

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ФГБНУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»



ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

СБОРНИК
НАУЧНЫХ ТРУДОВ



15–16 апреля 2021 г.
Москва

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ФГБНУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

**«РЕГЕНЕРАТИВНАЯ
БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА»**

Сборник научных трудов

15-16 апреля 2021 г.
Москва

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Председатель: профессор Л.М. Михалева
Заместители председателя: член-корреспондент РАН Л.В. Кактурский
канд. биол. наук Т.В. Безуглова

Члены редакционной коллегии:
профессор М.Н. Болтовская
докт. биол. наук Г.Б. Большакова
Р.А. Вандышева
О.А. Васюкова
докт. мед. наук А.В. Ельчанинов
докт. биол. наук А.М. Косырева
докт. мед. наук Т.Х. Фатхудинов

Сборник научных трудов всероссийской научной конференции с международным участием «Регенеративная биология и медицина». — М.: ФГБНУ НИИМЧ, 2021. — 243 с.

ISBN 978-5-6044479-0-1

С32 В сборнике опубликованы результаты научных исследований, посвященных изучению как фундаментальных, так и прикладных аспектов регенеративной биологии и медицины. Рассматриваются иммунологические и молекулярно-биологические механизмы регенерации у животных и человека в норме и патологии, актуальные вопросы экспериментального моделирования регенерационных процессов, проблем клеточных технологий и тканевой инженерии. Ряд публикаций посвящен стволовым клеткам и клеткам-предшественникам. Представлены данные по доклиническим исследованиям применения клеточных технологий в медицине.

УДК 616 091 +591

Текст публикаций воспроизведен в оригинальном авторском варианте без редакторской правки. Ответственность за возможные ошибки лежит целиком на авторах.

MESENCHYMAL STEM CELLS WITH OVEREXPRESSION OF TRAIL, IL2 OR IFNA17 CAN KILL HUMAN MELANOMA CELLS

Chulpanova D.S.

Kazan Federal University, daryachulpanova@gmail.com

Introduction. Currently, immunotherapy (in particular, cytokine-based therapy) of cancer is considered as a promising method to treat various types of tumors. Cytokines and chemokines play an important role in the processes of selective destruction of tumor cells, while not affecting healthy cells of the body. Mesenchymal stem cells (MSCs) can become an ideal vector for delivering cytokines to the tumor microenvironment since they exhibit a homing behavior toward tumor sites. The aim of the study was to produce mesenchymal stem cells overexpressing TRAIL, IL2, IFNA17 or GM-CSF and analysis of its antitumor properties.

Materials and Methods. Human MSCs were isolated from adipose tissue. The cells were largely positive for MSC surface markers including CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105 and negative for haematopoietic stem cell surface markers. MSCs were transduced with recombinant lentiviral vectors encoding tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 (TRAIL), interferon alpha-17 (IFNA17), interleukin-2 (IL2), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or reporter red fluorescent protein (RFP). The gene and protein expression were confirmed by qPCR and Western blot analysis. To evaluate the influence of MSCs with overexpression of various cytokines on the melanoma M-14 cell viability M-14 cells were co-cultured with native and genetically modified MSCs in 1:1 ratio (5×10^4 cells of each type) for 72 h. Viability of M-14 cells were determined using Annexin V assay.

Results and discussion. Co-culture of M-14 cells with MSCs-TRAIL ($79.1 \pm 0.42\%$), MSCs-IFNA17 ($78.0 \pm 5.3\%$) and MSCs-IL2 ($84.45 \pm 7.5\%$) resulted in significant decrease in cell viability as compared to that when tumor cells were co-cultured with native MSCs ($93.3 \pm 0.42\%$) or MSCs-RFP ($91.75 \pm 0.49\%$). At the same time co-culture of M-14 cells with MSCs-GM-CSF increased the cell viability compared to control co-cultures.

Conclusion. The use of MSCs-TRAIL, MSCs-IFNA17 or MSCs-IL2 can be effective in the treatment of melanoma. However, further studies of MSC efficiency in animal tumor models are required. This study was supported by the Russian Science Foundation grant 18-74-10044 and Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program.

**ANALYSIS OF IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF CYTOCHALASIN B
INDUCED MEMBRANE VESICLES, ISOLATED FROM HUMAN MELANOMA CELLS
IN VITRO**

Filin I.Y.

*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia,
filin.ivy@gmail.com*

Introduction. Membrane vesicles are membrane-bound structures of various sizes and are secreted by different types of cells. The number of naturally produced membrane vesicles by cells is low. Cytochalasin B is a cell-permeable mycotoxin that has a stimulating effect on the formation of induced membrane vesicles. Cytochalasin B induced membrane vesicles (CIMVs) of tumor cells, due to their ability to fuse with recipient cells through endocytosis and release their contents into the cytoplasm of recipient cells, are considered as a promising vector for targeted delivery of various antitumor agents. CIMVs isolated from tumor cells carry the same antigens on the surface as the parent cells, so they are a promising source of tumor antigens for presentation to the cells of the immune system. In this way CIMVs of tumor cells can be used to develop therapeutic vaccines for the treatment of cancer. The immunomodulatory properties of membrane vesicles consist in the genetic modification of parental tumor cells with the interleukin 2 (IL-2) gene, which is one of the most effective cytokines that induce tumor-specific immune responses. The aim of the present work was to analyze the interaction of CIMVs isolated from human melanoma cells with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in vitro.

Materials and methods. Genetic modification of human melanoma M-14 cells was carried out with recombinant lentiviruses LV-IL-2 to obtain stable cell lines with overexpression of IL-2. The selection of cells was carried out by culturing them with the addition of a selective antibiotic (blasticidin S) to the medium. The secretion of recombinant IL-2 proteins in genetically modified tumor cells was assessed using Western blot analysis. CIMVs were obtained from human melanoma native M-14 and genetic modified M-14-IL-2 cells. PBMC were isolated by Ficoll gradient centrifugation ($1,077 \text{ г/см}^3$). After that CIMVs were added to PBMC at a concentration of 145 $\mu\text{g/ml}$ cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum. PBMC without the addition of CIMVs were used as a control. Co-cultivation of PBMC and CIMVs was carried out for 3 days, after which PBMC were stained with the following antibodies to CD3, CD4, CD8a, CD38, CD25, CD56, CD107a, CD127, HLA-DR, CCR6, CXCR3 containing a fluorescent label (all Biolegend, USA). The results were analyzed by flow cytometry using a FACS Aria III instrument (BD Biosciences) and FACSDiva software. The interaction of CIMVs and PBMC was investigated using laser confocal microscopy and flow cytometry.

Results and discussion. We have shown that CIMVs of native M-14 cells stained with Vybrant™ DiO Cell-Labeling Solution fluorescent dye are able to fuse with PBMC in co-culture, which leads to their active interaction and exchange of cytoplasmic membrane components. The difference between control T-lymphocytes without the addition of CIMVs and T-lymphocytes culturing with CIMVs by 4,3% was noted. But the difference in population of granulocytes was higher - by 27,5%. This can be explained by the ability of granulocytes to phagocytosis. It was also shown using flow cytometry that the addition of CIMVs of native M-14 and M14-IL2 cells at a concentration of 145 µg/ml increases the number of HLA-DR CD38+ T-lymphocytes compared with the control by 3% and 9,6%, respectively. An increase of T-helpers 2 (Th2) by 11,8% and 9,5% was also noted. There was an insignificant increase in the population of T-regulatory cells compared with the control by 0,8% and 3,1%, respectively. There were no statistically significant differences in the natural killer population.

Conclusion. Thus, due to the ability to present tumor antigens to cells of the immune system and activate the antitumor immune response, CIMVs of tumor cells are a promising object for the development of therapeutic antitumor vaccines. However, further studies are needed in this area to study the mechanisms of interaction of CIMVs with immune cells and possible ways of modulating the immune response.

**CHANGES OF HOX GENES EXPRESSION DURING THE REGENERATION OF
THE AQUAPHARINGEAL COMPLEX AND INTESTINAL IN THE HOLOTHURIAN
*EUPENTACTA FRAUDATRIX***

Garipova V.A.

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Vladivostok

Far Eastern Federal University, Vladivostok, Garipulia@mail.ru

Introduction. Among deuterostomes, including vertebrates, representatives of the Echinodermata type are distinguished by a wide range of possibilities for regeneration. Some species are able to restore entire systems of internal organs and large parts of the body. The most diverse manifestations of the ability to regenerate are in the class Holothuroidea. We have chosen the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* as a model object, which is an excellent research model for studying the mechanisms of regeneration. This species of holothurians completely restores the digestive system lost through controlled rejection (evisceration) in a short time (up to a month). Also, it was shown that the intestine regeneration in this species occurs through the transdifferentiation of mesodermal cells into endodermal cells and this process has been described in detail at the morphological level [Mashanov V.S., Dolmatov I. Yu., Heinzeller T., 2005].

Earlier, the involvement of hox genes in regeneration was also shown, including the regeneration of the intestine of *E. fraudatrix* [Boyko A.V. et al., 2020]. The hox genes play a major role in the correct formation of patterns of expression of Hox-regulated genes along the anteroposterior axis of the body during embryogenesis or regeneration. Despite the great attention to these genes, the study of their participation in the holothurian regeneration remains poorly understood.

The aim of the study was to determine the complete sequences of the hox gene transcripts and to study their expression during the regeneration of the intestine and aquapharyngeal complex (AC) in sea cucumbers *E. fraudatrix* after evisceration.

Materials and Methods. To establish the complete sequence of transcripts of the studied genes, the 5'- and 3'-Step-Out RACE PCR method was used. As a result of sequencing of the obtained several amplicons, the complete sequences of the coding regions of the transcripts were obtained. The study of the dynamics of gene expression was carried out using the qPCR method with the each period of regeneration (3, 5, 7, 14, 20 days) and normal. Hybridization was performed using antisense and sense (as control) RNA probes of 3 genes. AC, intestine, body wall, and also rudiments of AC and intestine were subjected to hybridization in normal conditions and at different stages of regeneration of *E. fraudatrix*.

