71 \pm 10,04$, $p < 0,05$). Этот эффект может быть обусловлен как повышением пролиферативной активности клеток фолликулов селезенки, так и усиленным хоумингом КОЕс в селезенку и последующим усилением экстрамедуллярного кроветворения.

При определении расстояния между центрами фолликулов, отмечено существенное увеличение сравниваемого показателя ($436,57 \pm 8,49$, $p < 0,05$) относительно интактных животных. Это увеличение обусловлено повышением клеточности красной пульпы, как за счет эритроидных элементов ($166,00 \pm 5,43$, $p < 0,05$), так и за счет клеток белой крови ($171,14 \pm 4,16$, $p < 0,05$). Выраженность апоптоза клеток лимфоидных фолликулов была существенно выше, по сравнению с контролем. Повышение запрограммированной гибели клеток может быть обусловлено выбросом в кровь гормонов первой и второй стадии стресса: катехоламинов и глюкокортикоидов соответственно.

При этом содержание лейкоцитов в красной пульпе достоверно не отличалось от сравниваемого показателя в контрольной подгруппе. Выраженность апоптоза была выше, чем в контроле, но достоверно не отличалась от аналогичного показателя в контрольной подгруппе.

	Диаметр лимфоидного фолликула, мкм	Расстояние между центрами фолликулов, мкм	АИ клеток лимфоидных фолликулов, мкм	Общая клеточность красной пульпы в $0,01\text{мм}^2$	Содержание эритроцитов в красной пульпе в $0,01\text{мм}^2$	Содержание лейкоцитов в красной пульпе в $0,01\text{мм}^2$
NaCl	$352,71 \pm 10,04$	$436,57 \pm 8,49$	$3,14 \pm 0,78$	$317,57 \pm 9,92$	$166,00 \pm 5,43$	$171,14 \pm 4,16$
ММСК	$368,57 \pm 5,06$	$449,00 \pm 12,00$	$2,43 \pm 0,78$	$334,00 \pm 7,14$	$181,14 \pm 7,02$	$169,14 \pm 5,31$

Полученные в настоящем исследовании экспериментальные данные (на 5 сут. после острой кровопотери) подтверждают и дополняют полученные ранее другими авторами (Горизонтов П. Д., Зимин Ю. И., 1976) данные о морфологических изменениях в селезенке при экстремальных воздействиях на организм. Эти изменения могут быть обусловлены как повышением пролиферативной активности клеток фолликулов селезенки, так и усиленным хоумингом КОЕс в селезенку и последующим усилением экстрамедуллярного кроветворения. Указанные изменения во многом потенцируются трансплантированными ММСК.

Выводы

1. Трансплантированные ММСК в физиологических условиях не приводят к изменению размеров фолликулов селезенки, не влияют на меж-

- фолликулярное пространство, запрограммированную гибель клеток в фолликулах селезенки, общую клеточность красной пульпы, а также на содержание эритроцитов и клеток белой крови в красной пульпе.
2. Трансплантированные ММСК при острой постгеморрагической анемии не приводят к изменению размеров межфолликулярного пространства, выраженности апоптоза, общей клеточности красной пульпы, содержания лейкоцитов в красной пульпе.
 3. Трансплантированные ММСК при острой постгеморрагической анемии вызывают увеличение размеров фолликулов селезенки, а также повышение содержания эритроидных элементов в красной пульпе.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Волков А. В. Использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга для стимуляции регенерации. Материалы Artif Organs, 2004 год.
2. Горизонтов П. Д., Белоусова О. И., Федотова М. И. Восстановление лимфоидной ткани у крыс в различных органах после однократного гамма облучения. М., 2001 год.
3. Murphy Martin J., Brian I. Lord. Hematopoietic stem cell Regulation. 1999 год.
4. Huang Weitao. Интерлейкин-17 А: фактор роста Т-клеточного происхождения мезенхимальных стволовых клеток человека и мыши. Журн. «Физико — химическая биология: молекулярная и клеточная иммунология» 2008 № 9.
5. Литвицкий П. Ф. Патолофизиология. -М.: ГЭОТАР МЕД, 2002.

Пролиферативная активность и жизнеспособность лимфоцитов, сокультивируемых с ММСК при различном напряжении O_2

Горностаева А. Н., Андреева Е. Р., Буравкова Л. Б.

Учреждение РАН РФ Государственный научный центр Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе 76-а

Известно, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) оказывают иммуносупрессивное воздействие на иммунокомпетентные клетки, в частности наблюдается подавление активации и пролиферации.

Учитывая, что взаимодействие ММСК с клетками иммунной системы

может происходить как при достаточно высоком напряжении кислорода, например, в системном кровотоке, так и при пониженном парциальном давлении O_2 в тканях-мишенях, представляется интересным проследить изменяется ли супрессивный эффект ММСК в зависимости от напряжения кислорода.

Известно, что пониженном содержании O_2 в среде культивирования увеличивается пролиферативная активность и замедляется дифференцировка ММСК (Буравкова Л. Б. и др., 2009; Grayson W.L. et al, 2007; Fehrer C. et al, 2007). Поэтому, вполне логично предположить, что гипоксия может оказывать влияние и на исход межклеточного взаимодействия между ММСК и иммунокомпетентными клетками.

Целью нашего исследования было изучить влияние ММСК на пролиферацию и жизнеспособность иммунокомпетентных клеток при разном напряжении кислорода (5 % и 20 % O_2). Были изучены эффекты сокультивирования ММСК и иммунокомпетентных клеток в модели смешанной культуры, представляющей собой вариант возможного взаимодействия лимфоцитов реципиента и ММСК при их использовании *in vivo*. Долю пролиферирующих клеток (пролиферативный индекс) ФГА-активированных лимфоцитов оценивали через 72 часа культивирования в смешанной культуре и культуре лимфоцитов при 20 и 5 % O_2 . Данные экспериментов по культивированию в смешанной культуре представляли в виде соотношения пролиферативных индексов Т-клеток и Т-клеток+ММСК.

Оказалось, что пролиферативный индекс Т-клеток был меньше в смешанной культуре, по сравнению с контролем, в среднем в три раза. Этот показатель не отличался при культивировании в среде с разным напряжением O_2 (3,2 для 20 % и 2,8 для 5 %, соответственно). При культивировании лимфоцитов в условиях пониженного напряжения кислорода доля живых клеток не изменилась по сравнению с лимфоцитами, которые находились при 20 % кислорода. Сокультивирование с ММСК также не влияло на жизнеспособность при различном содержании O_2 . Таким образом, способность ММСК эффективно подавлять пролиферацию активированных лимфоцитов не зависит от содержания O_2 .

Эти данные позволяют предположить, что низкая концентрация O_2 в тканях не будет влиять на иммуносупрессивные свойства ММСК, что имеет большое значение для успешного применения ММСК в регенеративной медицине. Кроме того, степень и характер проявления иммуносупрессивного эффекта зависит как от донора ММСК, так и от донора лимфоцитов. Поэтому использованию клеточных препаратов ММСК *in vivo* должно предшествовать исследование взаимодействия клеток донора и реципиента *in vitro*.

Изменение миграционных характеристик стромальных клеток жировой ткани в воспалительном окружении

Григорьева О. А., Коровина И. В., Рубина К. А., Калинина Н. И.,
Сысоева В. Ю.

*Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова,
Москва, 119192, Ломоносовский пр., дом 31, корп. 5*

Мезенхимальные стромальные клетки присутствуют во всех органах и тканях, включая костный мозг, мышечную ткань, печень, кожу и жировую ткань. В условиях повреждения ткани мезенхимальные клетки играют важную роль в процессах репарации, при этом механизмы их активации и действия до конца не выяснены. Репаративные эффекты мезенхимальных клеток во многом обусловлены широким спектром выделяемых ими факторов, которые включают ангиогенные и нейрогенные цитокины, а также многие хемокины. Однако воспаление, развивающееся после повреждения ткани, может служить одной из причин изменения характеристик мезенхимальных клеток, ведущего к их миграции в поврежденную область и участию в процессах восстановления ткани.

Для изучения механизмов активации мезенхимальных клеток разработана модель *in vitro* совместного культивирования стромальных клеток жировой ткани человека (СКЖТ) и промоноцитарной линии клеток ТНР-1, дифференцированных в макрофаги.

Ранее обнаружено, что при моделировании условий воспаления наблюдается изменение профиля экспрессии генов хемокинов и их рецепторов стромальными клетками жировой ткани: выявлена группа хемокинов, экспрессия которых возрастала в 20 и более раз (CCL1, CCL3, CCL5, CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6). Для группы рецепторов хемокинов, регулирующих миграцию — CCR7, CXCR3, CXCR4, CX3CR1 обнаружено увеличение экспрессии более чем в 4 раза. Кроме того, экспрессия матриксных металлопротеиназ 2 и 7 типа также возрастала более чем в 3 раза. Анализ изменения экспрессии хемокинов, цитокинов и их рецепторов был проведен методом RT-PCR с использованием PCR Array Systems.

В настоящей работе обнаружено, что изменение экспрессионной активности в отношении MMP и рецепторов к хемокинам сопровождается изменением морфологи МСК в сторону миграторного фенотипа. С помощью иммуноцитохимической окраски проведена оценка изменения организации цитоскелета. Обнаружено изменение организации микрофиламентов и микротрубочек в описанных условиях.

При исследовании изменения скорости миграции клеток в среде, кондиционированной активированными макрофагами, возрастает подвижность МСК. На модели направленной миграции в системе xCELLigence показано, что в провоспалительных условиях направленная миграция МСК также увеличивается.

Зависимость количества c-kit+ резидентных стволовых клеток сердца от клинических характеристик больных ишемической болезнью сердца

Дергилев К. В.¹, Рубина К. А.², Сысоева В. Ю.², Акчурин Р. С.¹, Парфенова Е. В.^{1,2}

¹Российский кардиологический научно-производственный комплекс

²Кафедра биохимии и молекулярной медицины, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М. В. Ломоносова

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из лидирующих причин смертности населения развитых стран. В связи с этим, разработка новых подходов для лечения этого заболевания, направленных на восстановление клеток миокарда и поддержание насосной функции сердца, имеет важное практическое значение. В последние годы внимание исследователей обращено на резидентные стволовые клетки сердца (СКС), которые способны дифференцироваться в кардиомиоциты, клетки сосудов *in vitro* и *in vivo*, а при трансплантации после инфаркта миокарда у животных, способны поддерживать сократительную функцию сердца.

Применение методов эксплантной культуры и иммуномагнитной селекции позволяет получить обогащенную культуру c-kit+ резидентных СКС из образцов миокарда (ушко правого предсердия) пациентов с ИБС. Полученные СКС обладают клоногенностью, экспрессируют гены плюрипотентности (Oct4, Sox2, Klf4, C-myc, Nanog) и способны к дифференцировке в кардиомиоциты и клетки сосудов после культивирования в дифференцировочной среде. Однако клинические характеристики пациентов могут оказывать влияние на количество c-kit+ резидентных СКС, что определяет успешность их выделения и культивирования. С помощью проточной цитофлуориметрии было выполнено сопоставление количества c-kit+ СКС в 50 образцах ушка предсердия с полом, возрастом, факторами риска ИБС, выраженностью коронарного атеросклероза, наличием сердечной недостаточности. Обнаружено, что количество c-kit+ СКС достоверно

выше у женщин до 60 лет, чем у женщин более старшего возраста и у мужчин обеих возрастных групп. Была выявлена зависимость количества СКС от числа пораженных коронарных артерий и от передне-заднего размера левого предсердия. Многофакторный анализ не выявил каких-либо связей между количеством СКС в миокарде ушка предсердия и массой тела, курением, наличием артериальной гипертонии, сахарного диабета, сердечной недостаточности, нарушений липидного обмена, гипергликемией, фракцией выброса левого желудочка.

Таким образом, в ушке правого предсердия содержатся резидентные c-kit⁺ СКС и их количество зависит от клинических характеристик пациентов.

Ангиогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани пациентов с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа

Джояшвили Н. А.¹, Ефименко А. Ю.¹, Старостина Е. Е.¹, Калинина Н. И.¹,
Королев С. В.², Акчурин Р. С.², Ткачук В. А.^{1,2}, Парфенова Е. В.^{1,2}

¹ Кафедра биохимии и молекулярной медицины, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М. В. Ломоносова

² Российский кардиологический научно-производственный комплекс

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является ведущей причиной развития сердечной недостаточности и высокой смертности во всем мире. Очевидно, что пациенты с сахарным диабетом 2 типа (СД2) имеют повышенный риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Традиционные методы лечения пациентов с ИБС, особенно в сочетании с СД2, часто оказываются неэффективными. В рамках развития новых подходов лечения представляет интерес изучение ангиогенного потенциала мезенхимальных стромальных клеток (МСК) пациентов с ИБС и СД2. Полученные данные необходимы для решения вопроса влияния патологии на ангиогенные свойства МСК, а также оценки безопасности и эффективности терапии с помощью аутологичных МСК пациентов с ИБС и СД2.

МЕТОДЫ: В работе изучали ангиогенный потенциал МСК подкожной жировой ткани, получаемой в ходе операции аорто-коронарного шунтирования и операции протезирования тазобедренного сустава. Пациенты были разделены на группы: контрольная (n=18), пациенты с ИБС (n=27), пациенты с ИБС и СД2 (n=10). Для оценки ангиогенного потенциала *in vitro* использовали метод формирования капилляроподобных структур эндотелиальными клетками (ЭК) линии EA. Hy926 на поверхности матриге-

ля. Результаты соотносили с данными экспрессии мРНК проангиогенных (VEGF, PlGF, HGF, bFGF, ангиогенина) и антиангиогенных факторов (эндостатина, тромбоспондина, PAI-1) (PCR-RT), а также с их концентрацией в среде культивирования (ELISA).

РЕЗУЛЬТАТЫ: Было показано, что способность ЭК формировать капиллярноподобные структуры снижена в среде культивирования МСК от пациентов двух групп: ИБС и с ИБС в сочетании с СД2 по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). В этих группах наблюдали как увеличение экспрессии мРНК PlGF ($p < 0,01$), так и содержание VEGF, PlGF и HGF в среде культивирования МСК ($p < 0,05$). Для ингибиторов ангиогенеза отмечали увеличение уровня экспрессии мРНК эндостатина и PAI-1 в группах с ИБС и с ИБС в сочетании с СД2 и повышение экспрессии мРНК тромбоспондина-1 в группе пациентов с ИБС. В среде культивирования МСК обнаружено увеличение концентрации PAI-1 для пациентов с ИБС по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

ВЫВОДЫ: Несмотря на увеличение секреции некоторых проангиогенных факторов, снижение способности ЭК формировать капиллярноподобные структуры в среде культивирования МСК от пациентов как с ИБС, так и с ИБС в сочетании с СД2, вероятно, связано с нарушением баланса между про- и антиангиогенными факторами. Результаты работы указывают на необходимость дополнительного анализа корреляции между этими факторами и изучения ангиогенного потенциала МСК *in vivo* на модели подкожных имплантов матригеля у мышей линии Nude.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК)

Шипунова И. Н., Бигильдеев А. Е., Жиронкина О. А., Сац Н. В., Дризе Н. И.

*ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития,
Москва, Россия*

По определению взрослые тканевые стволовые клетки должны обладать способностью к дифференцировке во все клеточные линии данной ткани и к самоподдержанию. В последнее десятилетие особое внимание уделяют мезенхимным стволовым клеткам (МСК). Способность к самоподдержанию человеческих, в отличие от мышинных, МСК не была доказана. В связи с этим международное общество по клеточной терапии договорилось называть эти клетки не стволовыми, а мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК).

Целью данной работы было изучение способности МСК из костного мозга мыши и ММСК, выделенных из костного мозга человека, к самоподдержанию и установлению иерархии в отделе этих клеток-предшественников.

Очевидно, что для определения самоподдержания или, точнее, пролиферативного потенциала (ПП) необходимо было проанализировать индивидуальные клоны МСК, ММСК и их потомков. Для четкого выявления клонов клетки-предшественники маркировали с помощью самоинактивирующегося лентивирусного вектора IV поколения, несущего маркерный ген зеленого белка. МСК мыши маркировали в подслое длительной культуры костного мозга (ДККМ), а ММСК человека — через сутки после первого пассажа.

Способность маркированных МСК к самоподдержанию изучали методом образования очага эктопического кроветворения. Подслои ДККМ имплантировали под капсулу почки сингенных реципиентов. Образованные очаги эктопического кроветворения ретрансплантировали последовательно 4 раза. При каждой ретрансплантации в образованном очаге эктопического кроветворения определяли присутствие маркированных потомков МСК — колониеобразующих единиц фибробластных (КОЕф) — с помощью метода ПЦР.

Маркированные культивируемые ММСК на каждом пассаже клонировали по 1 клетке. Изучали эффективность клонирования, время роста и размер клонов, образованных ММСК. Анализировали способность клонов к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях, используя стандартные дифференцировочные среды. С помощью метода полимеразной цепной реакции, опосредованной лигированием, анализировали индивидуальные сайты интеграции провируса в ММСК.

Показано, что маркированные МСК мыши способны к построению кроветворного микроокружения (КрМ) *de novo* по крайней мере 5 раз, т.е. способны к самоподдержанию. По мере ретрансплантаций в образованных МСК очагах эктопического кроветворения изменяется соотношение КОЕф с различным пролиферативным потенциалом (ПП). Кроме того, с каждым новым переносом КрМ увеличивается концентрация и количество КОЕф в очагах, при этом существенно меняется их ПП. Выявлены взаимосвязи между изменениями в составе КОЕф и уровнем экспрессии различных генов (*Anprr1*, *Vmp2*, *Vmp7*, *Csf3*, *Icam1*, *Kitl*, *Lif*, *Rhoa*, *Mitf*, *Mcam*, *Mmp2*). Полученные данные впервые демонстрируют, как наличие иерархии в отделе МСК, так и изменение их свойств при последовательных переносах КрМ.

Популяция ММСК также оказалась гетерогенной. Более 70 % ММСК не способны к делению, и только 8 % пролиферирующих ММСК обладает высоким ПП. При пассировании *in vitro* ММСК образуют множество сменяющих друг друга клонов с различным ПП. Клоны с очень высоким, но лимитированным ПП встречаются крайне редко, что можно объяснить низкой концентрацией истинных МСК в костном мозге человека.

МСК обладают высоким ПП, однако, при индукции МСК к пролиферации происходят изменения в составе их потомков. Среди ММСК достаточно редко наблюдаются клетки с высоким, но лимитированным ПП. Взаимоотношения между МСК и ММСК предстоит выявить, так как до настоящего времени не удается проанализировать эти 2 категории стромальных предшественников в одном организме.

Роль транскрипционного фактора *Prep1* в адипогенезе

Егоров А. Д.¹, Пеньков Д. Н.²

¹ *Лаборатория генных и клеточных технологий в медицине, факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, 119192, д.31–5, Ломоносовский проспект, Москва, Россия*

² *Лаборатория молекулярной эндокринологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения и социального развития РФ, 121552, д.15А, 3-я Черепковская ул., Москва, Россия*

Транскрипционный каскад дифференцировки клеток жировой ткани является объектом пристального внимания многих исследователей, поскольку ожирение и сопряженные с ним патологии, в том числе метаболические нарушения (синдром резистентности к инсулину и диабет 2-го типа) становятся все более распространенными в развитых странах.

Мы исследовали изменения, к которым приводит подавление экспрессии гена *prep1* в клетках линии преадипоцитов мыши 3T3-L1. Для подавления экспрессии использовалась интерферирующая короткая шпилькообразующая РНК (*shRNA*).

Анализ окрашенных липофильным агентом Nile Red клеток на 7 день после индукции дифференцировки выявил более чем 10-кратное увеличение количества адипоцитов (Nile Red+ клеток). При цитофлуориметрическом исследовании уровня апоптоза клеток (окрашивание аннексином V и 7-аминоактиномицином D) было показано увеличение апоптотических

клеток на 80 % при подавлении экспрессии *Prgp1*. Цитофлуориметрический анализ по методу накопления бромдезоксисуридина не выявил существенных изменений структуры клеточного цикла. Исследование экспрессии важных для адипогенной дифференцировки генов выявил увеличение количества транскриптов *PPAR γ 1*, *PPAR γ 2*, *C/EBP α* и *Glut4*. В результате биоинформатического анализа было выявлено 15 потенциальных генов-мишеней транскрипционного фактора *Prgp1*, в частности один из основных репрессоров транскрипции адипоцит-специфических генов *FoxO1*. Методом гель-ретардации было показано связывание *Prgp1* с участком регуляторной последовательности гена *foxo1*. Специфичность связывания *Prgp1* была подтверждена с помощью антитела anti-*Prgp1*.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что *Prgp1* является репрессором адипогенной дифференцировки преадипоцитов. Высказано предположение, что *foxo1* является геном-мишенью *Prgp1* в транскрипционном каскаде адипогенной дифференцировки.

Влияние возраста пациентов на ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

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

Контакты первого автора: Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Ломоносовский пр., 31/5, тел. 89166773257, e-mail: efimenkoan@gmail.com

Ключевые слова: клеточная терапия, мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, терапевтический ангиогенез, старение.

Актуальность проблемы. Сердечно-сосудистые заболевания, в том числе ишемическая болезнь сердца (ИБС), занимают первое место в структуре причин смертности в большинстве стран, несмотря на значительный прогресс в развитии медикаментозных методов лечения и хирургической и эндоваскулярной реваскуляризации. Одним из перспективных подходов к их лечению является терапевтический ангиогенез, основанный на введении в ишемизированные ткани генетических конструкций с генами факторов роста или стволовых/прогениторных клеток. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из костного мозга или жировой ткани (МСК-ЖТ), считаются перспективным инструментом для терапевтического ангиогенеза благодаря своей способности стимулировать рост крове-

носных сосудов, в частности путем секреции ангиогенных факторов роста. Причем МСК-ЖТ, обладающие теми же свойствами, что и МСК костного мозга, значительно легче получить в достаточно большом количестве при малоинвазивной процедуре ограниченной липосакции. На моделях ишемии конечностей и миокарда у животных показано, что локальное и системное введение МСК-ЖТ способствует увеличению количества сосудов в тканях с нарушенным кровоснабжением и улучшению перфузии тканей кровью.

Хотя МСК-ЖТ уже используются в ранних фазах клинических исследований по клеточной терапии заболеваний ишемического генеза, их свойства у больных с этими заболеваниями практически не изучены. Подавляющее большинство результатов, касающихся ангиогенных и регенеративных свойств МСК-ЖТ человека, получено на клетках, выделенных из жировой ткани относительно здоровых молодых доноров. В то же время известно, что старение и само заболевание может оказывать негативное влияние на состояние МСК. В единичных работах показано, что при старении снижается пролиферативный потенциал МСК-ЖТ и их способность к дифференцировке, а также ухудшаются их ангиогенные свойства: снижается продукция фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и способность формировать тубулярные структуры на Матригеле. Поскольку МСК входят в состав сосудистой стенки и принимают участие в процессах ее репарации при повреждении, изменения, происходящие с ними при старении, могут являться важным патогенетическим фактором заболеваний, ассоциированных с возрастом, включая атеросклероз, сахарный диабет и артериальную гипертензию. Изменения свойств МСК, в том числе их способности стимулировать рост сосудов, могут снижать эффективность аутологической клеточной терапии у пожилых пациентов с ИБС или хронической ишемией нижней конечностей — наиболее вероятных кандидатов для клеточной терапии. Для повышения эффективности клеточной терапии собственными клетками пациента, а также для разработки методов стимуляции эндогенных регенеративных процессов необходимо изучение молекулярных механизмов, обуславливающих снижение терапевтических свойств клеток, в частности, их способности стимулировать васкуляризацию ишемизированных тканей.

Таким образом, целью нашей работы было оценить влияние возраста на ангиогенные свойства МСК-ЖТ пациентов без кардиологических заболеваний и больных ИБС.

Материалы и методы. В исследование были включены 62 пациента, у которых были выделены образцы подкожной жировой ткани в ходе хирургических операций. В первую группу (n=31) вошли пациенты без кардиологических заболеваний, а во вторую (n=31) — пациенты с ИБС,

стенозирующим коронарным атеросклерозом по данным коронароангиографии, стабильной стенокардией II–III функционального класса, которым проводилось аортокоронарное шунтирование. Пациенты были разделены на подгруппы по возрасту. В первой группе пациентов, условно обозначенной нами как пациенты без ИБС, выделяли детей 2–12 лет (средний возраст $7,3 \pm 5,4$ лет, $n=4$), пациентов 35–55 лет (средний возраст $42,3 \pm 7,1$ лет, $n=14$) и пациентов старше 60 лет (средний возраст $66,2 \pm 6,8$ лет, $n=13$), а во второй группе пациентов с ИБС — больных в возрасте 44–48 лет (средний возраст $46,0 \pm 1,67$ лет, $n=6$), 52–58 лет (средний возраст $55,4 \pm 1,9$ лет, $n=10$) и старше 60 лет (средний возраст $68,9 \pm 4,2$ лет, $n=15$). По основным клинико-anamnestическим признакам, а именно по полу, индексу массы тела, функциональному классу стенокардии, частоте инфаркта миокарда в анамнезе, наличию ожирения, артериальной гипертензии, сахарного диабета 2 типа и нарушения толерантности к глюкозе, дислипидемии подгруппы больных ИБС разного возраста статистически значимо не различались между собой.

МСК из жировой ткани выделяли с помощью ферментативной обработки и культивировали клетки до 2 пассажа. Оценивали иммунофенотип клеток методом проточной цитофлуорометрии, их способность к адипогенной и остеогенной дифференцировке, активность пролиферации с помощью окраски CFSE и относительную длину теломер методом ПЦР в реальном времени. Определяли содержание ангиогенных факторов в среде культивирования МСК-ЖТ методом иммуноферментного анализа, а также ангиогенную активность суммарных продуктов секреции клеток на модели образования капилляроподобных структур эндотелиальными клетками линии EA.hy926 на Матригеле. Оценивали содержание мРНК ангиогенных факторов в МСК-ЖТ методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Культивированные МСК-ЖТ представляли собой популяцию CD90+/CD73+/CD105+/CD45-/CD31- клеток, и иммунофенотип клеток не различался у пациентов из разных возрастных групп. МСК-ЖТ как молодых, так и пожилых пациентов были способны к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях в соответствующих индукционных средах роста. Мы обнаружили, что в МСК-ЖТ пожилых пациентов как с ИБС, так и без нее были укорочены теломеры (корреляция между средней длиной теломер в клетках и возрастом пациентов $r = -0,6$, $p=0,01$ и $r = -0,47$, $p=0,03$, соответственно), а количество активно делящихся клеток (прошедших более 10 делений за 5 дней) в популяции было в 3,6 раз меньше по сравнению с МСК-ЖТ более молодых пациентов ($p = 0,07$). В подгруппах пациентов старше 60 лет средняя длина теломер в МСК-

ЖТ больных ИБС была значительно снижена по сравнению со средней длиной теломер в клетках пациентов без ИБС той же возрастной группы ($p = 0,01$).

Ангиогенная активность суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ снижалась с возрастом пациентов ($r = -0,68$, $p=0,001$ для пациентов без ИБС и $r = -0,53$, $p=0,03$ для больных ИБС). Блокирование VEGF в кондиционированной среде приводило к подавлению ангиогенной активности суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ в среднем на 57 %, и степень подавления была тем меньше, чем короче теломеры в клетках.

Содержание проангиогенных факторов было снижено в среде культивирования МСК-ЖТ пожилых пациентов. Так, мы наблюдали обратные корреляционные связи между содержанием ангиогенина, VEGF, плацентарного фактора роста (PlGF), фактора роста гепатоцитов (HGF) и ангиопоэтина-1 (Angpt1) и возрастом пациентов как в группе больных ИБС, так и пациентов без кардиологических заболеваний (Табл.). При этом мы обнаружили статистически значимое снижение содержания мРНК PlGF и HGF в МСК-ЖТ пациентов старшего возраста из обеих групп, в то время как содержание мРНК других про- и антиангиогенных факторов с возрастом изменялось незначительно.

Коэффициенты корреляции между содержанием ангиогенных факторов роста в среде культивирования МСК-ЖТ и возрастом пациентов

Ангиогенные факторы	Пациенты без ИБС	Пациенты с ИБС
Ангиогенин	$r = -0,66$, $p=0,005$	$r = -0,72$, $p=0,001$
VEGF	$r = -0,42$, $p=0,02$	$r = -0,37$, $p=0,09$
PlGF	$r = -0,59$, $p=0,01$	$r = -0,59$, $p=0,04$
HGF	$r = -0,59$, $p=0,03$	$r = -0,44$, $p=0,07$
Angpt1	$r = -0,38$, $p=0,11$	$r = -0,40$, $p=0,09$

Выводы. МСК-ЖТ, полученные от пациентов разного возраста, не различаются по иммунофенотипу, способности к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях и пролиферативной активности, однако доля активно делящихся клеток и средняя длина теломер в МСК-ЖТ уменьшаются с возрастом пациентов, что особенно выражено у больных ИБС и может свидетельствовать об ускоренном клеточном старении при данном заболевании. Секреция проангиогенных факторов (VEGF, PlGF, HGF, ангиопоэтина-1 и ангиогенина), а также ангиогенная активность суммарных продуктов секреции МСК-ЖТ снижаются с возрастом,

как у пациентов без кардиологических заболеваний, так и у больных ИБС, что сопровождается снижением содержания мРНК PIGF и HGF, но не других ангиогенных факторов. Полученные результаты позволяют предполагать более низкую эффективность терапевтического ангиогенеза при использовании собственных МСК-ЖТ у пожилых пациентов и указывают на необходимость разработки методов предтрансплантационной модификации этих клеток, направленной на усиление их способности стимулировать рост кровеносных сосудов.

Альфа-фетопроtein способствует усилению проангиогенных свойств стромальных клеток жировой ткани

Зубкова Е. С.¹, Меньшиков М. Ю.¹, Семенкова Л. Н.², Дудич И. В.²,
Хромых Л. Ю.¹, Парфенова Е. В.¹

¹Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва

²Институт инженерной иммунологии, пос. Любучаны

³Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина, Москва

Альфа-фетопроtein (АФП) известен как онкофетальный белок с регуляторной и иммуносупрессивной активностью. В норме АФП синтезируется в основном в период эмбрионального развития. Показано, что при раковых заболеваниях его экспрессия коррелирует с высокой степенью васкуляризации опухоли. Важным условием развития опухоли является взаимодействие злокачественных и стромальных клеток, опосредуемое формированием межклеточных контактов и секрецией растворимых факторов. Поскольку недавно была установлена важная роль стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) в развитии АФП-продуцирующих злокачественных опухолей простаты и молочной железы, мы исследовали воздействия АФП на пролиферативную и секреторную активность СКЖТ. Мы показали, что ФИТЦ-меченый АФП интернализуется в СКЖТ в течение 1 часа и его поглощение ингибируется предварительной обработкой клеток хлорпромазином, что предполагает клатрин-опосредованный эндоцитоз. Мы также наблюдали слабый пролиферативный эффект АФП на СКЖТ, сопровождаемый активацией МАП-киназ ERK1, 2, но на способность СКЖТ к адипоцитарной, остеогенной и эндотелиальной дифференцировке АФП влияния не оказывает. Анализ экспрессии ангиогенных факторов показал, что в стимулированных АФП СКЖТ увеличивается экспрессия VEGF-A. Поскольку VEGF-A является хорошо известным фактором ангиогенеза, мы предполагаем, что АФП может способствовать васкуляризации

опухолей стимулируя пролиферацию стромальных клеток и экспрессию ими проангиогенных факторов.

Создание мультипотентной регенерационной микроткани человека на базе эпителио-мезенхимальных сфероидов аутологичных МСК

Сабурина И.Н., Кошелева Н.В., Горкун А.А., Зурина И. М.,
Пулин А.А., Репин В.С.

У РАМН НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

Как известно, трудности лечения многих возрастных заболеваний человека связаны с ограниченным потенциалом регенерации органов и тканей, плохим новообразованием регенерационной ткани, несмотря на сохранность пула системных и региональных стволовых и прогениторных клеток.

Наше предыдущее исследование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека и животных из костного мозга и пупочного канатика в 3D культуре показало пластичность эпителио-мезенхимальных (ЭМ) сфероидов. Целью настоящего исследования стало сравнительное изучение сфероидов из различных источников. Была изучена динамика роста сфероидов из МСК костного мозга, жировой ткани, стромы пупочного канатика и букального эпителия в высокой плотности. Образование сфероидов характеризовалось сходной динамикой формирования: через 6 часов 3D культивирования клетки объединялись в рыхлые агрегаты, которые через сутки образовывали плотные сфероиды с гладким и ровным поверхностным слоем.

Проведенное иммуногистохимическое и морфофункциональное исследование показало, что в ЭМ сфероидах из вышеперечисленных источников поверхностные клетки имели эпителиальный фенотип и активно экспрессировали ламинин и фибронектин. Отдельные поверхностные клетки экспрессировали нестин, цитокератин 19 и коллаген IV типа. Это указывает на перепрограммирование эпигенома клеток сформировавшихся сфероидов и активацией генов энто-экто-нейро-мезодермы. При добавлении соответствующих локальных индукторов органогенеза/дифференцировки клетки ЭМ сфероидов дифференцировались в гепатоциты, нейральные или мышечные клетки.

Предварительная индукция ЭМ сфероидов из костного мозга и пупочного канатика в ангиогенном направлении приводила к формированию сосудов. Методом иммуноцитохимического анализа было показано, что отдельные клетки сфероидов экспрессировали CD31 — маркер васкулогенеза.