Results and discussion. As a result of our studies, we determined the complete transcript sequences of 8 genes of the Hox family: two anterior genes (hox1, hox3), three medial genes (hox5, hox7, hox8) and three posterior genes (hox9/10, hox11/13a, hox11/13c). Of these, during the regeneration of AC and intestine, the greatest change in gene activity relative to intact AC and intestine is observed for genes hox5, hox9/10, and hox11/13a. Thus, already on the 3rd day after evisceration, the expression of hox5 increases 15 times, which is the maximum for this gene during regeneration, hox9/10, hox11/13a increase ~2 times and there is a decrease in the expression of hox1, hox7. This is followed by a noticeable 4-fold increase in hox11/13a and a 2-fold increase in hox8, as well as a 3.5-fold decrease in hox1 expression on day 5. At the same time, the expression of hox5 decreases, and on the 7th day, a 13-fold increase in hox5 occurs again, hox9 /10 reaches its maximum 6 times, hox11/13a is at the same level - 4 times higher than the normal level and hox8 increases 2.2 times. On days 10, 14 and 24, hox1, hox7, hox8, hox9/10, hox11/13a gradually reach the norm, however, hox8, hox9/10 and hox11/13a have peaks of activity on day 14, and hox5 gradually decreases its activity, but even on the 24th day, it is still 3 times higher than the normal level. As a result of hybridization, it was shown that Hox7 is expressed in the middle sections of the radial ambulacral canals of the AK, and Hox9/10 in their posterior part and the ambulacral ring. In addition, these genes are expressed in the anterior part of the regenerating intestine. Following the order of the genes in the cluster from the 3' end, they are expressed in the anterior part of the body

and at the 5' end of the posterior part of the sea cucumber body, according to the position of the Hox cluster in holoturians.

Conclusion. Our study showed that during the regeneration of internal organs in the *E. fraudatrix*, the Hox genes exhibit spatial colinear expression. Thus, the observed expression of the studied genes of the Hox family during the regeneration of internal organs in sea cucumbers *E. Fraudatrix* shows their participation in the regulation of recovery processes and growth.

**СОЗДАНИЕ ИЗОГЕННЫХ МОДЕЛЕЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ
ПОЛИМОРФИЗМОВ НА БАЗЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУТЕМ
РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9**

Кондрашов А.В.

*Отдел Стволовых и Опухолевых Клеток, Институт Биологических Открытий
Ноттингемского Университета, a.kondrashov@nottingham.ac.uk*

**GENERATING ISOGENIC MODELS OF SINGLE NUCLEOTIDE
POLYMORPHISMS IN HUMAN PSCS BY CRISPR/CAS9 GENOME EDITING**

Kondrashov A.V.

*Division of Cancer and Stem Cells, University of Nottingham Biodiscovery Institute,
a.kondrashov@nottingham.ac.uk*

Introduction. Heterogeneity in genetic background is a common problem when studying common or disease associated polymorphic variations. The effect on phenotype produced by normal and modified variants is often hindered by variability in the genomes of existing model systems. Creating model systems with an identical genomic background while carrying the modifications of interest will significantly improve our understanding of the function of clinically important genetic variants. Advances in genome editing technologies, and CRISPR/Cas9 systems in particular, has made the generation of such models feasible. *Aim of investigation.* To design the strategies for, and to perform, CRISPR/Cas9 targeting in the intronless beta2-adrenoreceptor (β 2AR) gene, as well as other cardiac related loci, to generate isogenic hPSC based models for common and disease related polymorphic variations. Then, to evaluate differential effect of selected snp's in cardiomyocytes differentiated from the obtained modified isogenic hPSC cell lines.

Materials and Methods. Two main strategies were used to introduce single nucleotide polymorphic variations into the genomes of model cell lines. The first strategy was based on a combination of CRISPR/Cas9 and PiggyBac transposon technologies (all components of the system were delivered as plasmids). In the second strategy, we used ssODN as a template for homologous recombination and the preassembled *in vitro* gRNA/Cas9 RNP complex. Finally, we used a set of

assays to investigate the role of introduced polymorphisms on β 2AR internalisation and downregulation, as well as on the β 2AR-mediated cell response to cardiotoxic drugs.

Results and discussion. We successfully obtained our desired modifications in the genomes of model cell lines by using both genome editing strategies. We demonstrated their efficiency through successful targeting of a number of cardiac specific loci in various lines of hESCs. Phenotypic analysis of cardiomyocytes, derived from four isogenic hESC lines carrying n-terminal polymorphic variants of β 2AR, demonstrates differential downregulation of the receptor to prolong stimulation of isoprenaline. Moreover, treatment with doxorubicin also shows an snp-specific response.

Conclusion. CRISPR/Cas9 genome editing is an efficient tool for the introduction of desired corrections into the genome of stem cells. In properly designed experiments the final cell lines can be produced in a relatively short period of time. Different strategies have their own strengths and weaknesses. The choice of strategy is dependent on the nature of the targeted locus. Generating isogenic cell lines for different variants of β AR2 would help to understand the role of β AR2 polymorphisms in cardiac response to anticancer therapy. This would have an immediate clinical outcome and would help to choose individual therapy prescriptions more accurately.

**АДГЕЗИОННЫЙ, G-СВЯЗАННЫЙ БЕЛОК, КАК НОВЫЙ МАРКЕР
ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЭФФЕКТОР
ПОЛУЧЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Неганова И.Э.

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург. Irina.neganova@incras.ru

**ADHESION GPCR, GPR123, AS A NEW MARKER OF HUMAN ESCS AND
EFFECTOR OF HUMAN IPSCS GENERATION**

Irina Neganova

Institute of Cytology, Sankt-Petersburg. Irina.neganova@incras.ru

Introduction. Human genome contains more than 800 GPCRs (G-protein coupled receptors), making it the largest superfamily of cell surface signaling protein receptors. GPCRs play a key role in many complex biological processes, including development. Despite the fundamental role of GPCRs, their role for hESCs, as well as for reprogramming, remains poorly understood. Self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells are regulated, among other things, by signaling pathways carried out by GPCR, through Gs- and Gi- subunits. EDG5, GPR20, and GPR123 genes have a higher expression level in hESCs compared to 100 different somatic cells (Nakamura et al., 2009). Thanks to the technology of genetic reprogramming through ectopic expression of the

transcription factor genes OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC (OSKM), it is possible to obtain the so-called human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). The use of hiPSCs opens up great opportunities for both regenerative and personalized medicine, for the study and modeling of many diseases and to creation of new drugs. However, an understanding of the molecular regulation of the reprogramming process and the induction of pluripotency is in its infancy. To identify new reprogramming effectors, we used the library of 784 small hairpin RNA of various kinases and phosphatases of the Dharmacon from 8 to 10 days of reprogramming. As a result, we identified 68 repressor genes and 22 activator genes; the role of 76 genes was not studied before for the reprogramming process. Our screening revealed new top reprogramming effectors belonging to the GPCR family, namely EDG5, GPR42, GPR20. We also identified GPR123, as potential effectors of the reprogramming process.

The aim of the study. To further study the role of GPCRs and to confirm the role for GPR123 as a potential reprogramming effector, we subdivide our project into two main tasks: 1. Finding out the functional rollers of *GPR123* for hESCs and hiPSCs; 2. To study the role of *GPR123* in the reprogramming process.

Materials and Methods. For hiPSCs generation CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit (Invitrogen) was used. hESCs/ hiPSCs were maintained on plates covered with Matrigel (Corning Matrigel Matrix, Life Sciences) with mTeSR1Medium (STEMCELL Tech). SMARTpool: siGENOME small interfering RNA (siRNA) for *GPR123* was purchased from Dharmacon. The siRNA (10 nM) was used for transfection with DharmaFECT1 Transfection reagent (Dharmacon). ON-TARGETplus nontargeting control pool from Dharmacon was used as Control.

Results and discussion. We analyzed the expression of GPR123 in hESCs and found out important role of GPR123 for pluripotency maintenance. We demonstrated that expression of *GPR123* during the course of differentiation to embryonic bodies (EBs) decreases, suggesting its irreplaceable role for hESCs. Downregulation of *GPR123* expression in hESCs (H9) results in: 1. Decrease expression of pluripotent genes and the absence of characteristic positive staining for the stem cell marker – alkaline phosphatase; 2. An increase in the expression level of differentiation markers (Endoderm: GATA4, SOX17, CDX2; Ectoderm: VIM, SOX1, NESTIN and Mesoderm: MSX1 and MIXL), which indicates a loss of pluripotency and the beginning of the differentiation process. 3. Changes in the expression of genes associated with the mesenchymal-epithelial transition, namely, downregulation of E-CADHERIN with an upregulation in N-CADHERIN.4. Accumulation of cells at the G2 stage of the cell cycle (with increase from 26.3% to 49.9% in the *GPR123*RNAi population).5. Enhanced expression of anti-apoptosis genes of the BCL-2 family (BCL-2 and BCLxL), as well as upregulation of the apoptosis suppressor gene – XIAP. However, we did not find differences in the level of apoptosis between *Control* RNAi and *GPR123*RNAi

cells, which is consistent with the idea that the elimination of cells with a low level of pluripotency occurs preferentially through their differentiation rather than apoptosis.⁶ The morphological changes of *the GPR123RNAi* colonies, accompanied by changes in cells size, loss of the cells density in the colony, changes in the shape of the colonies and their retraction inside. These observations suggest that the major G alpha (α) subunits of the GPR123 signaling cascade are G α S and G α i; namely, the signaling pathway of adenylate cyclase (AC5) -cAMP-PKA-CREB for G α S subunit and cAMP-MEK1 / 2-ERK1 / 2 –SMADs- for G α i signaling. By part, these is supported by a significant decrease at the level AC and CREB expression in *GPR123RNAi* cells. In addition, the role of GPR123 for hiPSCs generation will be discussed.