При помещении сфероидов в коллаген, выселяющиеся клетки формировали в геле капилляроподобные структуры

При серийном выращивании ЭМ сфероидов в суспензионной культуре в режиме высокой плотности наблюдалось упорядоченное слияние растущих сфероидов в однородную ЭМ микроткань. Новообразованные ЭМ сфероиды были наделены не только высокой способностью к слиянию с гомологичными сфероидами, но активно взаимодействовали с клетками и сфероидами другого происхождения с образованием химерной микроткани. Химерные жизнеспособные сфероиды формировались как при сокультивировании ксеногенных сфероидов, полученных из клеток культуры одного зародышевого листка (стромальных клеток пупочного канатика (СКПК) человека и стромальных клеток подкожной жировой ткани мыши), так и при сокультивировании ксеногенных сфероидов из клеточных культур, принадлежащих различным зародышевым листкам (СКПК человека и нейральных стволовых/прогениторных клеток мыши).

Процесс сфероидогенеза при 3D культивировании дает возможность изучать гистогенез и репаративный морфогенез в условиях более близких к *in vivo*, а также показывает, что из повторяющихся модулей плотно упакованных в слившихся сфероидах мультипотентных клеток фактически можно будет получать новую васкуляризованную высокоэффективную регенерационную ткань.

Интерлейкин-17 повышает регенеративный потенциал мезенхимальных стволовых клеток

Иванова Д. П., Калинина Н. И., Ткачук В. А.

Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М. В. Ломоносова

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются важнейшими участниками регенерации тканей, прежде всего благодаря своей способности стимулировать рост и стабилизацию кровеносных сосудов. Однако молекулярные механизмы, обуславливающие активацию МСК в участках повреждения, остаются мало изученными. Наиболее вероятными активаторами МСК являются лейкоциты, среди которых особую роль играют клетки, появляющиеся при длительном или хроническом повреждении, для которых характерна продукция интерлейкина-17. Целью данной работы было проанализировать влияние интерлейкина-17 на МСК. Генное профилирование с помощью транскрипционных матриц показало, что в ответ

на интерлейкин-17 экспрессия генов в МСК меняется слабо. Неожиданно, одним из наиболее выраженных изменений оказалось повышение экспрессии PDGF-BB. Более того, в ответ на интерлейкин-17 также повышалась секреция этого фактора в среду культивирования. PDGF-BB играет роль основного фактора, опосредующего влияние МСК на стабилизацию растущих кровеносных сосудов. Кроме того, этот белок является хемоаттрактантом для самих МСК, а также вызывает в этих клетках выраженное изменение экспрессии широкого спектра цитокинов, участвующих в процессах воспаления и ремоделирования тканей. Полученные данные указывают на то, что интерлейкин-17 может стимулировать регенеративный потенциал МСК посредством активации экспрессии и секреции PDGF-BB.

Культивирование мезенхимальных клеток пуповинной крови человека и сравнение их свойств с мезенхимальными клетками костного мозга человека

Айзенштадт А. А.¹, Кананыхина Е. Ю.¹, Климович В. Б.², Смолянинов А. Б.¹

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

²Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, Россия

Контакты: 199106, Санкт-Петербург, Большой пр-т В.О., 85, тел. (812) 777-02-06, e-mail: jenua2000@hotmail.ru

Мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) являются предшественниками большинства тканей человека, и могут быть успешно применены при лечении и профилактике таких тяжелых заболеваний как инфаркт миокарда, сахарный диабет, печеночная недостаточность, кардиомиопатии, различные аутоиммунные заболевания. Одним из наиболее перспективных источников ММСК на данный момент является пуповинная кровь (ПК).

Целью данного исследования была разработка наиболее эффективного способа культивирования ММСК ПК, а также сравнение свойств полученных культур с ММСК костного мозга человека.

Нами были подобраны оптимальные условия для культивирования ММСК пуповинной крови и костного мозга человека, обеспечивающие поддержание их максимальной жизнеспособности и пролиферативной активности. Образцы костного мозга были получены при аспирации подвздошной кости доноров при наличии информированного согласия, образцы пуповинной крови были получены из Регистра образцов пуповинной

крови Покровского банка стволовых клеток при наличии информированного согласия. Первый пересев культуры ММСК ПК проводили через 14–18 суток после эксплантации, далее культуру пересевали каждые 5–7 суток с исходной плотностью $1,3 \times 10^3$ клеток/см². Контроль качества культуры включал в себя кариотипирование, а также иммунофенотипирование методом проточной цитофлуорометрии. После каждого пассажа культуральную кондиционную среду проверяли на стерильность и наличие *Mycoplasma sp.* Для анализа иммуносупрессивных свойств культуры ММСК ПК и КМ сокультивировали со стимулированными, мечеными CFSE, лимфоцитами периферической крови здоровых доноров, а также с линией множественной миеломы человека U-266, конститутивно продуцирующей IgE.

ММСК КМ культивировали не более чем до 4 пассажа, в то время как ММСК ПК культивировали до 9–10 пассажа без возникновения признаков старения клеток и хромосомных перестроек. Полученные в ходе работы чистые популяции МСК ПК и КМ имели фибробластоподобную морфологию, адипогенный, хондрогенный и остеогенный потенциалы дифференцировки и схожий иммунофенотип. Иммунофенотип не изменялся в ходе культивирования и был описан для всех полученных культур как CD34-, CD45-, CD44+, CD90+, CD105+. ММСК из обоих источников при сокультивировании с лимфоцитами периферической крови здоровых доноров подавляли их пролиферацию. Кроме того, полученные ММСК незначительно снижали продукцию IgE в клетках линии U266.

Таким образом, ММСК пуповинной крови по сравнению с ММСК костного мозга дольше сохраняют свой пролиферативный потенциал и могут быть культивированы в течение более продолжительного времени. Взаимодействие лимфоцитов и ММСК из обоих источников при совместном культивировании носило сходный характер.

Экспериментальное обоснование применения культур фибробластов человека в сочетании с коллагеновым матриксом для лечения кондуктивной тугоухости

Кауламбаева М. З.¹, Досова А. Х.², Бименов К. С.³, Жумахметов М. С.¹,
Толбаева Б. Т.¹, Нурмухамбаева А. Б.¹

¹ *Научно-производственное предприятие «Антиген»*

² *Национальный научный медицинский центр*

³ *Казахский национальный медицинский университет им. Асфендиярова С.Д.*

В качестве объекта исследований использовали ягнят возрастом 3–4 месяца, породы меринос в количестве 15 голов, коллагеновые губки, суспензию клеток диплоидного штамма эмбриональных фибробластов человека ЭФЧ 01/05. Для создания модели кондуктивной тугоухости у подопытных животных делали парацентез под зрительным контролем, с использованием отоскопа. Для исключения самопроизвольного закрытия барабанной перепонки парацентезную иглу после вкола, несколько раз проворачивали по часовой, за тем против часовой стрелки. В результате в барабанной перепонке образовались отверстия 1.5–2 мм.

Подопытные животные были в количестве 15 голов были разделены на две группы:

1. Контрольная — 6 голов;
2. Испытуемая — 9 голов.

Контрольным животным произведено парацентез без закрытия парацентезного отверстия. Испытуемым животным произведено парацентез с закрытием парацентезного отверстия коллагеновой губкой пропитанной суспензией клеток диплоидного штамма фетальных фибробластов человека ЭФЧ 01/05 в объеме 0,5 см³ с концентрацией клеток 2–2,5 млн. клеток/см³. Контроль состояния барабанной перепонки проводили с помощью отоскопа.

Через 14 дней эксперимента при осмотре у животных из испытуемой группы имелись остатки засохшего коллагена, после удаления последнего парацентезное отверстие полностью закрылось нежной рубцовой тканью, признаков воспаления не было. У животных из контрольной группы после удаления засохшего кровяного сгустка, имелось перфорационное отверстие без признаков воспаления. На 21 сутки эксперимента у животных испытуемой группы произошло полное заживление барабанной перепонки, а в контрольной группе перфорационное отверстие не затянулось. На четвертой недели эксперимента у всех животных испытуемой группы наблюдали полное восстановление барабанной перепонки без признаков

воспаления. В контрольной группе у одного животного наблюдали закрытие барабанной перепонки, а у других перфорация сохранялась с признаками воспаления

На основании полученных результатов можно сделать следующее заключение: — применение клеток диплоидного штамма ЭФЧ 01/05 в сочетании с коллагеновым матриксом значительно ускоряет регенерацию перфорированной барабанной перепонки по сравнению с контролем.

Лечебный эффект системной трансплантации культивируемых аутогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у больных с резистентными формами туберкулёза лёгких

Кварцхава Д. Д.

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Введение. Системное (внутривенное) введение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в организм в настоящее время рассматривается как один из перспективных методов активизации репаративных процессов в поврежденных органах и тканях. Необходимость использования дополнительного воздействия на способность поврежденной легочной ткани к репарации в некоторых ситуациях весьма остра. К ним, несомненно, относятся ситуации лечения больных с резистентными формами туберкулеза.

Материал и методы. После системной трансплантации аутогенных МСК пациенты продолжали получать ранее назначенное медикаментозное лечение. Контроль за результатами лечения вели по динамике клинических проявлений заболевания, бактериовыделения и специфических изменений в легких по данным рентгено-томографического и КТ исследований.

Результаты и их обсуждение. В настоящий период у 9 (56,3 %) из 16 пациентов, которым трансплантировали МСК 1,5–2 года назад, можно констатировать стойкую ремиссию туберкулезного процесса с рассасыванием воспалительных и исчезновением деструктивных изменений в легких, у 6 (37,5 %) — существенную положительную бактериологическую и морфологическую динамику. Лишь в одном случае из 16 эффект трансплантации МСК ограничился непродолжительным клиническим улучшением.

Заключение. Природа наблюдаемых эффектов пока остается недоста-

точно понятной, можно только констатировать усиление регенеративных процессов в поврежденных участках легких. Одновременно можно отметить, что полученные результаты указывают на перспективность использования аутогенных МСК при лечении резистентных форм туберкулеза не только путем проведения клеточной терапии, но и на использовании МСК для доставки ряда генов в поврежденные ткани легкого (например, гена γ -интерферона).

Биореактор с пневмоакустическим распылением культуральной среды

Ковалев А. В.

ФГУ «ЦИТО им. Н.Н. Приорова Росмедтехнологий»

Поиск идеальной системы лечения ран отражает современные потребности медицины в безрубцовом восстановлении кожного покрова. Раневая среда, в которой протекают восстановительные процессы, является определяющим фактором полноты регенерации. Формирование органотканетипичного (нерубцового) регенерата можно регулировать изменением состава локальной раневой среды. В предыдущих исследованиях условия потенцирования регенерации тканей в жидкой питательной среде были нами частично приближены к контролируемым условиям выращивания клеток в культуре, что позволило совместить эти методы в единую систему.

Для предполагаемого лечения ран и травм лица с дефектом тканей сложной 3D формы и большой площади методом тканевой инженерии был разработан биореактор с динамически регулируемой стерильной культуральной средой. Особенность механизма действия этого биореактора заключалась в пневмоакустическом распылении жидкой питательной среды. Эта технология была применена в экспериментах по культивированию трехмерных тканеинженерных конструкций на основе мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток костного мозга, жировой ткани и эпителиоцитов кожи лабораторных крыс на ацеллюлярной дерме. Такая биоматрица с клеточным материалом помещалась внутрь емкости биореактора. Через пневмоакустические форсунки подавался аэрозоль, на основе культуральной среды, и газовая среда, представленная воздухом с повышенным до 5 % содержанием углекислого газа и максимальной влажностью. Поддерживалась постоянная (37° С) температура этой смеси. Пневмоакустические форсунки были расположены в стенках емкости, а факелы распыления направлены на тканеинженерную конструкцию под разными углами (ис-

пользуется «факел» с углом «раскрытия» 1800). Одним из преимуществ пневмоакустического распыления воздушно-водяной смеси с питательной культуральной средой являлась очень большая проникающая способность тонко распыленной жидкости. Мелкодисперсное распыление среды происходит без разрушения структуры составляющих ее веществ, изменения их основных физико-химических свойств и деформации биоматрицы. Питательная культуральная среда представляла жидкую фазу смеси и равномерно осаждалась на все поверхности тканеинженерной конструкции, что обеспечивало адекватное поступление питательных веществ к пролиферирующим клеткам. Поддерживалась высокая однородность размера капель — около 3 мкм (до 80 %). Был облегчен газообмен внутри графта.

В результате в данном устройстве при 3D сокультивировании на ацеллюлярной дерме наращивалась биомасса мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток костного мозга и эпителиоцитов кожи. Биореактор с пневмоакустическим распылением культуральной среды может быть использован для 3D культивирования стромальных и эпителиальных клеток на ацеллюлярной дерме сложной органотипичной формы, большой площади и толщины. В перспективе подобное устройство может быть использовано для биотехнологического органотканетипичного восстановления, например, тканей лица *in vivo*.

Терапевтическое использование системной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в модели индуцированной эластазой легочной эмфиземы крыс Вистар

Аверьянов А. В., Коноплянников А. Г., Черняев А. Л., Бандурко Л. Н., Петров В. Н., Коноплянникова О. А., Лепехина Л. А., Кальсина С. Ш., Семенкова И. В., Агаева Е. В.

*ФГБУ Медицинский радиологический научный центр МЗиСР РФ, Обнинск
Клиническая больница № 83 ФМБА МЗиСР РФ, Москва
НИИ пульмонологии МЗиСР РФ, Москва*

На модели описанной в литературе легочной эмфиземы (Rubio M. L. e. a., 2004), индуцированной у крыс Вистар внутритрахеальным введением фермента эластазы, было изучено терапевтическое действие системной (внутривенной) трансплантации 2×10^6 мезенхимальных стволовых клеток (МСК) выращенных в культуре костного мозга этих животных и хранившихся в созданном нами криобанке. Для введения 0,5 мл клеточной суспензии

пензии в хвостовую вену животных использовали клетки 5 пассажа культуры и проводили такое введение через 1 сутки после введения эластазы (1 опытная группа) и через 7 суток после введения эластазы (2 опытная группа). Через 21 день после введения животным эластазы их забивали для морфометрического изучения состояния легких, а также для оценки выраженности воспалительных процессов по индуцированной хемилюминесценции перитонеальных макрофагов у крыс.

Было показано, что у животных, которым вводили эластазу и не вводили МСК развивалась типичная картина повреждения легких со значительным увеличением альвеолярного индекса (отношение ширины к глубине альвеол) и с выраженным усилением хемилюминесцентной активности перитонеальных макрофагов. Системное введение животным МСК в обеих группах достоверно снижало повреждающий эффект эластазы, причем в группе 2 он был выражен несколько сильнее, чем в группе 1. Возможно, это связано с тем, что в ближайший период от нанесения повреждения легким часть трансплантированных МСК «отвлекалось» на нейтрализацию острого воспалительного ответа, развивающегося на введение эластазы. Можно предположить, что подвергаясь апоптозу после выполнения противовоспалительной роли, меньшее количество МСК участвовало в последующем процессе восстановления клеточных и каркасных структур, что и объясняет больший регенеративный эффект в группе, получившей МСК не на следующий, а на 7-й день после эластазной травмы.

Полученные в нашей работе данные свидетельствуют о перспективности использования системных трансплантаций МСК при лечении больных с различными повреждениями легких, среди которых, несомненно, особую роль играют повреждения вызванные курением и хроническими воспалительными заболеваниями, что требует дальнейшего продолжения экспериментального изучения эффекта МСК в других моделях повреждения легочной ткани.

**Стимуляция пула стволовых кроветворных клеток у мышей
введенными различным способом комплексами наноалмазов
и кондиционной среды из-под сингенных и ксеногенных культур
мезенхимальных стволовых клеток**

Коноплянников А. Г., Коноплянников М. А.

*ФГБУ Медицинский радиологический научный центр МЗиСР РФ, Обнинск
Российский государственный медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва*

В настоящее время наноалмазы размером порядка 5–10 нанометров интенсивно изучаются как перспективные агенты для доставки противораковых препаратов в опухоли (Chow E. K. e. a., 2011). Вместе с тем не исключаются возможности использования наноалмазов для доставки в ткани и других биологически активных соединений (Коноплянников А. Г. и др., 2011). Ранее мы обнаружили, что пероральное или внутрибрюшинное введение мышам суспензии, в которой содержатся наноалмазы, активирует пул гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), что может быть выявлено методом селезеночных эндокolonий после общего гамма-облучения животных в сублетальных дозах. Можно было предположить, что введенные животному наноалмазы могут поступать в «ниши» ГСК в кроветворных тканях и активировать пока непонятным путем пребывающие по преимуществу в состоянии пролиферативного покоя ГСК, что будет приводить к временному повышению величины пула ГСК, как это наблюдается для большой группы радиозащитных препаратов с «биологическим механизмом действия». Так как известно, что введенные летально облученным животным мезенхимальные стволовые клетки (МСК), используя выделяемые ими паракринные агенты, способны «спасать» от гибели небольшую фракцию оставшихся после облучения выжившими ГСК и таким образом защищать животных от радиационной гибели (Lange C. e. a., 2011), то представлялось интересным изучить возможное радиозащитное действие комплексов наноалмазов и кондиционной среды из под культур МСК методом селезеночных эндокolonий, как это ранее было нами использовано в опытах по изучению эффекта одних только наноалмазов.

Опыты были поставлены на мышах-гибридах F1 (СВАхС57В1/6), которым за одни сутки до общего гамма-облучения в дозе 6 Гр перорально или внутрибрюшинно вводили кондиционную среду из под сингенных (мыши) культур МСК или из под ксеногенных (человек) культур МСК и которых забивали через 8 суток для подсчета эндогенных селезеночных

колоний. Было подтверждено стимулирующее пул ГСК действие наноалмазов при обоих способах их введения животным, а так же показано, что внутрибрюшинно введенная отдельно кондиционная среда из под мышинных и человеческих культур также стимулирует пул ГСК. Одновременно была обнаружена исключительно высокая активность комплексов наноалмазов и кондиционной среды из под культур двух типов МСК (статистически значимое различие при сравнении с эффектом каждого из агентов, примененных отдельно) при введении комплексов как внутрибрюшинно, так и перорально. Таким образом, показана высокая биологическая эффективность комплексов наноалмазов и кондиционной среды из под культур МСК по одному из тестов, который характеризовал ранее обнаруженные терапевтические эффекты МСК, что делает актуальным изучение активности данных комплексов с использованием других тестов и, в первую очередь, по влиянию на эффективность репаративных процессов при повреждении различных органов и тканей.

Оптимизация условий остеогенной дифференцировки мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека

Логовская Л. В., Бухарова Т. Б., Вихрова Е. Б., Гольдштейн Д. В.

МГНЦ РАМН, Москва; ЗАО «РеМеТэкс», Москва.

Важной задачей современной медицины является эффективная терапия костно-хрящевых дефектов травматического или иного характера. Одним из подходов для обеспечения направленной регенерации костной ткани является использование клеточной терапии на основе аутологичных мультипотентных стромальных клеток (МСК), предварительно дифференцированных в остеогенном направлении. Критерием эффективности остеогенной дифференцировки МСК является уровень продукции ими основных неколлагеновых белков костного матрикса остеопонтина, костного сиалопротеина и остеокальцина. Подбор условий культивирования, обеспечивающих наиболее эффективную дифференцировку МСК в остеогенном направлении, позволит повысить эффективность применения клеточных технологий для регенерации костной ткани.

Цель работы. Подобрать оптимальный состав дифференцировочной среды и сроки культивирования, обеспечивающие наиболее эффективную дифференцировку МСК жировой ткани в остеогенном направлении.

Задачи. Изучить уровень экспрессии генов белков внеклеточного мат-

рикса остеопонтина, остеокальцина и костного сиалопротеина при культивировании МСК в присутствии различных индукторов на разных сроках дифференцировки.

Результаты. В работе использовали культуру МСК, выделенную из липоаспирата человека. Для направленной остеогенной дифференцировки МСК культивировали в базовой остеогенной среде на основе DMEM с 10 % FBS, 100 мкг/мл амикацина, 50 мг/л L-аскорбиновой кислоты, 10 мМ β -глицерофосфата натрия. В качестве основного остеоиндуктора добавляли дексаметазон и/или 1,25 дигидроксивитамин D₃. Проводили сравнительную оценку уровней экспрессии генов основных белков костного матрикса после 7, 14 и 21 суток дифференцировки с помощью метода ПЦР в режиме реального времени.

Было показано, что наибольший прирост уровня экспрессии генов белков остеокальцина и остеопонтина по сравнению с контролем наблюдается при культивировании клеток в остеогенной среде, содержащей витамин D₃. Культивирование клеток в среде, содержащей витамин D₃ и дексаметазон, не давало статистически значимого прироста в транскрипции по сравнению с инкубацией в среде с витамином D₃. Культивирование в среде с дексаметазоном приводило к падению уровня транскрипции генов остеопонтина и сиалопротеина, и не оказывало влияния на уровень транскрипции гена остеокальцина. Сравнительный анализ уровня экспрессии целевых генов после 7, 14 и 21 суток дифференцировки МСК в присутствии витамина D₃ показал максимальный уровень транскрипции для генов белков остеопонтина и сиалопротеина на 14 сутки дифференцировки. Для гена остеокальцина пик транскрипции детектировали на 7 сутки дифференцировки. К 21 суткам инкубации клеток на остеогенной среде в присутствии витамина D₃ отмечали падение уровня транскрипции всех анализируемых генов.

Выводы. На основе оценки уровня экспрессии генов костного матрикса были подобраны оптимальные условия остеогенной дифференцировки МСК ЖТ. В качестве основного индуктора был выбран 1,25 дигидроксивитамин D₃. Оптимальный срок инкубации в остеогенной среде — 14 суток.

Работа выполнена при поддержке МинОбрНауки, ГК 16.512.11.2098 от 16 февраля 2011 г и РФФИ, 09–02–00935-а.

Адрес для обратной связи: lililog@list.ru

Внеклеточная ДНК опухолевых клеток индуцирует в мезенхимных стволовых клетках жировой ткани повышенный уровень экспрессии PPAR γ

Лосева П., Костюк С., Смирнова Т., Каменева Л., Вейко Н.

Медико-Генетический Научный Центр РАМН, 115478, Москва,
ул. Москворечье, 1

Внеклеточная ДНК (вкДНК) является нормальным компонентом как крови человека, так и среды культивирования. Ранее мы показали, что присутствие различных проб ДНК в среде культивирования влияет на дифференцировку мезенхимных стволовых клеток (МСК). В крови онкологических больных увеличено общее количество вкДНК и присутствует вкДНК опухоли. Чтобы выяснить, как вкДНК опухоли влияет на нормальные МСК, мы исследовали действие вкДНК, выделенной из плазмы крови больных раком молочной железы (плДНК), на экспрессию генов-маркеров адипогенной, остеогенной и миогенной дифференцировки МСК. Для сравнения брали ДНК, выделенную из клеток (гДНК), и вкДНК плазмы здоровых доноров (здДНК). МСК жировой ткани культивировали 3 суток в пролиферативной среде, содержащей вкДНК (10–100 нг/мл), далее среду заменяли и культивировали в течение 10 дней без вкДНК. Методом ПЦР в реальном времени анализировали количество мРНК генов *PPARG2*, *LPL*, *FABP4*, *LEP*, *OPG*, *RUNX2*, *SPP1*, *MYOD1*, *MYOG*, *MYF5*. Культивирование МСК в присутствии плДНК увеличивает экспрессию *PPARG2* в 3–12 раз, при этом количество мРНК *LPL*, *FABP4*, *LEP*, *OPG*, *RUNX2*, *SPP1* существенно не изменяется или достоверно снижается. Количество мРНК *MYOD1*, *MYOG*, *MYF5* возрастает в 2–3 раза. гДНК и здДНК не изменяют содержание мРНК перечисленных генов. Таким образом, плДНК стимулирует в МСК экспрессию PPAR γ и маркеров миогенной дифференцировки. Многие авторы описывают множественные роли PPAR γ в развитии рака. Активация PPAR γ часто ведет к ингибированию роста, апоптозу и дифференцировке клеток опухоли. Возможно, активация PPAR γ в МСК — ответ на действие вкДНК раковых клеток, направленный на подавление роста опухоли.

Терапевтический ангиогенез в ишемизированной мышце: повышение эффективности с помощью использования комбинированной генной и клеточной терапии

Шевченко Е. К.², Макаревич П. И.¹, Цоколаева З. И.², Сысоева В. Ю.¹,
Шевелев А. Я.², Власик Т. Н.², Парфёнова Е. В.^{1,2}

¹ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова

² Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва

Стимуляция ангиогенеза в ишемизированных тканях была и остается важнейшей задачей современной медицины. Она может решаться доставкой генов факторов роста с помощью методов генной терапии или с использованием различных типов клеток. В большинстве случаев эффективность таких подходов была очень высокой на доклиническом уровне и зачастую вызывала вопрос при исследованиях в клинике. В связи с этим в последнее время отмечается повышенное внимание к разработке новых подходов с целью повышения эффективности терапевтического ангиогенеза.

Разработанный и запатентованный на базе РКНПК плазмидный вектор, получивший название рС4W отличается от коммерческих аналогов более высокими количествами нарабатываемого белка, что можно использовать для повышения эффективности генной терапии.

Гены человеческих факторов роста — VEGF165, HGF и ангиопоэтина-1 были клонированы в вектор рС4W, после чего на мышшиной модели ишемии задней конечности нами была выполнена оценка эффективности однократного введения плазмид или их парных комбинаций. Среди одиночных плазмид наиболее эффективными оказались векторы с генами VEGF и HGF, однако самую высокую перфузию ишемизированной конечности к 21 дню мы наблюдали в группах парных сочетаний векторов (VEGF+HGF, VEGF+ANG1 и ANG1+HGF). При гистологическом исследовании в группах комбинированного введения была выявлена более высокая плотность капилляров (CD31+) и артериол (ГМК+).

Таким образом, использование новых векторов и комбинированное введение нескольких факторов роста для стимуляции ангиогенеза представляется нам перспективным с позиций повышения эффективности генной терапии.

Касательно оптимизации клеточной терапии одним из наиболее изученных является подход с генетическим модифицированием клеток. В нашем случае были использованы хорошо себя зарекомендовавшие с позиций эффективности и безопасности стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ).

Для модификации клеток нами использовался рекомбинантный адено-ассоциированный вирус 2 типа с геном VEGF165. Полученные от различных доноров во время хирургических вмешательств СКЖТ подвергались *in vitro* трансдукции, что приводило к значительному повышению секреции VEGF, которое сохранялось в течение 30 дней после обработки вирусом. Исследования трансдуцированных клеток *in vivo* проводились на иммунодефицитных мышцах линии nude с использованием модели подкожной имплантации матригеля. При этом оказалось, что наибольшая плотность сосудов была в группе VEGF-трансдуцированных СКЖТ. Контрольными группами служили GFP-трансдуцированные СКЖТ и не подвергавшиеся трансдукции СКЖТ. В опытах на модели ишемии задней конечности мы также обнаружили, что наибольшая перфузия была зарегистрирована среди животных, которым вводились VEGF-СКЖТ. Гистологический анализ показал уменьшение области некроза в мышце, а также значительное увеличение плотности капилляров и артериол в матригелях и образцах мышц от животных, которым вводились VEGF-СКЖТ.

Таким образом, нами были изучены два наиболее перспективных способа увеличения эффективности генной и клеточной ангиогенной терапии, каждый из которых после соответствующего тестирования может быть использован в клинике у больных с ишемическими поражениями, плохо поддающимися лечению стандартными методами.

Костный мозг как источник стволовых клеток для регенерации тканей и органов взрослых млекопитающих

Михайлов В. М.¹, Соколова А. В.¹, Сериков В. Б.², Каминская Е. М.¹,
Чурилов Л. П.³, Трунин Е. М.⁴, Сизова Е. Н.⁴, Каюков А. В.⁴,
Будко М. В.⁴, Зайчик А. М.⁴

¹Институт цитологии РАН, ²Детский госпиталь г. Окланд, Калифорния, США, ³Санкт-Петербургский Государственный Университет, ⁴Мед. Академия им. Мечникова, Санкт-Петербург

Опыты по трансплантации показали, что костный мозг млекопитающих является источником взрослых стволовых клеток, участвующих в регенерации не только тканей мезодермального происхождения, но также органов и тканей энтодермального и эктодермального происхождения. Показано, что стволовые клетки костного мозга (СККМ) млекопитающих участвуют в регенерации печени. Данные об участии СККМ в регенерации легких

противоречивы. В настоящем сообщении представлены данные об участии СККМ в регенерации эпителия фолликулов щитовидной железы. Предварительно было установлено, что у радиационных химер мышей C57BL/6, облученных лучами Рентгена в дозе 7.5 Gy, через 2 месяца после трансплантации клеток костного мозга (ККМ) мышей C57BL/10, экспрессирующих белок GFP, GFP-положительные клетки [GFP (+)-клетки] присутствуют в эпителии фолликулов щитовидной железы.

В основном эксперименте после рентгеновского облучения в дозе 5 Gy мышам mdx трансплантировали ККМ мышей GFP (+) C57BL/10. Результаты оценивали через 9–10 месяцев после трансплантации. К этому времени среди содержащих ядра ККМ накопилось до 52.3 ± 8.3 % GFP (+) клеток. Среди мононуклеаров крови GFP (+) клетки были в доле 20.8 ± 3.3 %. На срезах щитовидной железы GFP (+) клетки присутствовали в составе эпителия фолликулов. Доля GFP (+) клеток (6.1 ± 1.8 %) была определена при конфокальной микроскопии по колокализации ядер, окрашенных йодидом пропидия, и GFP-сигнала в цитоплазме клеток. Доказательством реальности присутствия GFP белка в клетках эпителия фолликулов мышей mdx было выявление в этих клетках GFP при помощи специфических кроличьих антител к GFP-протеину с последующим выявлением при помощи системы вторичных антикроличьих антител, меченных биотином, и авидина, меченного Texas Red. При анализе колокализации GFP и Texas Red меток было подтверждено, что GFP (+) клетки присутствуют в составе эпителия фолликулов. Доказательством присутствия GFP-сигнала именно в тиреоцитах была колокализация тиреоглобулина с GFP (+) тиреоцитами фолликулов, что несомненно свидетельствует о том, что GFP (+)-тиреоциты есть производные трансплантированных клеток костного мозга. Выявление тиреоглобулина в цитоплазме тиреоцитов как фолликулярного эпителия так и в так называемых внутривнутриполостных тиреоцитах является доказательством тиреоидной природы этих клеток. Тиреоглобулин также был выявлен в отдельных клетках между фолликулами и в содержимом фолликулов. В ряде случаев содержимое фолликулов было GFP-положительным. Таким образом, стволовые клетки костного мозга мышей C57BL/10, экспрессирующие белок GFP, спасают мышей mdx от радиационной гибели, восстанавливая кроветворение в костном мозге GFP (+) стволовыми клетками. Исследования выполнены после окончания острого периода радиационного повреждения щитовидной в летальной для мышей mdx дозе 5 Gy через 9–10 месяцев после облучения и трансплантации ККМ мышей GFP (+) C57BL/10, что позволило обнаружить внутривнутриполостные тиреоциты. Данные об участии СККМ в регенерации

и обновлении фолликулярного эпителия щитовидной железы, полученные на радиационных химерах, были подтверждены в опытах на парабиотических парах мышей *mdx* и мышей GFP (+) C57BL/10. В парабиотических парах у мышей *mdx* величины долей GFP (+)-клеток 13.7 ± 2.5 % в костном мозге и 1.2 ± 0.9 % среди клеток эпителия фолликулов щитовидной железы были меньше чем в случае радиационных химер. Это различие можно объяснить конкуренцией между «дикими» стволовыми клетками мышей GFP (+) C57BL/10 и мутантными стволовыми клетками мышей *mdx*. GFP (+) тиреоциты в эпителии фолликулов щитовидной железы мышей *mdx* также указывают на обновление фолликулярного эпителия, обычно трудно регистрируемым в неповрежденной щитовидной железе. Этот вывод соответствует литературным данным о высоком пролиферативном потенциале тиреоцитов фолликулярного эпителия *in vivo*.

Накопленные в литературе данные об участии СККМ в регенерации клеток и органов энтодермального происхождения и наши результаты подтверждают представления о том, что СККМ взрослых млекопитающих содержат не только мультипотентные стволовые клетки но также и плюрипотентные стволовые клетки. В отличие от эмбриональных стволовых клеток при трансплантации СККМ у реципиентов не образуются тератомы.

Новый метод культивирования *in vitro* тканей глаза крысы для изучения состояния тканей при патологиях *in vivo*

Новикова Ю.П., Григорян Э.Н.

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
ул. Вавилова, 26, 119991 Москва*

Нами предложен метод для органотипического роллерного 3D культивирования заднего сектора (комплекс «пигментный эпителий + сосудистая оболочка (хороид) + склеральная оболочка) и сетчатки глаза взрослой крысы альбиноса. Метод позволяет поддерживать жизнеспособную ткань *in vitro* в течение как минимум 14 дней, т.е. во много раз дольше, чем при использовании условий стационарного культивирования *in vitro*. Метод дает возможность наблюдения за поведением клеток пигментного эпителия сетчатки во взаимодействии с хориокапиллярной оболочкой, что не может быть сделано при использовании его клеточной культуры. Основная новизна метода состоит в том, что органотипическое культивирование происходит в замкнутом объеме, без смены среды и при постоянном вращении.

При этом образцы ЗСГ и сетчатки находились во взвешенном состоянии, не залипая на внутреннюю поверхность флаконов, что при постоянном перемешивании среды в результате вращения обеспечивало омывание препаратов свежей порцией среды и не допускало их деформации. С помощью предложенного метода проведено исследование пигментного эпителия сетчатки в составе комплекса и изолированной сетчатки и показано, что их клетки в условиях роллерного органотипического культивирования способны к трансформации фенотипа, миграции и пролиферации. В отсутствие взаимодействия с сетчаткой клетки пигментного эпителия активно проявляют свойства чистильщиков — фагоцитов как вне слоя, так и оставаясь в его составе. События, происходящие с клетками пигментного эпителия в условиях роллерного культивирования *in vitro*, аналогичны тем, что наблюдаются при различных патологиях сетчатки *in vivo*. Данный подход может быть использован для а) исследования действия на пигментный эпителий и сетчатку глаза различных факторов при добавлении их в среду культивирования, б) моделирования процессов, происходящих в пигментном эпителии при повреждении и патологических состояниях сетчатки, и в) изучения регенерационных ответов клеток пигментного эпителия сетчатки у развивающихся и взрослых высших позвоночных животных.