Conclusion. The listed results allow us to conclude that GPR123, which belongs to the III type of the subfamily of the Adhesive GPCR, performs irreplaceable functions in hESCs and is important for pluripotency maintenance and acquisition. In addition, these results support our assumption that GPR123 is the new hESCs marker.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF RAT NERVE REGENERATION AFTER CRUSHING AND MSCs TRANSPLANTATION

Petrova E.S., Kolos E.A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, iempes@yandex.ru

Introduction. Current regenerative neurobiology has demonstrated that transplantation of stem cells can have a stimulating effect on the processes of reparative regeneration of the nervous system organs. The experimental elaboration of cell technologies to stimulate nerve regeneration is carried out actively. Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow, adipose tissue and other sources are often used in experimental studies for the stimulation of damaged nerve regeneration. The mechanisms of their influence are not fully understood. *The aim of the study* was to investigate the effect of single transplantation of rat bone marrow mesenchymal stem cells on the regenerating fibers of a rat damaged sciatic nerve.

Materials and Methods. In the present work, the sciatic nerve of Wistar-Kyoto rat was crushed by ligature, rat bone marrow MSCs were transplanted into the damaged nerve. MSCs derived from bone marrow of Wistar-Kyoto rats were provided by "Trans-Technologies" (Saint-Petersburg, General Director D.G. Polyntsev). Cells were cultured for a week, three days prior to usage of culture, 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) was added to the medium. MSCs were transplanted (5×10^4 cells in 5 μ l of medium) into the sciatic nerve. To animals of the control group, which had a ligature, 5 μ l of culture medium was injected subperineurally.

Results and discussion. BrdU-labeled MSCs were identified in the recipient's nerve for a week and were found not only in the endoneurium, but also in the epi- and perineurium. Apparently, a part of the transplanted MSCs migrated to the outer sheaths of the peripheral nerve after breaking the barrier by ligation. A study of the regenerating nerve fibers in the distal segment of crushed nerves was performed using immunohistochemical detection of peripherin. Polyclonal antibodies to peripherin (Abcam, UK) were used. Peripherin is a type III intermediate filament protein of molecular weight 57 kD, which is involved in the process of nerve fibers elongation in damaged nerves. Detection of this protein is often used to study the structures of the peripheral nervous system. Two months after the transplantation, peripherin⁺ nerve fibers were counted and measured on transverse sections of the distal segment of the recipient's nerve. Morphometric analysis of regenerating fibers performed using ImageJ software (NIH, USA) showed that the average thickness of nerve fibers in animals of the experimental group was increased. A study of the nerve fibers thickness distributions of the damaged nerve distal segment showed that in animals treated with MSCs, the percentage of larger diameter fibers is higher than in rats of the control group.

Two hypotheses can be formed for explanation of the obtained fact. The first hypothesis is associated with the features of the growth of regenerating axons to the periphery. After injury to the nerve trunk, Wallerian degeneration occurs in its distal segment, and thin regenerating axons begin to grow to the periphery. As they grow, their thickness increases, some of them undergo myelination. We believe that exogenous mesenchymal stem cells, producing neurotrophic and growth factors, can accelerate the growth of regenerating axons, their caliber increase, and their myelination. The second hypothesis concerns the neuroprotective effect of MSCs. Due to the paracrine effect on the endogenous cells of the recipient's nerve (neurolemmocytes, fibroblasts, perineurium cells, cells of the wall of blood vessels, macrophages) MSCs transplantation can prevent the degeneration of some of the fibers after compression. To find out, it is necessary to further study the dynamics of growth of nerve fibers in the early stages after trauma, as well as to study the effect of exogenous MSCs on Wallerian degeneration.

Conclusion. An analysis of the distribution of nerve fibers in the distal nerve segment showed that a single transplantation of rat bone marrow MSCs into the damaged nerve leads to an increase in the proportion of regenerating fibers with a large diameter compared to the control (damage without MSCs injection). Presumably, this is a consequence of the stimulating effect of MSCs on the growth of the recipient's nerve fibers at an earlier date. The data obtained should be taken into account in studies devoted to the search for new ways to stimulate nerve regeneration.

COMBINATORIAL APPROACH IN DISCOVERY OF OPTIMAL PROTOCOLS FOR STEM CELL THERAPY APPLICATIONS

Marina Tarunina, Yen Choo

*Plasticell Ltd, Stevenage Bioscience Catalyst, Gunnel Wood Road, Stevenage, SG1 2FX,
marina@plasticell.co.uk*

Introduction. A fundamental issue in the manufacture of stem cells for therapeutic use is a safe, efficient control of cell fate. To date, cell expansion and differentiation protocols have been primarily determined empirically, based on what is known of signalling pathways involved in vivo. This is time-consuming and costly and most often results in sub-optimal protocols that are not robust enough for cell manufacture. Therefore, novel approaches to control cell fate and translate these methods to a scaled-up, GMP manufacturing process are essential for the progression of regenerative medicine. We have developed an integrated platform technology that uses combinatorial approach for the rapid identification of novel, efficient stem cell expansion and differentiation protocols that are optimised for translation to clinical grade manufacturing.

Materials and Methods. CombiCult[®] platform is a bead-based screening technology that allows miniaturisation and multiplexing of large numbers of stepwise cell culture experiments, increasing throughput by orders of magnitude (Choo 2008, Tarunina et al., 2014). Briefly, microcarriers seeded with stem cells are shuffled randomly through multiple, predetermined combinations of cell culture media formulations using a split-pool process analogous to that used in combinatorial chemistry. Each cell culture medium is spiked with a distinctive fluorescent tag that attaches to the bead substrate, allowing us to track the history of each bead. Following the split-pool process, beads are assayed to identify those on which stem cells have a specific phenotype of choice ('hits'). Hits are isolated using a large particle flow sorter and the beads are then digested to release the fluorescent tags accumulated during the course of the experiment. Tags are analysed using a flow cytometer to deconvolute the cell culture history of each positive bead and thereby deduce the combination of media which results in the desired phenotype. A customised bioinformatics program (Ariadne[™]) is used to collate data and perform statistical analysis to predict the most robust and effective protocols. Finally, a subset of candidate protocols is validated to quantitate cell yield, and study lineage markers and functional attributes of the resulting cells.

Results. CombiCult[®] technology was successfully used to derive differentiation protocols for the generation of various developmental intermediates and terminally differentiated cells. It was originally developed for use with anchorage dependent cells attached to solid microcarriers. Using CombiCult[®], Plasticell developed a serum-free, xeno-free potent medium for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, OsteoMAX-XF[™] (licensed to Merck Millipore)

that promotes differentiation and mineralisation in 5-7 days. This GMP-ready osteogenic medium will be further developed for cell therapy applications including bone fracture repair and use in spinal fusion surgery.

To enable CombiCult[®] to work with non-adherent hematopoietic cells we had developed protocol for cell encapsulation in alginate beads produced using electrospraying. This second-generation combinatorial screening platform was successfully employed to discover optimal protocols for the expansion of cord blood (CB) hematopoietic cells (HSC) (Tarunina et al, 2016). HSC transplants are used to treat over 70 indications of blood cancers and inherited metabolic diseases etc. However, the therapy is severely limited by the small numbers of HSCs per CB unit. Plasticell's CB HSC expansion protocol discovered using CombiCult[®] screen is able to expand putative HSC population up to 200 times in 6 days (Hernandez et al, 2017).

We further adopted alginate encapsulation method for use with hES and iPS cells and applied CombiCult[®] to discover novel efficient protocols for scalable production of hematopoietic lineages such as megakaryocytes and red blood cells. The main challenge was to discover efficient robust protocols that generate functional adult-like cells. Plasticell's multiplexing technology allowed simultaneous screening of multiple iPSC lines, facilitating the development of a robust protocol that is applicable across cell lines.

Conclusion. The manufacture of therapeutic cell types from a potentially limitless cell source such as human stem cells in a controlled and reproducible manner is a critical challenge of regenerative medicine. Plasticell's combinatorial screening platform CombiCult[®] allows to discover optimised GMP cell culture protocols/media for therapy/manufacturing in record time by testing up to 100,000 cell culture protocols in parallel. Plasticell has used CombiCult[®] to establish its current cell therapy portfolio that includes the expansion of HSCs for cell and gene therapy applications as well as the manufacture of red blood cells, platelets and immune cells from iPSCs.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЗОНЕ ВЕНОЗНЫХ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ

Абдувосидов Х.А.^{1,2}, Чекмарева И.А.³

¹*ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова», sogdiana99@gmail.com*

²*ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова»*

³*ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского»*

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE AREA OF VENOUS TROPHIC ULCERS

Abduvosidov H.A.^{1,2}, Chekmareva I.A.³

¹*Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov*

²*Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov*

³*Scientific Medical Research Center of Surgery named after A.V. Vishnevsky*

Введение. Одним из осложнений хронической венозной недостаточности (ХВН) нижних конечностей является формирование трофических изменений кожи нижних конечностей, таких как индурация кожи и подкожной клетчатки и образование трофических язв. *Цель исследования.* Изучить морфологические изменения тканей в зоне трофических язв.

Материал и методы. Обследовано 36 больных, страдающих венозными трофическими язвами, из них 25 женщин и 11 мужчин. Средний возраст пациентов составил $66 \pm 2,5$ лет. Длительность ХВН в среднем составила $18 \pm 1,7$ лет, а длительность трофической язвы $29 \pm 3,4$ месяцев.