Элементный гомеостаз стволовых клеток обонятельного эпителия

Обухова Л. М.¹, Понятовская А. П.¹, Усова О. В.¹, Трифонова А. С.¹,
Пименов В. Г.², Евдокимов И. И.², Мухина И. В.¹

¹ ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия
МЗиСР России, 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1;

Тел.: (831) 4377407; факс (831) 4390314; E-mail: ObuhovaLM@yandex.ru

² Институт химии высокочистых веществ РАН, 603950, Нижний Новгород, ГСП-75, ул. Тропинина, д.49

Функционирование ионных каналов в стволовых и прогениторных клетках закладывает основу восприятия биоэлектрических сигналов, которые управляют процессами миграции, пролиферации, дифференцировки и апоптоза [1,2]. Помимо этого, макро- и микроэлементы активно участвуют в работе сигнальных путей Hedgehog и Notch, также контролирующих поддержание клеточной активности [3,4,5]. Данные факты свидетельствуют о фундаментальной роли элементного гомеостаза, однако до сих пор недостаточно изучена его роль в жизнедеятельности нейтральных стволовых

клеток (НСК), в частности прогениторов обонятельного эпителия — оптимального источника аутологичных нейральных клеток для трансплантации при заболеваниях ЦНС. Культивирование НСК осуществляется в виде нейросфер— свободно плавающих кластеров, включающих в себя стволовые клетки и прогениторы [6].

В связи с этим, цель данного исследования— анализ особенностей элементного гомеостаза нейросфер эмбриональных нейральных клеток и прогениторов обонятельного эпителия половозрелого организма мышей в сравнении с культурами дифференцированных нейронов.

Объектами исследования служили: культуры диссоциированных клеток коры головного мозга эмбрионов мышей (E18), (нейробазальная среда NBМ с добавкой B27 (Invitrogen) и L-Glutamin (Sigma)); нейросферы в культуре клеток коры головного мозга эмбрионов мышей (E14) и обонятельного эпителия взрослых мышей (DMEM/F12 (Invitrogen) с добавлением ростовых факторов EGF (Invitrogen), FGF (Sigma), добавки N2 (Invitrogen) и L-Glutamin (Sigma)). Культивирование осуществляли при 35,5°C и 5 % CO₂ в инкубаторе MCO-18A1C (Sanyo). Динамику развития культур оценивали с помощью инвертированного флюоресцентного микроскопа DMIL (Leica). Элементный анализ был осуществлен методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (предел обнаружения 10⁻⁷ — 10⁻⁹ % масс.). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Microsoft Excel, Statistica 6.0.

После нескольких дней культивирования клеток обонятельного эпителия образовывались клеточные конгломераты двух различных типов. Первые сферы были шарообразными, сформированными из круглых клеток и напоминали нейросферы, которые были получены из коры головного мозга эмбрионов мыши (E14). Второй тип сфер состоял из более мелких и темных клеток.

В диссоциированной культуре клеток коры головного мозга содержание макро- и микроэлементов было выше контрольных значений (рис.1). Вероятно, полученный результат обусловлен отсутствием пролиферации клеток в культуре. Уменьшение содержания элементов в культуральной среде с нейросферами по сравнению с контролем, свидетельствует о необходимости поступления макро- и микроэлементов для осуществления процессов клеточного деления (рис.1).

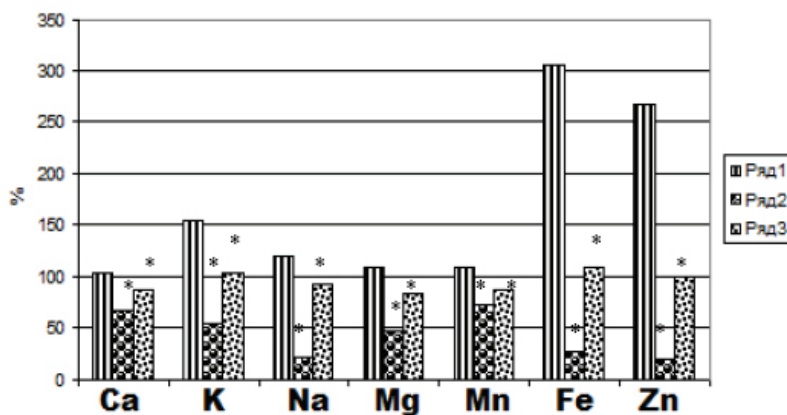


Рис. 1.

Соотношение содержания макро- и микроэлементов в культуральной среде диссоциированной культуры клеток коры головного мозга эмбриона мыши (E18) (ряд1); нейральных стволовых клеток головного мозга эмбриона мыши (E14) (ряд2); клеток обонятельного нейроэпителия половозрелой мыши (ряд3) (100 %- интактная среда — контроль)

* - различия между пробами достоверны ($p < 0,05$) (критерий Ньюмана-Кейлса)

Обнаружены различия в значениях потребления макро- и микроэлементов на 1 клетку для эмбриональных нейральных стволовых клеток и клеток обонятельного эпителия (рис.2).

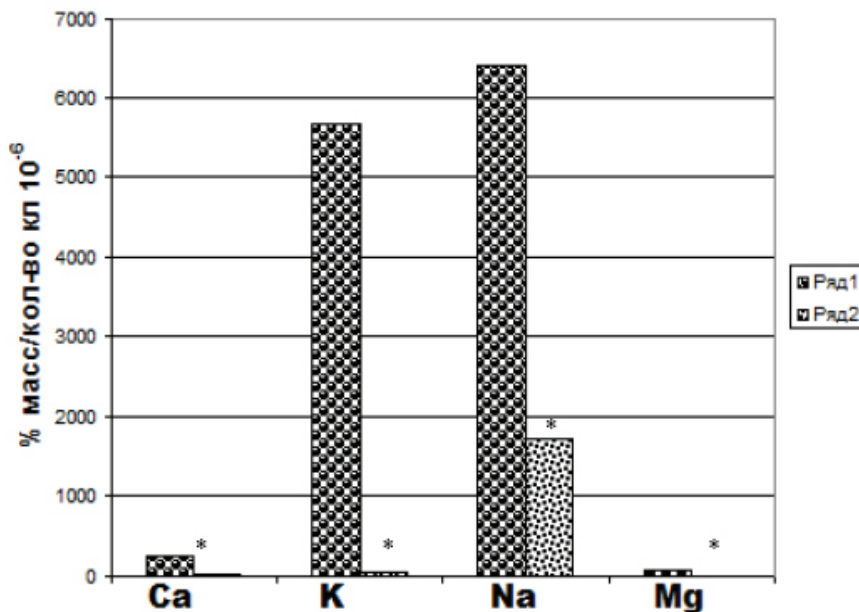


Рис.2.

Удельное потребление макроэлементов культурами нейральных стволовых клеток головного мозга эмбриона мыши (E14) (ряд 1) и клеток обонятельного нейроэпителия половозрелой мыши (ряд 2) на 6-ой день культивирования.

*-различия между показателями достоверны ($p < 0,05$)

С течением времени в культурах эмбриональных нейральных клеток и стволовых клеток обонятельного эпителия наблюдался рост удельного потребления макроэлементов (в расчете на 1 клетку). Для обеих групп клеток был обнаружен значительный рост потребления натрия в 5,42 ($p=0,009$) и 2,24 раза ($p=0,004$) соответственно. Несмотря на имеющееся разнообразие ионных каналов в стволовых клетках (эмбриональных и мезенхимальных, НСК и IPS) общими для них являются следующие виды каналов: потенциалзависимые медленные, Ca^{2+} -активируемые, АТФ — чувствительные и выносящие калиевые каналы; каналы Cl^- , потенциалзависимые Na^+ каналы, L-тип кальциевых каналов, неселективные катионные каналы переходных рецепторных потенциалов [7]. Однако установлено, что в зависимости от типа ткани и вида животного в стволовой клетке будут преобладать различные типы ионных каналов. При формировании культур нейральных эмбриональных стволовых клеток в наших

экспериментах было показано резкое увеличение потребления кальция (в 8,81 раз, $p=0,005$) и калия (в 60,79 раз, $p=0,003$), при отсутствии такового для культур обонятельного эпителия, что соответствует литературным данным о наличии в мышечных нейрональных клетках-предшественниках, полученных из нейросфер, помимо упомянутых выше, дополнительных калиевых каналов, в том числе и Ba^{2+} -чувствительных медленных несущих внутрь K^{+} и ингибируемых тетраэтиламмонием [8, 9]. Учитывая, что наличие Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов является необходимым для пролиферации стволовых клеток [7], обнаруженные отличия в потреблении данных элементов культурой стволовых клеток обонятельного эпителия с большой долей вероятности позволяют сделать вывод о значительно меньшем содержании в ней клеток с высоким потенциальным потенциалом по сравнению с культурами нейральных стволовых клеток головного мозга эмбриона мыши (E14).

Потребление макро- и микроэлементов эмбриональными клетками во много раз выше, чем культурой из выстилки обонятельного эпителия. Это свидетельствует о более интенсивном пролиферативном потенциале эмбриональных клеток по сравнению с клетками обонятельного эпителия. Учитывая данный факт, а также обнаруженную более выраженную для культур эмбриональных нейральных клеток тенденцию роста потребления калия и кальция, и показанное существование двух типов нейросфер в культуре клеток обонятельного эпителия, можно сделать следующий вывод. Выявленные различия в структуре и элементном гомеостазе нейральных стволовых клеток из различных источников свидетельствуют о необходимости разработки методов разделения фенотипических вариантов клеток в культуре обонятельного эпителия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blackiston D. J., McLaughlin K. A., Levin M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle*, 2009; 8: 3519–3528.
2. Liu Y. J., Wang X. G., Tang Y. B., Chen J. H., Lu X. F., Zhou J. G., Guan Y. Y. Simvastatin ameliorates rat cerebrovascular remodeling during hypertension via inhibition of volume-regulated chloride channel. *Hypertension*, 2010; 56: 445–452.
3. Brou C., Logeat F., Gupta N. et al. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell.*, 2000; 5 (2): 207–16.
4. Huangfuand D., Anderson K. V. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates.

- Development, 2006; 133 (1): 3–14.
5. Bishop B., Aricescu A. R., Harlos K. et al. Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HHIP. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16 (7): 698–703.
 6. Beza A., Corsinia E., Curtib D. et al. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain research*, 2003; 993 (1–2): 18–29.
 7. Li G. R., Deng X. L. Functional ion channels in stem cells. *World J. Stem Cells*, 2011; 3 (3): 19–24.
 8. Yasuda T., Bartlett P. F., Adams D. J. K (ir) and K (v) channels regulate electrical properties and proliferation of adult neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*, 2008; 37: 284–297.
 9. Yasuda T., Adams D. J. Physiological roles of ion channels in adult neural stem cells and their progeny. *J Neurochem* 2010; 114: 946–959.

Получение и характеристика пересеваемой клеточной линии эмбриональных нейробластов ящерицы *Hemidactylus platiurus*

Пантелеев Д. Ю., Иванова М. А, Мучкаева И. А., Павлова Г. В.

Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии гена РАН

Hemidactylus platiurus — ящерица, относящаяся к семейству гекконид, обладает способностью восстанавливать утраченный хвост вместе с участком спинного мозга. Известно, что еще большим регенераторным потенциалом обладают хвостатые амфибии (саламандры, тритоны). Однако, рептилии, к которым относится *Hemidactylus platiurus*, являются первыми и последними Amniota со столь выраженными способностями восстанавливать отделы ЦНС, сохраняя их функциональную целостность с неповрежденными отделами. По неизвестным пока причинам с переходом на теплокровность (птицы, млекопитающие), способность к регенерации во взрослом состоянии утрачивается. С тем, что бы понять причины подобного «запрета», мы предприняли попытку изучить свойства нейробластов ящерицы, создав пересеваемую клеточную линию. Ранее подобная попытка была предпринята китайскими коллегами, однако в своем исследовании они проводили трансформацию первичных культур онковирусом SV 40, что, безусловно, не может не повлиять на свойства клеток в последующих поколениях.

Полученные нами клеточные линии без использования каких-либо трансформирующих агентов позволили снять пролиферативные характеристики при разных температурах культивирования. Оказалось, что нейробласты геккона способны пролиферировать при температуре 37⁰С, которая является смертельной для самой ящерицы. Любопытно, что повышение температуры до 42⁰С, так же как и для нейробластов мыши, оказывалась смертельной и сопровождалась индукцией белка теплового шока. С целью установления температуры холодового шока был проведен RT PCR к гену CIRBP, который является маркером «мягкой» гипотермии для клеток млекопитающих. Оказалось, что и по этому признаку нейробласты мыши и геккона не отличаются. Замечено, что при длительном культивировании клеток геккона при температуре 28⁰С, на их поверхности начинают обнаруживаться звездчатые структуры. Проведенные иммуногистохимические исследования показали, что эти структуры представляют актин богатые выросты клеток, причем кортикальные актиновые филаменты образуют поперечные шивки с фибриллами цитоскелета. Трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия выявили более тонкую структуру этих образований. Однако, их роль в биологии клетки, а также в функции нервной ткани остается неизвестной. Дальнейшая работа будет направлена на изучение, поставленных вопросов. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 11–04–01157а.

Исследование вклада в процесс репаративной регенерации клеточных трансплантатов, полученных в условиях 2D и 3D культивирования

Петерсен Е. В.¹, Гуллер А. Е.³, Горкун А. А.¹, Трусова И. А.², Зурина И. М.¹, Кошелева Н. В.^{1,2}, Пулин А. А.^{1,3}, Сабурова И. Н.¹, Шехтер А. Б.³

¹ НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН, ² Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, ³ Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Несмотря на значительный прогресс в области понимания процессов клеточной биологии развития, до сих пор остается актуальным вопрос пределов нормальной физиологической регенерации. Остается неизвестным, почему при средних и крупных повреждениях дефинитивных тканей не мобилизуются и не принимают участие в репарации собственные локальные запасы региональных стволовых клеток, а наблюдается патологическая репарация (фиброз) в ответ на повреждение.

В последнее время показано, что локальная и системная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) ус-

коряет процессы репарации в поврежденных органах и тканях. Например, трансплантация ММСК из костного мозга в зону глубокого кожного повреждения блокирует избыточное образование фиброзной ткани и формирование рубца в очаге повреждения (Smith A. N. et al., 2009; Falanga V., 2009).

Целью нашего исследования была оценка вклада в процесс репаративной регенерации клеточных трансплантатов ММСК, полученных в условиях 2D и 3D культивирования.

В качестве источника клеточных трансплантатов ММСК использовалась выделенная популяция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика (ММСКПК), позитивная по CD105, CD90 и негативная по CD45. Культивирование в условиях 2D проходило по стандартной методике в адгезивном состоянии на пластике. Для получения сфероидов использовали стандартную методику культивирования в висячей капле, посадочная концентрация составляла 25 тыс. кл./мл. В результате на пятые сутки формировались сфериды размером 70–100 мкм. При иммуногистохимическом анализе сфероидов была выявлена экспрессия ламинина, CD 105 и цитокератина 19. Для трансплантации использовали ММСКПК, полученные в условиях 2D и 3D культивирования 3–4 пассажа, в концентрации 700 тыс. кл./мл.

Исследование вклада клеточных трансплантатов, полученных в условиях 2D и 3D культивирования в процесс репаративной регенерации проводилось с использованием модели полнослойной раны вентральной поверхности уха кролика (Alexandrina S. et al., 2002), применяемая для получения гипертрофического рубца кожи. На вентральной поверхности каждого уха кролика наносились по 2-е полнослойные кожные раны площадью 1 см², общим число по 3 измерения на точку. После чего непосредственно на раневую поверхность помещались клеточные трансплантаты ММСКПК, полученные в условиях 2D и 3D культивирования. В качестве отрицательного контроля использовали физиологический раствор, который помещали на раневую поверхность в соответствующем количестве. Для закрытия раневого дефекта с клеточными трансплантатами и контролем использовали полиуретановое покрытие (Tegaderm; 3M Health Care, St. Paul, MN), которое изолированно помещали на каждую рану. Визуальную и гистологическую оценку проводили на 1, 6, и 12 сутки. В результате исследования наблюдались различия в сроках эпителизации и морфофункциональном состоянии раны в зависимости от типа клеточного трансплантата. Использование 3D клеточных трансплантатов ММСКПК значительно ускоряло процесс репаративной регенерации кожных дефектов, что позволяет гово-

речь о перспективности дальнейших разработок биотехнологических методов направленной коррекции с использованием сфероидов — клеточных трансплантатов, полученных методами 3D культивирования.

Межклеточный транспорт цитоплазмы и органелл в совместной культуре мультipotентных стромальных клеток и клеток почечных канальцев

Плотников Е. Ю.¹, Хряпенкова Т. Г., Галкина С. И.¹, Сухих Г. Т.², Зоров Д. Б.¹

¹НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, ²ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи, Москва; plotnikov@genebee.msu.ru

Целью данной работы было исследование механизмов взаимодействия мультipotентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) с культивируемыми клетками почечных канальцев крыс.

Нами была исследована возможность транспорта цитоплазмы и органелл между ММСК и клетками эпителия почечных канальцев крысы при сокультивировании. Было выявлено, что через 24 часа сокультивирования между ММСК и клетками почки наблюдается обмен флуоресцентными зондами.

При цитометрическом исследовании на разных сроках сокультивирования было обнаружено, что сразу после смешивания культура разделяется на две популяции с разной интенсивностью флуоресценции митохондриального зонда. Уже через 3 часа наблюдался сдвиг популяции, нагруженной Mitotracker, в сторону уменьшения интенсивности флуоресценции. Эта тенденция продолжала развиваться к 24 часам; к 48 часам сокультивирования пики обеих популяций практически сливались. Таким образом, происходит транспорт митохондриального красителя, то есть ММСК передают окрашенные Mitotracker митохондрии в клетки почки.

Аналогично исследовался обмен цитоплазматическим содержимым и мембранными компонентами.

Можно сделать вывод, что межклеточные контакты, образующиеся между двумя разными типами клеток — ММСК и клетками эпителия почечных канальцев крыс — способны осуществлять транспорт митохондрий и различных цитоплазматических и мембранных компонентов.

Кроме того, было показано, что во время совместного культивирования ММСК и клеток почки в стволовых клетках запускается синтез специфици-

ческих почечных белков. Возможно, именно образование межклеточных контактов и передача цитоплазматического материала направляют ММСК по пути дифференцировки в почечный эпителий.

Обнаруженные явления транспорта внутриклеточных компартментов могут служить одним из путей, обеспечивающих терапевтический эффект при пересадке ММСК в ткань почки. В частности, ММСК могут служить донорами цитоплазматических сигнальных молекул, стимулирующих регенерацию клеток органа и предотвращающих их запрограммированную гибель в условиях ишемии или иных стрессорных воздействий. С другой стороны, возможным последствием транспорта цитоплазматического материала из клеток почки в ММСК может быть направление дифференцировки ММСК в соответствующие специализированные клетки.

Работа поддержана грантами РФФИ 09–04–13663-офи_ц, 11–04–00771 и 11–04–01307.

Проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у пациентов с ишемической болезнью сердца

Повещенко О. В.,¹ Ким И. И.,¹ Бондаренко Н. А.,¹ Янкайте Е. В.,
¹Хабаров Д. В.,¹ Покушалов Е. А.,² Романов А. Б.,
²Сергеевичев Д. С.,² Повещенко А. Ф.,¹ Коненков В. И.

¹*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН,
Новосибирск, Россия*

²*ФГУ «НИИ патологии кровообращения им. ак. Е. Н Мешалкина
Минздравсоцразвития», Новосибирск, Россия*

В связи с развитием клеточных подходов в регенеративной медицине все больший интерес привлекает возможность прогениторных клеток стимулировать ангиогенез. В этих целях перспективными и востребованными признаются эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) костного мозга. Введение гранулоцитарного колоние-стимулирующего (Г-КСФ) фактора приводит к мобилизации из костного мозга не только гемопоэтических предшественников, но и ЭПК.

Целью нашего исследования явилась фенотипическая характеристика мононуклеарных клеток периферической крови после мобилизации Г-КСФ и их проангиогенных свойств у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС).

Материалы и методы. В исследование включено 67 пациентов ИБС с III–IV функциональным классом хронической сердечной недостаточнос-

ти (НУНА), которым в течение 5 дней вводили рекомбинантный человеческий Г-КСФ. Введение моноклеаров осуществляли интрамиокардиально с помощью навигационной системы NOGA XP в 10 точек сердца количеством 3×10^8 клеток. Перфузия миокарда у пациентов оценивалась по данным сцинтиграфии.

Результаты

Показано, что введение препарата Г-КСФ приводит к мобилизации ЭПК из костного мозга в периферическую кровь. Содержание CD34+/133+ клеток возрастает в 12,8 раз и составляет к 6 суткам $0,1 \pm 0,07$ %, количество CD34+/VEGFR2+ эндотелиальных предшественников составляет $0,13 \pm 0,07$ %. Через 6 месяцев после интрамиокардиального введения МНК у 76 % пациентов улучшились показатели перфузии в сегментах, в которые вводили МНК, у 24 % пациентов перфузия миокарда осталась без изменения или ухудшилась. Визуализация отсроченных сцинтиграмм с оценкой перераспределения изотопа в миокарде как суммы баллов исследуемых сегментов показала, что суммарная оценка области сниженного накопления препарата (дефекты перфузии или гипоперфузия) в миокарде левого желудочка на этапе покоя составила 24 ± 11 балла до лечения, 19 ± 13 через 6 месяцев и 21 ± 12 к 12 месяцам наблюдения. Также уменьшилось количество участков гипоперфузии на нагрузочном этапе (в ответ на инфузию аденозина) до 22 ± 12 и 23 ± 10 к 6 и 12 месяцам соответственно по сравнению с показателем 27 ± 11 баллов до лечения. В группе пациентов с улучшением перфузии количество CD34+/133+ ЭПК было в 3 раза увеличено по сравнению с группой пациентов с ухудшением. Количество CD133+/VEGFR2+ клеток не было достоверно увеличено в группе пациентов с улучшением перфузии.

Выводы. Г-КСФ эффективно мобилизует ЭПК из костного мозга в периферическую кровь у пациентов с ИБС. Улучшение перфузии ишемизированных зон сердца ассоциировано с большим количеством ЭПК несущих маркер CD34+/133+. ЭПК способны оказывать репаративное действие на ишемический миокард, способствуя неоваскуляризации.

Оценка устойчивости ММСК из жировой ткани человека условиям аноксии

Рылова Ю. В., Андреева Е. Р., Буравкова Л. Б.

ГНЦ РФ-ИМБП РАН, 123007, Хорошевское шоссе, 76а, Москва, Россия

Содержание кислорода в клеточном микроокружении является одним из важнейших факторов, определяющих функциональное состояние клеток, в том числе стволовых и прогениторных. Так крайне низкое содержание кислорода или его отсутствие в межклеточном пространстве может существенно влиять на различные морфологические и функциональные свойства клеток и вызывать изменения на уровне метаболизма. Известно, что разные клетки имеют различные пределы устойчивости к снижению содержания кислорода. Целью данного исследования являлась оценка жизнеспособности, пролиферации, уровня потребления глюкозы и активности митохондрий ММСК находящихся фазе роста (10 суток) и в состоянии монослоя (5 суток) в условиях аноксии ($\sim 0\% \text{O}_2$). В работе использовали CD73+, CD90+, CD105+ ММСК 2 пассажа, предкультивированные при 20% и 5% O_2 .

Катаболизм глюкозы начинается с гликолиза независимо от того, находятся клетки в аэробных или анаэробных условиях. Зная количество выделенного лактата и потребленной глюкозы можно определить соотношение этих метаболитов (La/Glu), которое не должно превышать 2. Результаты показали, что в культуре клеток, транспонированных в условия аноксии из 20% и 5% O_2 в фазе роста соотношение La/Glu превышало это значение в 1,3–1,8 раза что свидетельствует об активном гликолизе. Избыточный уровень лактата в среде мог образовываться в результате потребления клетками других компонентов среды роста, таких как пируват и L-глутамин. При этом содержание лактата в условиях аноксии превышало уровень в контроле в 1,2 раза. Содержание лактата в среде ММСК, помещенных в аноксию из 20% в состоянии монослоя, также в 1,2 раза превышало количество, которое можно получить из потребленной ими глюкозы. Для ММСК помещенных в аноксию из 5% соотношение La/Glu составляло 1,4, что свидетельствует о снижении гликолиза в этих клетках. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что метаболизм глюкозы ММСК идет преимущественно за счет гликолиза, при любом содержании кислорода в среде культивирования.

После того, как клетки были извлечены из аноксии, была проанализирована активность митохондрий с помощью флуоресцентного зонда

MitoTracker Red, уровень средней интенсивности флуоресценции (MFI) которого соответствует трансмембранному потенциалу митохондрий. Для ММСК, предкультивированных при 20 % и 5 % O₂, помещенных в условия аноксии в фазе роста MFI превышал значения в контроле в 1,5 и 5,3 раза, соответственно. Для клеток, помещенных в аноксию из 5 % O₂, значение MFI превышало значение для клеток, помещенных в аноксию из 20 % O₂, в 1,5 раза. Для ММСК помещенных в аноксию из 20 % и 5 % O₂ в состоянии монослоя значения MFI превышали значения в контроле в 1,6 раза, при этом для клеток, помещенных в аноксию из 5 % O₂, значение MFI было снижено в 2 раза по сравнению с ММСК, помещенными в ~ 0 % O₂ из 20 % O₂. Несмотря на отсутствие кислорода, была отмечена активная пролиферация клеток, так для ММСК, транспонированных в аноксию из 5 % O₂ прирост клеток в 1,5 раза превышал значение в контроле. Необходимо отметить, что ММСК при таком длительном сроке культивирования в условиях аноксии сохраняли высокий уровень жизнеспособности (от 80 % живых клеток в аноксии до 90 % в контроле).

Таким образом, аноксия в течение 10 суток в фазе роста и 5 суток в состоянии монослоя не оказывает значительного повреждающего воздействия на ММСК из жировой ткани человека, о чем свидетельствует высокий уровень жизнеспособности. Вероятно, такая устойчивость ММСК объясняется тем, что метаболизм глюкозы осуществляется преимущественно за счет гликолиза, генерирует достаточное количество энергии для активной пролиферации, при этом после аноксии в ММСК отмечается несколько более высокая функциональная активность митохондрий.

Влияние условий культивирования сперматогоний хряка на экспрессию генов маркеров полипотентности

Савченкова И. П., Полякова М. В., Викторова Е. В., Кулешов К. В.

*ГНУ НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко, 109428
Москва, Рязанский пр-т, 24/1, s-ip@mail.ru*

Накапливаются данные, демонстрирующие влияние ростовых факторов на поведении стволовой клетки в культуре. На сегодняшний день достоверно установлено, что факторы роста и цитокины играют важную роль, как в поддержании *in vitro* сперматогоний типа А млекопитающих, в том числе человека, так и в индукции их полипотентного статуса. Исследование молекулярных механизмов перехода половых клеток к полипотентному со-

стоянию может выявить важные стороны в роли транскрипционных регуляторов и клеточного окружения в индукции полипотентности. Целью нашего исследования было изучить влияние условий культивирования сперматогоний хряка на экспрессию генов маркеров полипотентности. В качестве объекта использовали клеточные клоны, полученные нами ранее в двух экспериментальных группах. В первой, клоны были получены при краткосрочном (7–10 сут) культивировании сперматогоний типа А хряка на фидерном слое, представленном клетками Сертоли, а во второй группе в качестве фидерного слоя использовали клетки STO. Затем все клеточные клоны переносили и продолжали культивировать в условиях, используемых для культивирования ЭСК: на фидерном слое STO в присутствии фактора подавляющего активность дифференцировки (DIA), который идентичен фактору, ингибирующему лейкемию (LIF), в течение 3–4 нед. Клеточные клоны сперматогонияльных клеток анализировали на экспрессию генов-маркеров фенотипа эмбриональных стволовых, первичных половых и сперматогенных клеток: NANOG, PLZF, POU5F1 и VASA в полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для сравнения использовали свежеизолированные половые клетки, выделенные из тестикул хряков 60 сут возраста той же породы, из которой были получены культуры клеток сперматогоний. Уровень мРНК и количество копий генов оценивали в режиме относительных измерений ($\Delta\Delta C_t$ -метод). Продукт экспрессии гена PLZF был обнаружен в свежеизолированных половых клетках и клонах, которые были изначально получены при культивировании сперматогоний хряка на монослое клеток Сертоли. В этих же клонах были выявлены продукты экспрессии генов NANOG и VASA. Экспрессия гена NANOG в экспериментальных клеточных клонах превышала экспрессию этого гена в свежеизолированных половых клетках в 200 раз, а гена VASA в 350 раз. В клонах, полученных изначально на STO, и далее культивируемых в присутствии DIA, продукты экспрессии этих генов не были выявлены. В отличие от клонов, у которых на начальных этапах культивирования присутствовали клетки Сертоли, в этих клонах был обнаружен продукт экспрессии гена POU5F1. Кроме того, иммуноцитохимический анализ показал, что SSEA-1 Ag экспрессируется на поверхности только этих клеточных клонов. Таким образом, в клонах с ЭСК морфологией, полученных в результате длительного культивирования сперматогоний хряка, в ростовой среде для ЭСК, дополненной DIA на фидерном слое STO, была выявлена щелочная фосфатаза, экспрессия SSEA-1 и POU5F1, что могло свидетельствовать о частичной реактивации транскрипционных факторов полипотентности.

Работа поддержана грантом РФФИ 10–04–01471-а

Трансплантация микроглия-подобных клеток трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза и болезни Альцгеймера

Салафутдинов И. И.^{1,3}, Масгутов Р. Ф.^{1,2,3}, Масгутова Г. А.^{1,2},
Мухамедьяров М. А.², Исламов Р. Р.^{1,2}, Ризванов А. А.^{1,2,3}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия; ³ГУЗ «Республиканская клиническая больница». E-mail: sal.ilnur@gmail.com

Введение. Нейродегенеративные заболевания (НЗ) такие, как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (БАС) и др. поражают 20–25 % пожилого населения России и всего мира. К сожалению, медицина до сих пор не располагает адекватными методами терапии НЗ. Как результат, существует необходимость поиска новых, патогенетических подходов к лечению НЗ с использованием новейших достижений медицинской и биологической науки, в том числе на основе генных и клеточных технологий. Особое значение приобретают клеточные технологии на основе аутологичных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS).

Цель работы. Оценить миграцию, выживаемость и распределение микроглия-подобных клеток после трансплантации трансгенным мышам B6SJL-TG (SOD1-G93A) d11Gur/J (модель БАС) и B6C3-Tg (APP695) 85Dbo Tg (PSEN1) 85Dbo (модель БА).

Материалы и методы. Микроглия-подобные клетки (iPSdM) были получены ранее с помощью направленной дифференцировки iPS и имели фенотип CD45+, CD11b+, F4/80+, Iba1+ и β -III-Tubulin-. Клетки трансплантировали животным (1 миллион) путём внутривенного введения в хвостовую вену. Через 2 и 7 дней после трансплантации клеток проводили забор тканей подопытных животных и иммуногистохимический анализ с помощью антител к ядерному антигену человека (HNu).

Результаты. Установлено, что распределение трансплантированных клеток носило системный характер. Большинство HNu+ клеток было локализовано в печени. Отмечена значительная локализация HNu+ клеток в головном и спинном мозге трансгенных мышей как с БАС, так и с БА. При этом не наблюдалось отличий в распределении и морфологии трансплантированных клеток. Таким образом, показано, что трансплантированные iPSdM клетки выживают, активно мигрируют в очаги нейродегенерации и сохраняют фенотип микроглия-подобных клеток.

Заключение. Аутологичные iPSdM клетки могут стать перспективным клеточным материалом для различных клеточных и генно-клеточных терапевтических протоколов терапии НЗ.

Терапевтический потенциал клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при регенерации дефектов периферических нервов

Салафутдинов И. И.^{1,3}, Масгутов Р. Ф.^{1,2,3}, Богов А. А.^{1,3}, Ризванов А. А.^{1,2,3}, Ханнанова И. Г.³, Муллин Р. И.³, Богов А. А.³

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²Казанский государственный медицинский университет; ³ГУЗ «Республиканская клиническая больница», Казань, Россия
E-mail: sal.ilnur@gmail.com

Клеточная терапия с использованием стволовых и прогениторных клеток может рассматриваться как потенциальная стратегия для терапии различных дефектов периферических нервов. Одним из перспективных источников клеточного материала для этих целей — аутологичные клетки стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СВФЖТ), которые способны активно секретировать различные трофические и проангиогенные факторы (VEGF, bFGF, HGF, IGF-I и др.), необходимые для процессов ревазуляризации в зоне повреждения. «Золотым» стандартом в реконструкции поврежденного нерва является аутонервная пластика кондукта, при которой поврежденный участок нерва замещается аутотрансплантатом нерва. Основным недостатком такого метода считают слабую ревазуляризацию и, как следствие, низкую приживаемость трансплантата, что приводит к его некрозу и дегенерации. Прогноз по приживаемости трансплантата ухудшается с увеличением его длины.

В проведенном исследовании мы получали клетки СВФЖТ человека из подкожной жировой клетчатки, полученной в ходе плановой липосакции. Выделенные аутологичные клетки трансплантировали локально в зону оперативного шва, интраневрально в периферический и центральный отрезки поврежденного нерва, а также в саму вставку (длина вставки варьировала от 4 до 10 см).

Спустя 14–28 суток после аутонервной пластики и трансплантации клеток СВФЖТ было констатировано появление болевой и тактильной чувствительности. Первые признаки восстановления двигательной функции наблюдали на 41 сутки после реконструкции периферического нерва.