Были проанализированы результаты морфологических исследований биопсийного материала (краев и дна трофических язв) у всех больных в день поступления в стационар. Ткань для электронно-микроскопического исследования фиксировали в 2,5% растворе глютаральдегида, затем в 1% растворе OsO₄ и заключали в смесь аралдитовых смол. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе фирмы JEM 100 CX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждение. При электронно-микроскопическом исследовании биоптатов до лечения выявлена высокая функциональная активность эндотелиальных клеток, на что указывает гипертрофия гранулярной цитоплазматической сети, представленная резко расширенными каналцами. Практически вся цитоплазма эндотелиоцитов была заполнена везикулами различных размеров, митохондрии крупные с просветленным матриксом и нарушенной ориентацией крист. Ядро чаще неправильной формы, с множественными инвагинациями. Большая часть капилляров была «замурована» в фиброзную ткань. Просвет большинства капилляров резко сужен. Стенка сосудов утолщена

за счет набухания и деструкции базальной мембраны. Макрофаги единичны, их функциональная активность снижена. Среди волокон коллагена отмечалось большое количество фибробластов. Большинство из них имели отростчатую форму, ядра с тонкой пограничной зоной гетерохроматина, округлые митохондрии с просветленным матриксом и дезориентированными кристами. Гранулярная цитоплазматическая сеть, представляла систему связанных между собой тубулярных и мешковидных структур, распространяющуюся по всей цитоплазме. Значительное развитие гранулярной цитоплазматической сети связано с активным синтезом в них белков (прежде всего коллагеновых), на что указывает хлопьевидное содержимое в расширенных цистернах. Такое строение фибробластов указывает на их функциональную активность.

Нарушены межклеточные взаимодействия, о чем свидетельствуют отсутствие макрофагально-фибробластических контактов. Этот факт является одной из причин торможения репаративных процессов в ране. Встречались контакты между фибробластами и лейкоцитами, которые обычно не встречаются в заживающих ранах.

Следовательно, проведенное исследование показало, что при длительно существующей венозной трофической язве страдает капиллярная сеть, это сопровождается утолщением стенки капилляров и сужением их просвета, за счет набухания эндотелиоцитов, а также наличием вокруг капилляров фиброзной ткани, снижается количество и активность иммунокомпетентных клеток, нарушаются межклеточные взаимодействия - отсутствуют макрофагально-фибробластических контакты и присутствуют лейкоцитарно-фибробластические контакты.

Заключение. В зоне венозных трофических язв имеются грубые морфологические изменения и нарушения ауторегуляции воспалительных и репаративных процессов, характеризующиеся десинхронизацией фаз воспаления и регенерации, на что указывает ослабление макрофагальной реакции, расстройство системы микроциркуляции, нарушение межклеточного взаимодействия, формирование избыточной грануляционной ткани с развитием фиброза. Все эти изменения тормозят процесс репарации, что соответственно затрудняет и обосновывает комплексный подход лечения данного рода больных.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ БОЛЬШОЙ ПОДКОЖНОЙ ВЕНЫ ПРИ ВАРИКОЗНОМ РАСШИРЕНИИ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Абдувосидов Х.А.^{1,3}, Колесников Л.Л.^{1,2}, Чекмарева И.А.², Паклина О.В.², Тинькова И.О.²

¹ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова», *sogdiana99@gmail.com*

² ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского»

³ ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова»

MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE LARGE SUBCUTANEOUS VEIN IN VARICOUS DISPENSION OF THE VEINES OF THE LOWER LIMBS

Abduvosidov H.A.^{1,2}, Kolesnikov L.L.^{1,2}, Chekmareva I.A.³, Paklina O.V.³, Tinkova I.O.

3

¹*A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
sogdiana99@gmail.com*

² *National Medical Research Center of Surgery named after A.V. Vishnevsky*

³ *Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov*

Введение. В формировании варикозной болезни вен нижних конечностей (ВБВНК) участвуют процессы, происходящие на клеточном уровне. Основными звеньями патогенеза варикозной трансформации вен являются процессы: дисфункции и дисрегуляции эндотелия, повреждения структуры венозной стенки продуктами метаболизма активированных лейкоцитов, гипертрофии венозной стенки в результате фенотипической модуляции гладкомышечных клеток, а также дисплазии соединительной ткани.

Цель исследования: изучение структурно-функционального состояния стенки большой подкожной вены (БПВ) у больных пожилого и старческого возраста с длительным течением ВБВНК на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ).

Материал и методы. Проведен морфологический (ультраструктурный) анализ 25 фрагментов БПВ, иссеченных во время флебэктомии у 5 больных, оперированных по поводу варикозной болезни вен нижних конечностей. Средний возраст пациентов составил 62 года, из них 3 женщины и 2 мужчин. Оперированные больные имели хроническую венозную недостаточность (ХВН) нижних конечностей С6 клинического класса по CEAP, а также фенотипические признаки дисплазии соединительной ткани средней и тяжелой степени. Оценку степени выраженности дисплазии соединительной ткани производили по 82 фенотипическим признакам (Смольнова Т.Ю., 2009). Наличие у пациента свыше четырех

фенотипических признаков считали подтверждением НДСТ. Электронно-микроскопическое исследование фрагментов вен проведено по общепринятой методике с помощью электронного микроскопа JEM 100 CX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждение: У больных с ХВН (С6 клинический класс по СЕАР) на фоне НДСТ отмечали истончение венозной стенки, неравномерное распределение эластических и коллагеновых волокон во всех слоях венозной стенки, замещение гладкомышечных клеток фиброзной тканью. Характерно сочетание склероза, гипертрофии и признаков атрофии стенки БПВ. Проведенное электронно-микроскопическое исследование показало клеточные и внутриклеточные изменения при дисфункции эндотелия: отсутствие базальной мембраны, десквамацию эндотелия и очаговое его отсутствие, инвагинацию эндотелиального слоя, внутриклеточные деструктивные изменения, выраженные в разной степени, эти изменения делали невозможным восстановление поврежденного слоя эндотелия. Деструктивные изменения затрагивали и внутреннюю эластическую мембрану – отмечали эластические волокна с нарушенной структурой, повышенной электронной плотностью, с неровными контурами и фрагментацией, что может указывать на дефектный эластогенез. У больных выявлялись диспластические изменения в структуре коллагеновых волокон: истончение, разрыхление, дезорганизация, фрагментация и деструкция коллагена. Коллагеновые фибриллы имели аномалии в ультраструктурной организации – неравномерное набухание с частичной потерей характерной поперечной исчерченности. На нарушение фибриллогенеза указывали поперечно исчерченные нитевидные агрегаты или тельца Luse. Кроме этого, были нарушены коммуникационные связи между измененными миоцитами в меди. Следовательно, развитие в стенке БПВ дистрофических и деструктивных процессов у больных пожилого и старческого возраста с длительным течением ВБВНК приводит к снижению прочности соединительно-тканного каркаса вены, при этом усугубляющим фактором является НДСТ.

Заключение. Результаты проведенного электронно-микроскопического исследования показали, что у больных варикозной болезнью вен нижних конечностей с С6 клиническим классом хронической венозной недостаточности нижних конечностей отмечаются структурно-функциональные изменения в стенке большой подкожной вены, характерные для длительного течения заболевания, на фоне эндотелиальной дисфункции и недифференцированной дисплазии соединительной ткани. Дезорганизация соединительной ткани, нарушение межклеточных коммуникационных связей, дефектный эластогенез и фибриллогенез являются структурной основой снижения прочности соединительно-тканного каркаса вены.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛОШАДЕЙ И ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ РОЛИ В ВОССТАНОВЛЕНИИ СУХОЖИЛИЙ IN VITRO

Абызова М.С.

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет",

abyzovamary@mail.ru

INVESTIGATE MICROVESICLES FROM EQUINE STEM CELLS AND THEIR POTENTIAL ROLE IN IN VITRO TENDON REPAIR

Abyzova M.S.

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan University, KFU.,

abyzovamary@mail.ru

Введение. Повреждения сухожилий и связок у спортивных лошадей являются одной из наиболее частых причин ортопедических травм и раннего ухода из спорта. Хотя сухожилия и связки обладают способностью самопроизвольно заживать, полученные разрывы тканей имеют тенденцию заполняться биомеханически неполноценной волокнистой тканью, вследствие чего часто наблюдается повторное травмирование. В качестве нового метода терапии тендинита животных и человека в настоящее время рассматривается подход с использованием искусственно полученных микровезикул из мезенхимных стволовых клеток (МСК). Искусственные микровезикулы, полученные из МСК при помощи цитохолазина В, обладают биологической активностью клеток-родителей. Благодаря естественному тропизму МСК, а, следовательно, и полученных из них микровезикул, данный подход к терапии травм сухожилий позволяет обеспечить целевую доставку биологически активных веществ, стимулирующих регенеративные процессы, к месту повреждения. *Цель настоящего исследования* - изучение потенциальных терапевтических свойств микровезикул в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы. Микровезикулы были получены из жировой ткани лошадей. Забор жировой ткани проводился в стерильных условиях в ветеринарной клинике Казанского ипподрома с соблюдением всех этических норм. Из полученного материала получали мезенхимные стволовые клетки. Стволовость клеток подтверждали при помощи метода проточной цитометрии. Получение микровезикул из культуры клеток МСК лошади осуществляли согласно Pick et al. с модификациями (Pick et al., 2005). Тенобласты получали из сухожилия здоровых крыс. Принадлежность полученных клеток к тенобластам определяли методами проточной цитометрии. Терапевтический потенциал микровезикул определяли при помощи нескольких тестов. Возможность слияния микровезикул из МСК лошади и предшественников тенноцитов крыс определяли при помощи витальных

красителей. Клетки лошади окрашивались DIO (зеленая флуоресценция), а крыс – DID (красная флуоресценция). Результат фиксировался при помощи флуоресцентного микроскопа. Воздействие микровезикул МСК лошади на миграцию предшественников теноцитов определяли методом царапин. Влияние на жизнеспособность оценивали при помощи MTS теста. Также определяли индекс пролиферации инкубированных с микровезикулами клеток.

Результаты и обсуждение. Перед проведением тестов была подтверждена видовая принадлежность полученных нами клеток. Проточная цитометрия показала, что МСК лошади несли на своей клеточной мембране маркеры Thy1, CD44, CD73. Полученные тенобласты содержали специфичные для данного пула клеток маркеры (SCXA, теномодулин, CD 90, α SMA, Nanog, Oct3/4). При этом были отрицательны на CD34, CD45. При исследовании возможности слияния тенобластов и микровезикул лошади выявлено, что окрашенные в красный цвет клетки тенобластов имеют зеленые вкрапления микровезикул. Тем самым экспериментально показана возможность слияния цитоплазматических мембран данных клеток с микровезикулами. Исследование миграции при помощи метода царапин показало, что сокультивирование тенобластов с микровезикулами из МСК лошади не влияет на их миграционную способность. MTS-тест показал, что сокультивирование тенобластов с микровезикулами лошади не оказывает цитотоксического или цитостимулирующего эффекта на тенобласты крысы через 24 и 72 часа. При изучении пролиферации выявлено, что инкубация с микровезикулами МСК лошади статистически достоверно стимулирует пролиферативную активность тенобластов крысы. *Заключение.* Проведенные исследования были посвящены разработке нового способа лечения. Для оценки потенциальной эффективности были выбраны наиболее часто используемые для данных исследований тесты. Исследования показали, что микровезикулы, полученные из мезенхимных стволовых клеток, непосредственно воздействуют на тенобласты. Экспериментально показано, что при совместной инкубации тенобластов с микровезикулами наблюдается слияние мембран. Также было выявлено положительное действие на пролиферацию тенобластов. При исследовании жизнеспособности показано, что совместная инкубация не оказывает цитотоксического эффекта. В дальнейшем для определения терапевтического эффекта нами планируются эксперименты *in vivo*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №[20-016-00022](#).

**ДВУЯДЕРНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ОБРАЗОВАНИЯ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ
БОЛЬШОГО МОЗГА ПОЛОВОЗРЕЛЫХ БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ 40-МИНУТНОЙ
ОККЛЮЗИИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Шоронова А.Ю., Горбунова А.В., Макарьева Л.М.

ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет, avdeev86@inbox.ru

**BINUCLEAR CELLULAR FORMATIONS OF THE SENSORIMOTOR CORTEX OF
MATURE WHITE RATS AFTER A 40-MINUTE OCCLUSION OF THE COMMON
CAROTID ARTERIES**

Avdeev D.B., Akulinin V. A., Shoronova A. Yu., Gorbunova A.V., Makarieva L. M.

Omsk state medical university, avdeev86@inbox.ru

Введение. По данным современных исследований, гипотеза о роли слияния клеток в физиологической и репаративной регенерации нервной ткани имеет право на существование. В настоящей работе проведено гистологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследование различных двуядерных пирамидных нейронов (гетеро- и дикарионов) слоя III и V сенсомоторной коры головного мозга половозрелых белых крыс в норме и после окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

Цель исследования – изучить двуядерные клеточные образования сенсомоторной коры (СМК) большого мозга половозрелых белых крыс после 40-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Материалы и методы. На белых крысах Wistar моделировали 40-минутную окклюзию общих сонных артерий (ООСА). Проводили сравнительную морфометрическую оценку цито, дендро-, синапто- и глиоархитектоники неокортекса в норме (n=5), через 1 (n=5), 3 (n=5) и 7 сут (n=5) после ООСА. Использованы окраски по Ниссля и гематоксилином&эозином, иммуногистохимические реакции на *NSE, MAP-2, HSP-70, p38, caspase-3, GFAP, AIF1* и *Ki-67*. Оценивали численную плотность пирамидных нейронов, олигодендроцитов (ОДЦ), микроглиоцитов (МГЦ), содержание дистрофически и некробиотически измененных нейронов, с одним и более ядрышками, гетеро- и дикарионов. Проверку статистических гипотез проводили с помощью программы Statistica 8.0.

Результаты и обсуждение. После ООСА увеличивалось содержание дистрофически и некробиотически измененных нейронов, содержание нейронов с двумя ядрами, с двумя и более ядрышками, общее количество (пролиферация) и содержание гипертрофированных астроцитов, ОДЦ и МГЦ. Патологические и компенсаторно-восстановительные изменения носили диффузно-очаговый характер и проявлялись более выражено в слое III неокортекса. Содержание двуядерных гетерокарионов через 1 и 3 суток после ООСА в сравнении с

контролем не изменялось, а через 7 сут увеличивалось до $5,9 \pm 2,2/\text{мм}^2$. (контроль – $3,8 \pm 1,1/\text{мм}^2$). Увеличение происходило на фоне более высокого, чем в контроле, содержания ОДЦ и МГЦ. Наряду с увеличением содержания гетерокарионов выявлено значительно более выраженное (на 20–40%) увеличение доли нейронов СМК с двумя и более ядрышками. Это, вероятно, свидетельствовало о том, что в функционирующих нейронах, включались процессы адаптации белоксинтезирующей системы, которые проявлялись гипертрофией и амплификацией ядрышек. Сравнение динамики изменения количества МГК и ОДЦ в СМК показало, что пик увеличения плотности этих клеток после ООСА отличался: для МГК – через 1 сутки, ОДЦ – 7 суток. Можно предположить, что МГЦ saniровали нервную ткань после ишемии для санации и последующего более полноценного ее структурно-функционального восстановления с участием ОДЦ.

Заключение. После 40-минутной ООСА в СМК на фоне дистрофических и некробиотических изменений пирамидных нейронов и активации нейроглиальных клеток происходило увеличение образования гетерокарионов и нейронов с амплифицированным ядрышком. Выявленные изменения рассматривались как один из вариантов реакции нейронов на ишемическое повреждение.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ МСК НА МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Алатраш Р.

*ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Институт
фундаментальной медицины и биологии, Кафедра генетики, reemalatrash2516@gmail.com*

INVESTIGATION OF THERAPEUTIC PROPERTIES OF MSCS' INDUCED MICROVESICLES ON A MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

Alatrash R.

*Kazan (Volga region) Federal University, Institute of fundamental medicine and biology,
Department of genetics, reemalatrash2516@gmail.com*

Введение. ЭАЭ модель рассеянного склероза (РС) – неизлечимого аутоиммунного демиелинизирующего заболевания. Одной из перспективных представляется терапия РС мезенхимными стромальными клетками (МСК). Внеклеточные микровезикулы (МВ) идентифицированы как терапевтическая альтернатива МСК и векторы доставки терапевтических факторов, получение индуцированных МВ позволит повысить их выход. Представляется актуальным использование свойств фактора роста нервов (NGF) для доставки индуцированными МВ МСК на модели ЭАЭ в качестве стратегии субклеточной

терапии РС.

Материалы и методы. На мышах линии C57BL/6 с MOG35-55 - моделью ЭАЭ проводили исследование эффективности терапии МСК из жировой ткани (ЖМСК), пульпы зуба, косного мозга, цитохалазин В индуцированных МВ ЖМСК и цитохалазин В индуцированных МВ ЖМСК, трансдуцированных NGF. На 14 и 21 сутки проводили морфометрический анализ площади демиелинизации, количества реактивных астроцитов,. Уровень цитокинов крови оценивали с помощью Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay.

Результаты и обсуждение. Введение ЖМСК показало достоверное снижение площади деструкции и количества реактивных астроцитов по сравнению с другими группами МСК на обоих сроках и были выбраны как наиболее перспективные для получения МВ. Показано достоверное снижение площади демиелинизации и количества астроцитов после введения обоих видов МВ по сравнению с группой без лечения, а также МВ ЖМСК с NGF по сравнению с нативными МВ ЖМСК. Уровень провоспалительных, противовоспалительные цитокины IL-4, IL-10 и регуляторные хемокины были достоверно снижены во всех образцах после терапии. Уровни TNF-а, IL-6, MCP1 и IL-1b снижались после введения нативных и МВ с NGF. Уровень: IL-4 и IL-10 был повышен после введения МВ с NGF по сравнению с нативными МВ и ЖМСК.

Заключение. Таким образом, лечение ЭАЭ с использованием нативных МВ или МВ с NGF не уступает терапии с ЖМСК. При этом использование МВ с NGF показало лучшие результаты, что дает основания для разработки субклеточной терапевтической стратегии.

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Александрова М.А., Сухинич К.К.

ФГБУН Институт Биологии Развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва,

mariaaleks@inbox.ru

CURRENT PROBLEMS IN MAMMAL NERVE TISSUE REGENERATION

Aleksandrova M.A., Sukhinich K.K.,

Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, sukhinich@idbras.ru

Стимуляция регенерации в нервной системе млекопитающих и человека – чрезвычайно сложная проблема, решение которой ведется уже более сотни лет. Термин «регенерация» направляет поиски к детальному анализу молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития нервной ткани, в норме четко скоординированных с пространственно-временными паттернами, которые, безусловно, являются базовыми для восстановления, но, к сожалению, недостаточными.

В отличие от клеток других тканей, развитие нейронов сопряжено с колоссальным усложнением их морфологии. В эмбриогенезе эндогенная генетическая программа нейрона разворачивается «от простого к сложному» при активной поддержке внешних факторов микроокружения. В отличие от этого, в постнатальный период, в процессе дифференцировки нервной ткани эндогенно блокируется рост аксонов, стабилизируются межнейрональные связи, что поддерживается внешним окружением, которое становится ингибиторным. Эти изменения обеспечивают нормальное функционирование нервной системы, но они же ведут к подавлению пластичности и способности к регенерации. Из сопоставления развития и регенерации нервной системы у низших позвоночных и млекопитающих становится ясно, что в ходе эволюции появилось несколько механизмов блокирования регенерации и пластичности ЦНС. К их числу принадлежит свойственная большинству типов нервных клеток ЦНС блокада аксонального роста, которая регулируется эндогенными ядерными сигналами, ингибиторными факторами со стороны миелин олигодендроцитов и астроцитов, а дополняется непермиссивными растворимыми факторами микроокружения. Оптимизм в решение проблемы внесло открытие нейральных стволовых клеток (НСК). Их изучение в развитии и у взрослых организмов привело к пониманию того, что ЦНС млекопитающих намного пластичнее, чем представлялось ранее, и обладает способностью к некоторой регенерации. Эти исследования показали многофакторность процесса, что послужило основой для выбора новых способов стимуляции регенерации у взрослых

организмов. В настоящее время для поддержания роста аксонов предложена стратегия модуляции генов сигнальных путей (сAMP; PTEN/mTOR; SOCS3/STAT; MAPK и др.); используются почерпнутые из развития транскрипционные факторы; факторы роста; микроРНК и т.д. Параллельно развиваются клеточные направления – активация регенерации за счет собственных НСК, трансплантация разных типов прогениторных клеток и наконец, прямое репрограммирование *in vivo* ненейрональных клеток в нейроны.