У всех пациентов восстановление чувствительности достигало показателя S3-S4 (S5 нормальная болевая чувствительность) вне зависимости от длины аутонервной вставки. Также мы не наблюдали иммунологических реакций и реакций отторжения трансплантата.

Таким образом, можно заключить, что метод трансплантации клеток СВФЖТ в сочетании с хирургическими методами лечения в значительной степени повышает приживаемость аутонервного трансплантата, стимулирует его реваскуляризацию, восстановление чувствительной и двигательной активности. Предложенный метод может значительно повысить эффективность операций при реконструкции периферических нервов.

Сравнительный анализ матричных и остеоиндуктивных свойств спектра 3D-материалов в тканеинженерных конструкциях с аутологичными ММСК

Сергеева Н. С.¹, Свиридова И. К.¹, Комлев В. С.², Кирсанова В. А.¹,
Ахмедова С. А.¹, Фадеева И. В.², Шанский Я. Д.¹

¹ ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена» Минздравсоцразвития России

² Учреждение Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова РАН

Цель исследования. Проведение сравнительной медико-биологической оценки натуральных кораллов (НК) различной таксономической принадлежности для использования их в качестве 3D-матриков в тканеинженерных конструкциях (ТИК) с аутологичными ММСК для реконструкции костных дефектов.

Материалы и методы. Для медико-биологических испытаний была использована охарактеризованная физико-химическими методами (рентгенофазовый и элементный анализ, ИК-спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия) коллекция образцов НК, относящихся к 10 семействам и 23 видам. В экспериментах НК использовали в гранулированном виде (размер гранул 300–600 мкм). Исследование острой цитотоксичности и матричных (для клеток) свойств поверхности НК проводили *in vitro* в динамике культивирования иммортализованных фибробластов человека (1, 3, 7, 10 и 14 сутки) с помощью МТТ-теста. Биосовместимость оценивали при подкожной имплантации образцов НК мышам, остеопластические потенции — на модели костного дефекта крыс линии Вистар (краевая ре-

зекция большеберцовой кости). Для получения ТИК аутологичные ММСК животных (II–IV пассаж) переносили на образцы НК и культивировали в течение 7–10 суток. Оперативные вмешательства на животных проводили под общей анестезией. В фиксированные сроки животных выводили из эксперимента, область дефекта с окружающими тканями фиксировали в 10 % растворе забуференного формалина и затем декальцинировали с помощью 0,3М раствора ЭДТА. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином и проводили световую микроскопию.

Результаты. Показано, что все исследованные образцы НК по химическому составу представлены кальцитом (CaCO_3), кристаллическая решетка — арагонит (исключение — *Montipora digitata* и *Pocillopora eudouxu*). Кроме этого установлено, что все НК содержат примеси переходных металлов на уровне предельно допустимых значений (стандарт ASTM 1185). Согласно результатам СЭМ представленные образцы НК различаются степенью пористости (40–60 %), размером пор (от 500 до 2000 мкм) и толщиной межпоровых перегородок. В экспериментах *in vitro* установлено, что за исключением одного токсичного для клеток образца НК (*Helipora coerulea*) все остальные виды нетоксичны и обладают выраженными матричными свойствами поверхности, т.е. способствуют эффективной адгезии и активной экспансии поверхности кораллов клетками. В модельных экспериментах с использованием раствора SBF (simulated body fluid) обнаружено, что данные образцы НК постепенно резорбируются, при этом, в процессе их биодеградации, происходит отложение биоактивного гидроксиапатитового слоя. Для дальнейших экспериментов *in vivo* было отобрано 5 наиболее перспективных (согласно результатам предыдущего этапа исследования) образцов НК, принадлежащих к трем семействам: — *Acroporidae*, *Faviidae* и *Pocilloporidae*. Данные образцы НК обладают биосовместимостью и выраженными (в разной степени) остеокондуктивными/остеоиндуктивными свойствами. Использование ТИК на основе отобранных видов НК в качестве 3D-матрикса и аутологичных ММСК приводит к органотипическому восстановлению костного дефекта у крыс в более ранние (по сравнению с чистыми НК) сроки. Процесс репаративного остеогенеза в этих группах животных сопровождается мощным периостальным и энхондральным остеогенезом, активным формированием новых сосудов, восстановлением гемопоэза

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства г. Москвы, Государственный контракт № 8/3–42н-09.

Влияние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на активацию лимфоцитов периферической крови *in vitro*

Суздальцева Ю. Г.², Рубцов Ю. П.¹, Горюнов К. В.¹, Ткачук В. А.^{1,2}

¹*Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва*

²*ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс», Москва*

Возможность широкого использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в медицине основана на их способности участвовать в регуляции воспалительных процессов в организме. Однако, несмотря на то, что данная проблема крайне актуальна, до сих пор не известен детальный молекулярный механизм этой регуляции. На сегодняшний день известно, что лимфоциты и другие клетки иммунной системы выделяют в очаге воспаления большой спектр провоспалительных факторов, в том числе белки-цитокины TNF- α , IFN- γ , IL-1 α и β . В ответ на это МСК выделяют ряд факторов, физиологический эффект которых состоит в подавлении воспалительной реакции. Взаимная регуляция включает воздействие клеток иммунной системы и медиаторов иммунного ответа (цитокinov, хемокинов, простагландинов и др.) на МСК, а также ответное воздействие МСК на клетки иммунной системы. Предполагается, что факторы супрессии секретируются МСК не постоянно, но требуют динамического перекрестного воздействия между МСК и лимфоцитами. Известно, что МСК подавляют активацию лимфоцитов в очаге воспаления: блокируют пролиферацию активированных Т-лимфоцитов и натуральных киллеров, супрессируют созревание дендритных клеток, индуцируют увеличение пропорции регуляторных Т-клеток (CD4+CD25+Foxp3), способствуют снижению секреции иммуноглобулинов В-клетками и др.

Иммunosупрессивные свойства МСК жировой ткани изучали в экспериментах с использованием методики кокультивирования МСК и лимфоцитов периферической крови, разделенных между собой полупроницаемой мембраной или находящихся в непосредственном физическом контакте друг с другом. Для активации лимфоцитов использовали фитогемагглютинин. Было выявлено, что иммуносупрессивные свойства МСК зависят от соотношения МСК и лимфоцитов в кокультуре. При кокультивировании МСК и активированных лимфоцитов в соотношении 1:100 в культуральной среде концентрации IFN- γ и TNF- α значительно повышались. Уровень этих цитокинов в 1,5 раза превышал суммарный уровень IFN- γ и TNF- α ,

детектируемый в супернатантах отдельных культур МСК и лимфоцитов. При этом концентрация IFN- γ увеличивалась в кокультуре МСК и лимфоцитов только при наличии межклеточных контактов, а концентрация TNF- α селективно повышалась в системе с использованием полупроницаемых мембран. В то же время при кокультивировании МСК и активированных лимфоцитов в соотношении 1:10 концентрация TNF- α в культуральной среде снижалась в 3 раза, а концентрация IFN- γ снижалась в 1,5–2 раза по отношению к суммарным концентрациям IFN- γ и TNF- α , выделяемым каждой культурой по отдельности, независимо от наличия или отсутствия межклеточных контактов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что МСК, по-видимому, могут регулировать активацию клеток иммунной системы при воспалительных процессах. Эта регуляция может достигаться за счет двух различных механизмов, в частности, зависящего от клеточных контактов и действия IFN- γ на МСК, либо зависящего от продукции растворимых факторов и действия TNF- α . Данные альтернативные механизмы активации лимфоцитов могут использоваться на разных стадиях воспалительного процесса, обуславливая более специфическое и эффективное действие МСК.

Опыт клинического применения мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из стромы пуповины новорожденного, для лечения хронических ран

Суздальцева Ю. Г., Жидких С. Ю., Пар В. И., Бурунова В. В., Горюнов С. В., Смирнова Г. О., Жидких Н. В., Воронов А. В., Ярыгин К. Н., Ступин В. А.

Российский научно-исследовательский медицинский университет, Москва

Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для лечения широкого спектра заболеваний обусловлено доступностью материала для выделения этих клеток, их высокой пролиферативной активностью в культуре, значительным дифференцировочным потенциалом, выраженными иммуносупрессивными свойствами, возможностью использования МСК для аллогенных трансплантаций, множественными паракринными эффектами, способностью к направленной миграции МСК в места поражения тканей.

Целью данной работы являлось исследование возможности применения МСК, выделенных из стромы пуповины новорожденного, в терапии длительно незаживающих ран. Были выделены клетки из пуповины (Вартони-

ева студня) человека после нормальных родов на 38–40 неделе гестации. Культивированные адгезивные клетки стромы пуповины были охарактеризованы по цитофенотипическим признакам и по способности к дифференцировке в жировую, хрящевую и костную ткань, проверены на инфекционную безопасность.

Проведены доклинические испытания острой токсичности суспензии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пуповины при подкожном введении крысам. На всех сроках исследования животные оставались активными, в их состоянии не наблюдали никаких отклонений. Проведенные исследования показали, что суспензия МСК пуповины является не токсичной и апирогенной и может быть использована в клинических исследованиях с участием человека.

Были исследованы эффективность и безопасность подкожного введения суспензии МСК пуповины на модели острых ран у мышей. При оценке скорости заживления ран в сроках 3, 6, 12, 18 суток различий в группах выявлено не было. В основной группе раны заживали без выраженного струпа и признаков воспалительной реакции, что обеспечивало формирование более мягкого рубца.

В I фазе клинических испытаний с участием здоровых добровольцев было установлено, что подкожные инъекции суспензии МСК пуповины не приводили к появлению нежелательных реакций местного и системного характера.

Во II фазе клинических испытаний суспензия МСК пуповины была использована для лечения хронических ран. В исследовании приняло участие 108 пациентов, имевших хронические раны различной этиологии (хроническую венозную недостаточность, хроническую артериальную недостаточность, синдром диабетической стопы, пролежни и смешанную патологию), которые были рандомизированы в группу клеточной терапии (59 человек) и группу сравнения (49 человек) согласно критериям включения и исключения. После начала клеточной терапии у больных основной группы в течение первых 15 суток отмечали выраженный рост и созревание грануляционной ткани, улучшение микроциркуляции крови и ускорение эпителизации в раневом дефекте по сравнению с контрольной группой больных. Полученные данные продемонстрировали, что применение суспензии МСК пуповины активизирует репаративные процессы в хронических раневых дефектах и приводит к значимому, статистически достоверному ускорению заживления ран в группе клеточной терапии по сравнению с контрольной группой в отмеченный период времени.

Положительный эффект клеточной терапии в лечении длительно незаживающих ран, выражающийся в активизации репаративных процессов в хроническом раневом дефекте, может быть объяснен паракринным действием МСК пуповины, которые экспрессируют ростовые и ангиогенные факторы, стимулирующие рост сосудов, и приводящие к улучшению трофики в тканях. МСК пуповины экспрессируют также такие матриксные белки как фибронектин, коллаген, которые создают благоприятное для роста эпителия микроокружение. Недавно проведенные исследования показали, что МСК пуповины подавляют экспрессию провоспалительных факторов и медиаторов в очаге воспаления и таким образом блокируют хронический воспалительный процесс.

Анализ отдаленных (1-2 года) результатов у больных, прошедших курс клеточной терапии, показал, что у пациентов новых, клинически значимых заболеваний, в том числе новообразований, выявлено не было. В большинстве случаев применение клеточной терапии приводило к значительному уменьшению площади ран или полному заживлению ран без рецидивов.

Проведенные ограниченные клинические исследования показали, что применение суспензии МСК пуповины для клеточной терапии раневых дефектов является эффективным и безопасным методом в лечении длительно незаживающих ран.

Использование фторуглеродных эмульсий, стабилизированных проксанолом и фосфолипидами, для введения в стволовые клетки лекарственных веществ

Хубутя М. Ш.¹, Темнов А. А.¹, Лысков Н. Б.¹, Склифас А. Н.²,
Кукушкин Н. И.², Белый Ю. А.³

¹НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва; ²Учреждение РАН ИБК РАН, Пущино; ³Калужский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Росмедтехнологии»

В ряде работ показано, что фторуглеродные частицы (ФЧ) легко проникают в стволовые клетки и могут служить их метками при введении в организм человека и животных. Кроме того, ФЧ способны сорбировать на своей поверхности лекарственные вещества (ЛВ) и пептидные препараты, что позволяет ввести их в стволовые клетки с целью адресной доставки в органы. Сорбция ЛВ может зависеть от состава поверхностно активного

вещества, стабилизирующего эмульсию и от физико-химических свойств молекул ЛВ.

Целью данной работы было изучить сорбцию ЛВ на поверхности ФЧ стабилизированных проксанолом 268 или фосфолипидами, и оценить способность таких частиц проникать внутрь стволовых клеток человека.

Материалы и методы. В работе использовались ФЧ, состоящие из перфтордекалина и перфтороктилбромида. В качестве ЛВ, сорбированных на ФЧ, использовали: Радахлорин, Фотосенс, доксорубицин и пептидные препараты. Процесс сорбции контролировали на сканирующем спектрофотометре DU-800. Частицы с сорбированными ЛВ, вводили в стволовые клетки человека, выделенные из костного мозга. Функциональное состояние меченных клеток оценивали с помощью МТТ теста и на биостанции «Nikon», позволяющей наблюдать за ростом клеток в течение 24 часов.

Результаты: Было показано, что сорбция ЛВ на ФЧ происходит в течение 5 минут и зависит от гидрофобно-гидрофильных свойств молекулы ЛВ. Так гидрофильный препарат Радахлорин преимущественно сорбируется на частицах, стабилизированных проксанолом 268, а гидрофобный Доксорубицин — на частицах, стабилизированных фосфолипидами. Пептидные препараты сорбировались только на поверхности проксанольных частиц. Проникновение в цитоплазму клеток проксанольной эмульсии происходило в течение 60–90 минут, а фосфолипидной эмульсии в течение 12–16 часов. Проведенные тесты показали, что введение ФЧ, содержащих ЛВ, в цитоплазму стволовых клеток не снижает их пролиферативную и функциональную активность.

Опыт получения и использования пептидов, секретлируемых стволовыми клетками костного мозга

Хубутя М. Ш.¹, Темнов А. А.¹, Лебедев М. П.¹, Фомина О. П.², Жалимов В. К.³

¹ НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва,
Б. Сухаревская пл., д. 3

² Ветеринарная клиника «Шерри», Москва, ул. Менжинского, 6

³ Учреждение РАН ИБК РАН, Пушкино, ул. Институтская, д. 3

В исследованиях последних лет показано, что в основе положительных клинических эффектов применения стволовых клеток лежат паракринные механизмы, обусловленные белковыми факторами, секретлируемыми стволовыми клетками.

Целью данной работы было получение пептидов, секретируемых стволовыми клетками костного мозга, и оценка перспективы их использования.

Материалы и методы. Сотрудники лаборатории клеточных и физико-химических медицинских технологий НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского разработали алгоритм выделения и культивирования клеток костного мозга с использованием тканеспецифических антигенов и ростовых факторов для повышения биологической активности конечного продукта. В качестве источника стволовых клеток использовали костный мозг лабораторных животных. Из культуральной среды методом ультрафильтрации получали фракцию пептидов массой до 50 кДа. Данная фракция, по данным литературы, обладает крайне низкой реактогенностью и иммуногенностью. Затем готовый продукт подвергали концентрированию и лиофилизации.

Результаты. Препарат показал высокую эффективность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. При добавлении пептидного препарата к культуре фибробластов человека, предварительно обработанных цисплатином (5мкг/мл), наблюдалось достоверное снижение гибели клеток (до 35 %), тогда как в контрольной группе (цисплатин) гибель клеток составила 65 %.

In vivo были получены положительные результаты при лечении почечно-печеночной комы у лабораторных животных и животных, поступивших на лечение в ветеринарные клиники. При использовании пептидов на фоне стандартной терапии отмечается быстрая положительная динамика, которую не удастся добиться только применением стандартной терапии.

Проведенные эксперименты, а также отзывы врачей ветеринарных клиник, дают основания полагать, что данное направление может быть перспективным. Научная новизна данного подхода защищена патентами РФ.

Роль пероксида водорода в регуляции поляризации и миграции фибробластов

Тюрин-Кузьмин П. А.¹, Агаронян К. М.¹, Белоусов В. В.², Ткачук В. А.¹,
Воротников А. В.¹

¹*Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова,
Ломоносовский проспект, д.31, корп.5, Москва 119192, Россия*

²*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, E-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com*

Миграция клеток осуществляется на всех этапах эмбрионального развития, во многих физиологических процессах, таких как регенерация

и иммунный ответ, а также при патологиях, например, метастазировании злокачественных опухолей. В клеточной биологии важное место занимает изучение молекулярных механизмов регуляции миграции клеток. Их понимание может привести к выработке принципиально новых средств для нормализации метаболизма, нарушения которого характерны для большинства болезней.