Исследование стволовых клеток *in vivo* показало, что генерируемые ими нейроны и глия функционально интегрируются в уже существующие нейронные сети взрослого мозга. Это свидетельствует о перманентной регенерации, пусть и в ограниченных областях ЦНС. Однако надежды на собственный регенеративный потенциал НСК не оправдались: оказалось, что они не могут обеспечить регенерацию за пределами узкой зоны их компетенции, хотя и способны к миграции в область повреждения. Этот факт активировал исследования по созданию дополнительных нейрогенных зон в ЦНС путем трансплантации экзогенных НСК, фетальных или нейральных предшественников, полученных из эмбриональных и плюрипотентных стволовых клеток. После трансплантации нейральные клетки способны дифференцироваться и восстановить утраченные функции мозга за счет интеграции в нейронные сети хозяина и трофического влияния на поврежденные клетки. Несмотря на значительные достижения, остается ряд нерешенных проблем, связанных с возможностью отторжения пересаженных клеток, активации иммунных процессов или их туморогенностью.

В последние годы, благодаря достижениям в области репрограммирования клеток, стало развиваться новое направление, где в качестве нейрогенного источника предлагаются собственные клетки астроцитарного ряда, так называемые «латентные прогениторы». К ним можно отнести клетки Мюллеровой глии сетчатки, паренхимные астроциты и NG2 клетки в мозге, обладающие высокой пластичностью и способностью к пролиферации. При определенных условиях, например, при травме или ишемии, они способны к дедифференцировке до стволового состояния, после чего они могут дифференцироваться в нейроны. В последние годы многие исследования нацелены на изучение их эндогенных нейрогенных свойств и механизмов искусственного репрограммирования, путем активации определенных пронейральных генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-74-00117.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С РАЗНЫМ
ОСТЕОГЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПОДЛОЖКАХ
ИЗ КОЛЛАГЕНА I ТИПА**

Александрова С.А.¹, Соловьева А.Н.², Нащекина Ю.А.¹

¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alekssvet2205@gmail.com

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

**COMPARATIVE ANALYSIS OF CELL LINES WITH DIFFERENT OSTEOGENIC
POTENTIALS ON TYPE I COLLAGEN SUBSTRATES**

Alexandrova S.A.¹, Solovieva A.N.², Nashchekina Yu.A.¹

¹Institute of Cytology, St. Petersburg, alekssvet2205@gmail.com

²Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University

Введение. Белки внеклеточного матрикса играют важную роль в дифференцировке клеток. Процессы остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) в костной ткани происходят при участии коллагена I типа. Однако к настоящему времени еще не сформированы точные представления о соотношении структурных форм коллагена и способности клеток приобретать или сохранять дифференцированное состояние.

Цель исследования – провести сравнительный анализ клеточных линий с разным дифференцировочным статусом по степени проявления признаков остеогенной дифференцировки в процессе культивирования *in vitro* на подложках из коллагена I типа в молекулярной и фибриллярной форме.

Материалы и методы. В работе использовали шесть клеточных линий с разной степенью выраженности остеогенной дифференцировки: линии МСК - костного мозга эмбриона человека (FetMSC), пупочного канатика человека (MSCWJ-1 и первичная культура МСК ПК) (недифференцированные неиммортиализованные); первичная культура остеобластов, выделенных из головки большеберцовой кости человека (ОЧ) (дифференцированные неиммортиализованные) и постоянные линии остеосаркомы человека - Nos (TE85, clone F5) и MG-63 (дифференцированные иммортиализованные). Клеточные линии FetMSC, MSCWJ-1, Nos и MG-63 были получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН, остальные – сотрудниками Института. Клетки культивировали на подложках с двумя видами микрорельефов из коллагена I типа (молекулярного и фибриллярного) в индукционной остеогенной среде. Степень проявления признаков остеогенной дифференцировки клеток оценивали путем количественного анализа их окраски на щелочную фосфатазу смесью реактивов BCIP/NBT после 10-суточного культивирования и окраски на соли кальция ализариновым красным – после 25 сут. Для сравнительной оценки

выраженности остеогенных свойств определяли «интенсивность дифференцировки» (ИД) по соотношению процента (%) пикселей окрашенных клеток, культивируемых в остеогенной среде, к % пикселей окрашенных клеток, культивируемых в ростовой среде. Данные получали в программе ImageJ.

Результаты и обсуждение. Анализ результатов выявил, что у клеток, культивируемых на коллагеновых подложках обоих видов, ИД была гораздо выше, чем у клеток, культивируемых на стандартном пластике (контроль). Также было обнаружено, что у клеток разных линий МСК (FetMSC, MSCWJ, МСК ПК) более высокие показатели ИД обнаруживались при культивировании на молекулярном коллагене, чем на фибриллярном. Противоположная картина была выявлена у более дифференцированных клеток (Nos, MG63, ОЧ).

Заключение. В результате полученных данных можно сделать вывод, что культивирование клеток на коллагеновых микрорельефах повышает способность клеток с разной степенью иммортализации и дифференцированности вырабатывать щелочную фосфатазу и фосфаты кальция, что говорит о повышении их дифференцировочного статуса в таких условиях. При этом было отмечено, что микрорельефы молекулярного коллагена активнее способствуют проявлению этого признака для недифференцированных клеток (линий МСК), а микрорельефы фибриллярного - для более дифференцированных клеток. Таким образом, можно сделать вывод, что микрофибриллы молекулярного коллагена I типа более активно способствуют приобретению остеогенного фенотипа клетками МСК, что может быть важным при создании тканеинженерных конструкций на основе коллагена. В то же время для более дифференцированных иммортализованных клеток микрорельефы из фибрилл фибриллярного коллагена способствовали повышению дифференцировочного статуса, что может иметь важное значение для их нормализации и снижению опухолевой прогрессии.

ПРОФИЛЬ В-ЛИМФОЦИТОВ КАК МАРКЕР НЕЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ МЕТОТРЕКСАТОМ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Алексанкин А.П.¹, Мартынова А.В.²

¹ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, aap2004@yandex.ru

²ФГБНУ «НИИР им. В.А. Насоновой», Москва

B-LYMPHOCYTES PROFILE AS A MARKER OF INEFFECTIVE METOTREXATE THERAPY FOR RHEUMATOID ARTHRITIS

Aleksankin A.P.¹, Martynova A.V.²

¹Research Institute of Human Morphology, Moscow, aap2004@yandex.ru

²V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation,

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – иммуно-воспалительное (аутоиммунное) ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом и системным поражением внутренних органов, в лечении которого используются многочисленные препараты с различной химической структурой, фармакологическими свойствами, способные подавлять развитие воспаления [Насонов Е.Л. и др., 2008]. Среди лекарственных препаратов, применяемых для лечения ревматоидного артрита (РА) и других ревматических заболеваний, особое место занимает метотрексат (МТ) [Smolen JS et al., 2010]. Согласно рекомендациям EULAR именно «МТ следует рассматривать как основной компонент стратегии “первой линии” лечения активного РА»

Цель исследования – изучить изменение профиля субпопуляций В-лимфоцитов при ревматоидном артрите у пациенток с неэффективностью терапии метотрексатом.

Материалы и методы. В исследование включено 40 женщин, больных РА (средний возраст 54.2; 47-62 лет), разделенных на 2 группы: 20 пациенток до терапии МТ (длительность заболевания 56,5; 23-81 мес., DAS28 5.8; 5.15-6.2 б.) и 20 пациенток на терапии МТ перед сменой лечения в связи с его неэффективностью (длительность заболевания 84; 24-121 мес., средняя доза МТ 20; 15-20 мг/неделю, продолжительность терапии МТ 24; 6-50 мес., DAS28 6.31; 5.64-6.88 б.).

Всем пациентам проведено иммунофенотипирование субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови включающее определение уровней В-клеток (CD19+), общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+), непереключенных (CD19+IgD+CD27+) и переключенных (CD19+IgD-CD27+) В-клеток памяти, наивных (CD19+IgD+CD27-), двойных негативных клеток (CD19+IgD-CD27) и транзиторных (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-) В-

клеток, плазмоцитов (CD19+CD38+) и плазмобластов (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-), проводилось методом многоцветной проточной цитофлуориметрии.

Результаты и обсуждение. В отличие от наивных пациенток, у больных на терапии МТ отмечалось достоверное снижение абсолютного (0.0015; 0.001-0.0035 vs 0.003; 0.0017-0.0044, $p<0,02$) и относительного (1.15; 0.85-1.7 vs 2.1; 1.6-3.1, $p<0,001$) числа В-клеток памяти, абсолютного (0.01; 0.005-0.015 vs 0.0187; 0.0133-0.0289, $p<0,001$) и относительного (6.8; 3.55-10.7 vs 16; 9.3-18.4, $p<0,001$) числа «переключенных» В-лимфоцитов (CD19+CD27+IgD-). Снижение числа плазмобластов (CD19+CD38+++ CD27+ IgD-CD20-) (абсолютные значения 0.00025; 0.00007-0.00035 vs 0.000708; 0.0002304-0.001287, $p<0,001$) и транзиторных клеток (CD19+CD38++CD10+ IgD+ CD27-) (абсолютные значения 0; 0-0.0001 vs 0.00042408; 0.00016192-0.000624, $p<0,001$) также отмечено при длительном течении РА. Статистически значимых изменений иных субпопуляций В-лимфоцитов и в профиле Т-лимфоцитов не отмечено. Отмечается статистически значимая связь повышения С-реактивного белка (24; 8,6-77 мг/л vs 40; 15,5-72,9 мг/л, $p<0,05$), повышения DAS28 (5,7; 4,83-5,99 б. vs 6,31; 5,64-6,88 б., $p<0,05$) и снижения указанных субпопуляций В-лимфоцитов в группе неэффективной терапии.

Заключение. У пациентов с высокой активностью РА отмечается снижение уровней разных видов В-лимфоцитов, что вероятно, свидетельствует о компенсаторной гиперпродукции иммуноглобулинов хронического воспаления и увеличения влияния цитокинов воспаления по мере прогрессии РА. Дальнейшее исследование позволит расширить наше понимание связи РА и субпопуляций лимфоцитов.

СТРУКТУРА СТЕНКИ ПИЩЕВОДА У ЛЮДЕЙ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Аминова Г.Г.

ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, Lab-funkanat@yandex.ru

THE STRUCTURE OF THE ESOPHAGUS WALL IN PEOPLE OF OLDER AGE GROUPS

Aminova G.G.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Lab-funkanat@yandex.ru

Введение. Функциональные нарушения пищевода у людей преклонного возраста являются следствием структурных изменений его стенок, развивающихся по мере старения человека. Так как морфологических исследований этих процессов практически не проводилось, целью данной работы явилось изучение особенностей преобразования стенки органа и его клеточного состава у людей, достигших пожилого и старческого возраста.

Материалы и методы. Исследовали фрагменты верхней, средней и нижней трети пищевода людей, умерших от сердечно-сосудистых заболеваний в пожилом возрасте (64-74 года, 5 случаев) и старческом возрасте (75-89 лет, 10 случаев). Для сравнения использовали материал погибших от случайных причин в 1-м зрелом (23–34 года, 3 случая) и во 2-м зрелом возрасте (36–53 года, 3 случая). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, азуром III и эозином, толуидиновым синим, методами Вейгерта, ван Гизон и Маллори. Подсчет клеток проводили в 25-узловой сетке на площади 880 мкм² при $\times 1000$. Относительное содержание клеток выражали в процентах. В пределах каждой выборки определяли среднее арифметическое (M) и ошибку среднего (m). Сравнение средних осуществляли с помощью U -критерия Манна—Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Возрастные изменения затрагивают все части стенки пищевода. В эпителиальной выстилке отслаиваются и разрушаются поверхностные слои, что приводит не только к ее истончению, но и к оголению сосочков и непосредственному контакту собственной пластинки с внешней средой. Среди клеток эпителия, особенно часто в области сосочков, располагаются лимфоциты (около 6%), нейтрофильные (2%) и эозинофильные (0,5–1%) лейкоциты, число которых увеличивается по направлению к нижней 1/3 органа, где нередко возникают воспалительные процессы и микроэрозии. В собственной пластинке слизистой оболочки к пожилому возрасту в 1,65 раза увеличивается число клеток фибробластического ряда, которое в старческом возрасте сокращающееся на $1/3$ (в нижней части пищевода от 41,5% до 74,3%). С возрастом в собственной пластинке увеличивается содержание малых лимфоцитов (в верхней 1/3- в 3–4 раза, в нижней — в 1,5

раза), гибнущих клеток (особенно в верхнем отделе) и нейтрофильных лейкоцитов. Плазматические клетки, редко встречающихся в 1-м зрелом возрасте, в нижних отделах пищевода достигают 10,74%. Среди тучных клеток у людей преклонного возраста увеличивается число дегранулирующих клеток (в нижнем отделе в 3 раза). Мышечная пластинка слизистой оболочки с возрастом становится тоньше, в верхней 1/3 органа часто распадается на мелкие пучки миоцитов, разделенных коллагеновыми волокнами. Тем не менее, у людей преклонного возраста эта структура неплохо сохраняется. Подслизистая основа состоит из более тонких пучков коллагеновых волокон, содержит больше эластических элементов. Расположенные в ней кровеносные сосуды имеют набухший, десквамирующийся эндотелий, их мышечная оболочка – вакуолизированные миоциты. В мышцах верхней 1/3 пищевода большинство волокон утолщено, не имеет поперечной исчерченности, встречаются пучки миоцитов в состоянии деструкции. Редкая компенсаторная реакция проявляется в виде образования цепочек близко расположенных ядер миоцитов. В гладкой мускулатуре дистрофия и распад миоцитов отмечаются на всем протяжении органа. В мышцах (особенно в верхней 1/3 органа) интенсивно разрастается соединительная ткань. В нервных ганглиях и пучках нервных волокон у людей старших возрастных групп появляются лимфоциты, отмечается перичеселюлярный отек. Собственные железы с возрастом меняются мало. Небольшая часть мукоцитов распадается. В строме увеличивается число фибробластов и гибнущих клеток, возникают кровоизлияния и лимфоидные инфильтраты, которые в области начальных отделов выводных протоков бывают обширными. Вокруг крупных протоков увеличивается содержание клеток фибробластического ряда, плазмоцитов и разрушающихся клеток, появляются макрофаги.

Заключение. Возрастной фактор оказывает существенное влияние на структуру стенки пищевода. Нарушения эпителиального слоя ослабляют его защитную функцию, способствуют инфильтрации собственной пластинки лимфоцитами. Наличие обширных лимфоидных инфильтратов в области расположения начальных отделов выводных протоков желез свидетельствует о доступности этих мест для воздействия внешних факторов, которые посредством лимфатической системы могут оказывать влияние на состояние соседних органов. Частичный распад мукоцитов желез может снижать секреторную функцию органа.

Отмеченное в старческом возрасте количественное снижение клеток в слизистой оболочке пищевода при относительно невысоком уровне их распада, может быть связано с ослаблением их митотической активности с возрастом. Склерозирование стенки, дистрофические изменения мышц, нарушение нервной регуляции являются основной причиной нарушения моторики пищевода у людей в старости.

ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Ездакова М.И., Андреева Е.Р.

ФГБУН ГНЦ РФ–Институт медико-биологических проблем РАН, Москва,

andreeva_er@mail.ru

GAP UNCTIONS IN REGULATION OF ENDOTHELIAL AND STROMAL CELLS

Ez dakova M.I., Andreeva E.R.

Institute of Biomedical Problems, RAS, Moscow, andreeva_er@mail.ru

Введение. Щелевые контакты являются одними из самых высокотехнологичных по структуре видов межклеточной коммуникации, обеспечивая не только передачу электрического импульса, но и метаболическую кооперацию между клетками за счет непосредственного обмена цитоплазматическими компонентами. ЩК обеспечивают формирование гомоклеточных и гетероклеточных функциональных синцитиев. В подобных надклеточных кооперациях клетки стромального дифферона, такие как мультипотентные мезенхимальные стромальные/перициты (МСК), гладкомышечные (ГМК), эндотелиальные (ЭК) скоординированно отвечают на внешние стимулы. Кроме того, между этими клетками возможно создание и гетероклеточных коопераций, которые вносят существенный вклад в контроль состояния сосудистой стенки, а также в регуляцию гомеостаза других тканей как при физиологических, так и при патологических условиях.

Цель исследования - оценка влияния уровня гомотипической коммуникации МСК-МСК через ЩК на поляризацию их фенотипа и способность регулировать функциональную активность ЭК.

Материалы и методы. В работе использованы культивируемые митотически неактивные МСК жировой ткани человека и линейные ЭК (EA.hy926). Для подавления ЩК использовали специфический ингибитор карбенексолона. Состояние клеточных органелл характеризовали с помощью флуоресцентных зондов (Invitrogene, США). Ненаправленную миграцию клеток оценивали в модели «раны». Для оценки фагоцитоза использовали латексные частицы. Влияние на степень коммитирования МСК определяли методом ПЦР по изменению экспрессии соответствующих генов. Пролиферативную активность ЭК определяли CellProliferationReagentWST-1 (Sigma-Aldrich, США).

Результаты и обсуждение. После экспозиции с карбенексолоном в МСК выявлено повышение трансмембранного потенциала митохондрий (MitoTrackerRed), содержания АФК (AM-H2CFDA), и снижение активности лизосомального компартмента (LysoTrackerGreen). Эти эффекты сопровождались изменениями в функциональной

активности МСК. При определении ненаправленной миграции площадь открытой «раны» через 6 часов после повреждения монослоя МСК была на 40% меньше, чем в МСК с работающими щелевыми контактами ($p < 0.05$, $n=3$). Способность к захвату частиц латекса после ингибирования ЩК снижалась практически в два раза: доля фагоцитирующих МСК составила 35% в контроле и 18% в МСК после экспозиции с карбеноксолоном ($p < 0.05$, $n=4$). Ингибирование ЩК привело к подавлению транскрипции ключевых генов ранней остеодифференцировки – ALPL (щелочная фосфатаза) и RUNX2 (мастер-ген транскрипции при остеогенезе), а также адипогенов PPAR- γ (мастер-ген, ранний маркер коммитирования) и ADIPOQ (адипонектин, поздний маркер) в 2 и 5 раз, соответственно.

Влияние эффективности работы ЩК в МСК на их коммуникации с ЭК было изучено при прямом контакте. При использовании МСК с ингибированными ЩК в сокультуре была достоверно увеличена способность клеток к миграции (скорость закрытия «раны»), пролиферативной активность ЭК при этом была снижена ($p < 0,05$).

Заключение. В настоящее время метаболическая кооперация клеток через ЩК вызывает все больший интерес. Контроль такого рода взаимодействий востребован в области сердечно-сосудистых заболеваний, ремоделирования тканей, воспаления, доброкачественных и злокачественных новообразований и др. Можно предположить, что блокировка гомо- и гетеротипических ЩК между ЭК и стромальными клетками во время ранней ишемии может предотвратить расширение ишемической зоны, а контроль открытия/закрытия канала - помочь контролировать сосудистую функцию, что, возможно, будет играть важную роль в предотвращении спазма сосудов. Кроме того, поскольку недавно было показано, что ЩК играют роль в воспалительных реакциях, можно предположить возможность модуляции этого процесса через регуляцию ЩК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00075 и при поддержке Гранта Президента Российской Федерации МК-808.2020.4

**КОРРЕЛЯЦИЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ И
ВЫРАЖЕННОСТИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ
ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ КОЖИ КРЫС ПРИ ЛЕЧЕНИИ НОВЫМ
ПРОИЗВОДНЫМ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Андреанова Е.В., Егорова Е.Н., Петрова М.Б.