Миграция клетки может направляться как внешними факторами, такими как хемоаттрактанты (направленная миграция или хемотаксис), так и внутренними, которые определяются природными способностями клетки (от англ. *intrinsic*, врожденные). Хемотаксис происходит при ангиогенезе, росте аксонов, во время привлечения лейкоцитов в область воспаления, а фибробластов — в зону повреждения ткани, а также при других процессах. Однако в отсутствие направляющих стимулов клетки движутся произвольно, руководствуясь внутриклеточными факторами, которые поляризуют клетку в направлении движения. Например, фибробласты могут не направляться извне при движении в толще соединительной ткани, поддерживая её гомеостаз и осуществляя ремоделирование. В настоящей работе был исследован пероксид водорода как внутриклеточный фактор, обеспечивающий поляризацию и произвольную миграцию фибробластов в отсутствие хемотактических градиентов.

Для успешной миграции необходимо одновременное осуществление двух процессов. Первый процесс — повышение двигательной активности клетки за счет ускорения актиновой динамики. Второй — морфологическая поляризация (формирование ламеллы, определяющей передний край клетки, и задней части клетки). Градиент липидной сигнальной молекулы фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата (PIP3) в плазматической мембране считается одним из основных механизмов, определяющих направление поляризации клеток. В области повышенной концентрации PIP3 активируется малая ГТФаза Rac1, которая запускает на переднем крае построение сети актинового цитоскелета и выдвигание ламеллоподии с последующим формированием ламеллы. В условиях хемотаксиса градиент PIP3 задается неравномерной активацией рецепторов хемоаттрактанта, и этот процесс достаточно хорошо изучен, однако о механизмах поляризации фибробластов в отсутствие внешних направляющих факторов практически ничего не известно.

Пероксид водорода (H_2O_2) в последнее время рассматривается как потенциально важный регулятор миграции и пролиферации клеток, функционирующий в качестве вторичного посредника (Niethammer et al., 2009, San Martin & Griendling, 2010). В то же время, хорошо известна его роль в развитии окислительного стресса и его токсичного действия, а также в реали-

защитных функций лейкоцитов. Мы предположили, что H_2O_2 может являться одним из регуляторов произвольной миграции клеток. В настоящей работе исследовано участие H_2O_2 в сигнальных механизмах миграции и его возможная роль как фактора поляризации клеток.

Мы показали динамику образования и распределения H_2O_2 в цитоплазме мигрирующих клеток. Также мы предложили механизм, объясняющий роль H_2O_2 в определении направления движения клеток. Для того чтобы получить возможность наблюдать за динамикой синтеза H_2O_2 в цитоплазме мигрирующих клеток, мы разработали и оптимизировали методики долговременной (в течение суток) прижизненной цейтраферной конфокальной и флуоресцентной микроскопии мигрирующих клеток. При помощи методов одновременной биосенсорной детекции H_2O_2 и РІРЗ мы сравнили динамику синтеза этих молекул в цитоплазме движущихся фибробластов. Мы выяснили, что пероксид водорода избирательно образуется на переднем крае движущихся клеток. Изменение положения области накопления H_2O_2 внутри клетки сопровождалось соответствующим смещением зоны псевдоподиальной активности и изменением направления движения клетки. Таким образом, пероксид водорода представляется новым важным регулятором рецептор-зависимых сигнальных каскадов и направленного движения клеток.

Три стратегии высокодозной терапии с аутологичной трансплантацией кроветворных стволовых клеток в лечении рассеянного склероза

Шевченко Ю.Л., Новик А. А., Кузнецов А. Н., Федотов Ю. Н.,
Ионова Т. И., Мельниченко В. Я., Федоренко Д. А., Карташов А. В.,
Круглина Р. В., Курбатова К. А.

*Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова,
105203, Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 70*

Введение: Существующие методы лечения рассеянного склероза (РС) не позволяют достичь выраженного и устойчивого терапевтического эффекта. Новым перспективным методом лечения РС является высокодозная терапия с трансплантацией кроветворных стволовых клеток (ВДТ+ТКСК). Выделяют три вида трансплантации, отличающиеся по целям и времени ее проведения. Цель исследования — изучить эффект ВДТ+ТКСК на клиническое течение заболевания у больных с разными формами и стадиями РС в зависимости от вида трансплантации.

Материалы и методы: В исследование включены 217 больных РС (71 пациент с вторично-прогрессирующим течением, 35 — с первично-прогрессирующим, 104 — с рецидивирующе-ремиттирующим и 7 — с прогрессирующе-рецидивирующим течением): 88 мужчин, 129 женщин; средний возраст — 32,5 года (от 17 до 54 лет). Из них 120 больных не получали консолидирующей терапии после ВДТ+ТКСК, 97 — получали консолидирующую терапию. 96 пациентам была проведена ранняя трансплантация, 113 — поздняя трансплантация, 8 — трансплантация спасения. Медиана EDSS до ВДТ+ТКСК — 4.0 (от 1.5 до 8.5). Длительность наблюдения за больными после ВДТ+ТКСК — в среднем 34 месяца (от 2 до 148 месяцев). Клинические параметры оценивали до трансплантации, при выписке из стационара, через 3, 6, 9 и 12 месяцев после трансплантации, затем каждые 6 месяцев в течение первых 4 лет и далее ежегодно.

Результаты: У подавляющего большинства больных через 6 мес после ВДТ+ТКСК имелся либо клиническое улучшение, либо стабилизация заболевания. В отдаленный период после ВДТ+ТКСК (средний срок наблюдения 42 месяца) в группе больных, которым не проводили консолидацию, клинический ответ наблюдался у 80 % больных: из них у 38 % больных — клиническое улучшение, у 42 % больных — стабилизация заболевания. У 20 % больных наблюдалось ухудшение состояния. В группе пациентов, которым проводили консолидирующую терапию (средний срок наблюдения — 30 месяцев), наблюдали клиническое улучшение у 53 % больных, стабилизацию заболевания — у 43 % больных, ухудшение — у 4 % больных. У больных, которым проводили раннюю трансплантацию, клиническое улучшение наблюдалось у 40 % больных, стабилизация — у 56 % больных, ухудшение — у 4 % больных; у больных после поздней трансплантации/трансплантации спасения клиническое улучшение имелось у 32 % больных, стабилизация — у 48 % больных, ухудшение — у 20 % больных.

Заключение: ВДТ+ТКСК является эффективным методом лечения больных с разными формами и стадиями РС. Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности проведения ранней трансплантации. Необходимы дальнейшие исследования для определения оптимальных сроков проведения трансплантации, уточнения режимов высокодозной терапии и критериев отбора больных для консолидирующей терапии.

Пространственно-временные характеристики активации эфринового рецептора EphA2 в отдельных клетках

Шаронов Г. В.^{1,2}, Мозговая М. Н.², Астапова М. В.¹,
Колосов П. М.¹, Феофанов А. В.^{1,2}

¹ИБХ РАН, Москва

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

Эфриновые рецепторы (Eph) принадлежат к классу рецепторных тирозин-киназ (РТК) и играют ключевую роль в контактном клеточном взаимодействии. Недавно показано участие EphA2 в индукции проницаемости эндотелия лимфоцитами, адгезии и имплантации бластоцисты и мобилизации стволовых клеток сердца [1–3]. В сердце человека и мыши EphA2 экспрессирован исключительно на c-Kit-позитивных стволовых клетках, в то время как его лиганд — эфрин А1 — на кардиомиоцитах [3]. В экспериментах активация EphA2 эфрином А1 индуцировала миграцию стволовых клеток в область инфаркта [3].

Активация РТК это динамический процесс, неотъемлемыми и важнейшими этапами которого являются перераспределение рецептора на мембране, изменение аффинности гомофильного взаимодействия, димеризация, объединение в кластеры и интернализация рецептора. Данные о роли этих процессов в активации рецепторов семейства Eph весьма скудны. Это обусловлено в первую очередь отсутствием отработанных методик по изучению динамических перестроек РТК в живых клетках. В данной работе мы докладываем о создании модели активации EphA2 в живых клетках, которая позволяет визуализировать связывание лиганда, кластеризацию рецептора, гомофильные взаимодействия рецептор-рецептор, интернализацию и фосфорилирование EphA2 в отдельной клетке. Данная модель основана на использовании химер EphA2 с циановым (CFP) и желтым (YFP) флюоресцентными белками в одной клетке и регистрации переноса энергии флюоресценции (FRET) между CFP и YFP. С помощью данной модели нами показан импульсный характер активации EphA2, а именно что в течение первых 5 мин после добавления эфрина наблюдается кластеризация EphA2 на мембране, увеличение интенсивности FRET (в 3–5 раз) и фосфорилирования (в 3–5 раз). При этом клетка подбирает выросты, приобретает шаровидную форму и уменьшает адгезию к пластику. В последующие 10 мин мы наблюдали интернализацию рецептора и снижение интенсивности FRET и уровня фосфорилирования до начальных значений. После интер-

нализации большая часть EphA2 оказывалась в лизосомах. В отсутствие лиганда часть EphA2 (до 30 %) также находится в фосфорилированном состоянии и в гомо-ассоциатах, однако это не приводит к изменению морфологии клетки и адгезии к субстрату. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что именно лиганд-индуцированная кластеризация рецептора и его интернализация являются сигналом к миграции клетки и механизмом подавления активации EphA2.

[1] T. C. Carpenter, W. Schroeder, K. R. Stenmark, et al., EphA2 Promotes Permeability and Inflammatory Responses to Bleomycin-induced Lung Injury, *Am J Respir Cell Mol Biol* (2011).

[2] H. Fujii, H. Fujiwara, A. Horie, et al., EphrinA1 stimulates cell attachment and inhibits cell aggregation through the EphA receptor pathway in human endometrial carcinoma-derived Ishikawa cells, *Hum. Reprod* 26 (2011) 1163–1170.

[3] P. Goichberg, Y. Bai, D. D’Amario, et al., The ephrin A1-EphA2 system promotes cardiac stem cell migration after infarction, *Circ. Res* 108 (2011) 1071–1083.

Характеристика мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани пациентов с онкологическими заболеваниями

Шашкова О. А., Самойлович М. П., Пиневиц А. А., Вартамян Н. Л.,
Климович В. Б.

*ФГБУ РНЦ радиологии и хирургических технологий,
Санкт-Петербург, Россия*

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из жировой ткани рассматривают как одно из наиболее перспективных средств для использования в регенеративной медицине, в том числе при восстановлении не затронутых опухолевым процессом тканей у пациентов, подвергавшихся лучевой и химиотерапии (ЛХТ). В большинстве случаев для исследований используют МСК, полученные от здоровых доноров, в то время как свойства МСК онкологических больных остаются малоизученными.

Задача работы состояла в исследовании ростовых характеристик и фенотипа МСК, полученных от пациентов с раком молочной железы.

Донорами МСК были женщины-носители опухоли в возрасте 47-63 лет, не подвергавшиеся ЛХТ (n=3), а также пациенты, прошедшие курсы ЛХТ (n=2). МСК выделяли из подкожной жировой ткани, получен-

ной с информированного согласия пациентов в ходе выполнения плановых хирургических операций. Контролем служили МСК, выделенные из липоаспириатов здоровых доноров. Ткань переваривали коллагеназой, полученную взвесью клеток помещали в культуральные флаконы, неприлипшие клетки удаляли через сутки. Клетки выращивали в среде DMEM-F12 с 10–20 % сыворотки эмбрионов коров при 5 % CO₂. Клетки каждого пассажа культивировали параллельно при 20 % O₂ (нормоксия) и при 5 % O₂ (гипоксия). В процессе пассирования клетки засеивали во флаконы из расчета 1,5–5 тыс. клеток/см². Удельную скорость роста вычисляли как отношение числа клеток/см² при снятии с подложки к числу клеток/см² при посеве в пересчёте на часы культивирования. Фенотипирование проводили по стандартной методике на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™. В работе использованы меченные флуорохромами антигена против CD34, CD62E, HLA-DR, CD10, CD29, CD44, CD90, CD105, CD106, CD166 (Becton Dickinson).

При культивировании в условиях гипоксии удельная скорость роста МСК, полученных от всех пациентов, была в 1,5–3,5 раза выше, чем при нормоксии.

При культивировании в условиях нормоксии МСК, полученные от пациентов, не подвергавшихся ЛХТ, обладали такой же пролиферативной активностью, как МСК здоровых доноров. Удельная скорость роста МСК от пациентов, перенесших ЛХТ, была достоверно снижена как по сравнению с контролем, так и с клетками пациентов, не получавших комбинированной терапии.

Фенотип поверхностных маркеров исследовали на популяциях МСК, полученных от пациентов, не подвергавшихся ЛХТ. МСК пациентов стабильно экспрессировали CD29, CD44, CD90 и CD166. Экспрессия CD105 и CD106 МСК, выделенными от разных пациентов, варьировала. Гипоксия оказывала одинаковое воздействие на МСК как от пациентов, так и от здоровых доноров, вызывая снижение экспрессии CD10 и CD106 (в среднем на 22 и 72 %, соответственно) и увеличение экспрессии CD166 (в среднем на 5 %). Эти изменения носили обратимый характер при переносе клеток в условия нормоксии.

Таким образом, МСК, выделенные из подкожной жировой клетчатки пациентов с раком молочной железы, не подвергавшихся ЛХТ, не отличались по ростовым характеристикам и фенотипу от МСК здоровых доноров. Пролиферативная активность МСК, полученных от пациентов после ЛХТ, была существенно снижена. Культивирование в условиях гипоксии МСК пациентов, не получавших комбинированное лечение или прошедших кур-

сы ЛХТ, стимулирует их пролиферативную активность аналогично тому, что наблюдается для клеток здоровых доноров.

Экспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы стимулирует миграцию мезенхимальных стромальных клеток при сокультивировании

Юрлова Е. И., Рубина К. А., Сысоева В. Ю., Ткачук В. А.

Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова

В настоящее время полагают, что мезенхимальные клетки играют важную роль в опухолевой прогрессии, они способны мигрировать в опухоль и стимулировать опухолевый рост. Однако мало что известно о механизмах, за счет которых клетки опухоли вызывают миграцию и пролиферацию мезенхимальных клеток.

Т-кадгерин, атипичный представитель семейства кадгеринов, не имеющий трансмембранного и цитоплазматического доменов и заякоренный на мембране при помощи гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря. Изменение экспрессии Т-кадгерина было отмечено в целом ряде опухолей и коррелирует с увеличением их роста и метастазированием.

Влияние экспрессии Т-кадгерина на миграцию мезенхимальных стромальных клеток анализировали с помощью бесконтактного сокультивирования мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани мыши (МСК-ЖТ) и клеток клонов мышинной меланомы В16F10 с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина. Клетки В16F10 трансфицировали плазмидным вектором, содержащим кДНК Т-кадгерина, или контрольной плазмидой. После клональной селекции на антибиотике экспрессию Т-кадгерина в полученных клонах проверяли методом вестерн блота. На основании денситометрического анализа были выбраны для дальнейших экспериментов три клона: контрольный клон В16F10 Т (-), клетки которого не экспрессируют Т-кадгерин, клон В16F10 Т (+) с низким уровнем экспрессии Т-кадгерина и клон В16F10 Т (++) с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина. В качестве мезенхимальных клеток в работе использовали МСК-ЖТ, которые были выделены из подкожного жира области бёдер самцов линии СВА/С57BL. В качестве контроля использовали мышинные фибробласты Н1Н3Т3 и среду с 10 % ФБС (фетальная бычья сыворотка). Было обнаружено, что среда культивирования от всех трёх клонов мышинной меланомы стимулируют миграцию МСК-ЖТ больше, чем сыворотка и среда культивирования от фибробластов мыши. Однако клоны меланомы с вы-

соким уровнем экспрессии Т-кадгерина стимулируют миграцию МСК-ЖТ в 2 раза больше, чем контрольный клон. Среды культивирования от всех 3 клонов мышинной меланомы были проанализированы методом вестерн блота на присутствие растворимой формы Т-кадгерина. Однако Т-кадгерина в среде обнаружено не было, что позволяет предполагать, что стимулирующий эффект меланомы на миграцию МСК-ЖТ, связан не со слушиванием Т-кадгерина в среду культивирования, а с секрецией хемокинов. В связи с этим в клетках клонов мышинной меланомы с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина был проанализирован профиль экспрессии различных хемокинов методом ПЦР. Было обнаружено, что в Т-кадгерин-экспрессирующих клетках меланомы по сравнению с контрольным клоном возрастает уровень экспрессии целого ряда хемокинов (CXCL10, CXCL11, CCL5, CCL7), являющихся хемоаттрактантами для МСК-ЖТ.

Таким образом, нами было обнаружено, что среда культивирования от Т-кадгерин-экспрессирующих клеток мышинной меланомы является мощным хемоаттрактантом для миграции МСК-ЖТ *in vitro*. Этот эффект обусловлен секрецией Т-кадгерин-экспрессирующими клетками меланомы ряда хемокинов в среду культивирования. Эти данные позволяют предполагать, что опухолевый рост меланомы с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина может сопровождаться активацией прилегающей стромы и ее вращением в опухолевый узел *in vivo*, что соответствует нашим предварительным данным, полученным на животной модели гематогенно метастазирующей меланомы В16F10 у мышей.