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет,

andrianovaalenav@mail.ru

**CORRELATION OF METAL PROTEINASE ACTIVITY AND EXPRESSION OF
OXIDATIVE STRESS DURING RATS SKIN THERMAL BURNS REGENERATION IN
TREATMENT WITH THE NEW DERIVATIVE OF N-ACETYL-6-AMINOGEXANOIC
ACID**

Andrianova E.V., Egorova, E.N., Petrova M.B.

Tver State Medical University, andrianovaalenav@mail.ru

Введение. N-ацетил-6-аминогексановая (ацексамовая) кислота и ее производные обладают прорегенераторной активностью в отношении повреждений кожи, слизистых и костной ткани (Скачилова С.Я., с соавт. 2018). Биохимические механизмы прорегенераторного действия данных веществ окончательно не установлены. В этом аспекте представляет интерес влияние производных ацексамовой кислоты на металлопротеазную активность и выраженность оксидативного стресса в регенерирующих тканях. *Цель исследования* – определить соотношение матриксной металлопротеиназы 9 типа и тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 типа, индекс оксидативного стресса, а также рассчитать степень их корреляции в регенерирующих тканях в процессе заживления при лечении термических ожогов кожи крыс мазью с новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование проведено на 45 беспородных крысах, у которых по стандартной методике были смоделированы термические ожоги. Животные были разделены на три группы по 15 особей. Крысам опытной группы ежедневно после нанесения ожога наносили на раны мазь, содержащую 2% производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты (N-ацетил-6-АК), синтезированного и предоставленного АО «ВНЦ БАВ», г. Старая Купавна. Животным первой контрольной группы обработки ран не проводили, крысам второй контрольной группы на раны наносили только мазевую основу (полиэтиленгликоль). На 7, 14 и 21 сутки исследования измеряли площади ран и из области раневых дефектов получали биоптаты тканей стандартного объема и массы, освобожденные от струпа и подкожной жировой клетчатки. Биоптаты тканей помещали в изотонический

раствор натрия хлорида в соотношении 1:10 (масса:объем) и готовили из них гомогенаты с помощью гомогенизатора. В супернатантах гомогенатов методом иммуноферментного анализа проводили количественное определение металлопротеиназы 9 типа (ММР-9) и тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 типа (ТИМР-1). Рассчитывали отношение ММР-9/ТИМР-1, которое использовали для оценки результатов эксперимента, поскольку именно соотношение фермента и его ингибитора характеризует частично протеолитическую активность в тканях ран и влияет на процесс репарации. Индекс оксидативного стресса (ИОС) в супернатантах гомогенатов рассчитывали как отношение общей оксидантной активности к общей антиоксидантной активности, определенных фотометрическим методом. Для оценки зависимости между показателями использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена (R_s).

Результаты и обсуждение. Планиметрическое изучение показало, что средняя площадь ран животных опытной группы на всех стадиях репарации была достоверно меньше ($p < 0,05$), чем обеих контрольных групп, различия между которыми не были статистически значимыми. Полное рубцевание ожоговых ран у крыс опытной группы произошло на $2 \pm 0,37$ дня раньше, чем в контрольных группах. Тенденция к снижению активности оксидативного стресса в опытной группе животных наметилась на 7 сутки эксперимента, а на 14 и 21 сутки установлено достоверное уменьшение показателя ИОС по сравнению с контрольными группами. Показатели ИОС в трех временных точках составили $3,93 \pm 0,57$, $2,75 \pm 0,26$ и $0,66 \pm 0,05$ ед. соответственно (все $p < 0,05$), что свидетельствует о статистически значимом снижении активности оксидативного стресса в процессе репарации термического ожога. Соотношение ММР-9/ТИМР-1 у животных опытной группы во все сроки наблюдения было достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с показателями крыс контрольных групп, между которыми различия не были выявлены. Значение ММР-9/ТИМР-1 у животных опытной группы составило $48,2 \pm 1,84$, $35,7 \pm 1,05$ и $22,5 \pm 0,70$ ед. соответственно (все $p < 0,05$), то есть снижение активности ММР-9 происходило статистически значимо в ходе заживления ожога. Корреляционный анализ зависимости ММР-9/ТИМР-1 от ИОС в гомогенатах тканей из области ран показал наличие корреляции средней степени между ними только среди крыс опытной группы на 7 и 14 сутки эксперимента – $0,56$ и $0,64$ ($p < 0,05$) соответственно.

Заключение. Местная обработка термических ожогов кожи крыс мазью, содержащей 2% нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, сокращает сроки их заживления и происходит на фоне снижения выраженности оксидативного стресса и протеолитической (ММР-9) активности в тканях раневого дефекта, достоверная корреляция между которыми выявлена на 7 и 14 сутки эксперимента.

**ОГРАНИЧЕНИЕ КАЛОРИЙНОСТИ ПИТАНИЯ У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ
КРЫС КАК ПОДХОД ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ
ПОЧКИ**

Андреанова Н.В.

НИИ Физико-Химической Биологии имени А.Н. Белозерского, Москва,

andrianova@belozersky.msu.ru

Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва

**DIETARY RESTRICTION AS AN APPROACH TO INCREASE ISCHEMIC
TOLERANCE OF KIDNEY TISSUE IN YOUNG AND OLD RATS**

Andrianova N.V.

A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow,

andrianova@belozersky.msu.ru

Faculty of Bioengineering and Bioinformatics of Lomonosov Moscow State University,

Moscow

Введение. Острое почечное повреждение (ОПП) является социально значимым заболеванием, особенно часто встречающимся среди пожилых пациентов и больных в отделениях интенсивной терапии. ОПП представляет собой гетерогенный синдром, вызванный различными причинами, основными из которых являются повреждения ишемического характера. В настоящее время разрабатываются методы терапии и предупреждения ОПП, среди которых перспективным считается ограничение калорийности питания (ОКП). ОКП представляет собой уменьшение потребления питательных веществ без недоедания и рассматривается как способ повышения ишемической толерантности многих тканей, в том числе почечной. Для многих видов организмов показано, что ОКП обладает рядом положительных эффектов, в частности, приводит к увеличению продолжительности жизни и замедлению проявления возрастных заболеваний, к которым можно причислить и ОПП. *Цель исследования* - изучение защитных свойств ОКП, в том числе регенеративных, на почечной ткани при ишемическом ОПП.

Материалы и методы. Все эксперименты, выполненные в данной работе, проводили на молодых крысах возрастом 3-4 месяца, в также на старых, возраст которых составлял 21-23 месяца. ОПП моделировали с помощью унилатеральной ишемии/реперфузии (И/Р) почки с контрлатеральной нефрэктомией. У животных, перенесших И/Р, оценивали снижение функции почек, а также анализировали степень повреждения почечной ткани. ОКП осуществляли путем ограничения количества корма на 35% от нормального рациона питания. У молодых крыс длительность ОКП составляла 4 недели, тогда как у старых крыс

исследовалось ОКП продолжительностью 4 или 8 недель. Для изучения механизмов ОКП у экспериментальных животных получали образцы гомогенатов почечной ткани и витальные срезы, в которых с помощью вестерн-блоттинга и конфокальной микроскопии исследовали активность работы аутофагосомально-лизосомальной системы и системы митофагии, функционирование митохондрий, интенсивность окислительного стресса и процесса регенерации. Параллельно были проведены опыты *in situ* на выделенных клетках канальцев, а также на первичной культуре эпителия почечных канальцев, в которых анализировали пролиферативный потенциал, степень активации аутофагии, функционирование митохондрий, уровень окислительного стресса и содержание липофусциновых гранул.

Результаты и обсуждение. Было показано, что 35% ОКП в течение 4 недель обладает защитным действием на молодых крысах, которое реализовалось через активацию систем ауто- и митофагии, улучшение работы митохондрий и снижение окислительного стресса. Несмотря на выраженное положительное влияние ОКП на почечную ткань молодых животных, действие ОКП на старых крыс оказалось существенно слабее и не приводило к активации тех же механизмов. Потеря нефропротекторного потенциала ОКП сопровождалась большим количеством возрастных изменений в почках старых крыс, в частности, многократным снижением пролиферативных свойств клеток, ухудшением работы аутофагосомально-лизосомальной системы и митофагии, нарушением функционирования митохондрий и накоплением гранул липофусцина. Увеличение продолжительности ОКП до 8 недель у старых крыс не приводило к проявлению значительных нефропротекторных эффектов на физиологическом уровне, однако, наблюдался ряд положительных изменений в почечной ткани, в частности, увеличивался митохондриальный трансмембранный потенциал, снижалась продукция активных форм кислорода и уровень карбонилированных белков.

Заключение. Таким образом, ОКП обладает выраженным нефропротекторным действием при ишемическом ОПП и может стать перспективным методом терапии ОПП, но пока лишь у молодых больных. Для разработки терапии пожилых пациентов требуется дальнейшее изучение защитных механизмов ОКП и их адаптация с учетом морфофункциональных изменений почечной ткани при старении.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-34-90023.

**ДИНАМИКА ИНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС В
ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

**Кириллов Ю.А.¹, Арешидзе Д.А.¹, Козлова М.А.², Макарецва Л.А.², Чернов И.А.³,
Штемплевская Е.В.¹**

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, ²ГОУ
ВПО МО Московский государственный областной университет, notbio@mgou.ru, ³ФГБОУ
ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России.

INFORMATIONAL STATE OF RAT LIVER IN ONTOGENESIS

**Kirillov Yu.A.¹, Areshidze D.A.², Kozlova M.A.², Makartseva L.A.², Chernov I.A.³,
Shtemplevskaya E.V.¹**

¹Research Institute of Human Morphology, Moscow, ²Moscow State Regional University,
notbio@mgou.ru, ³Tyumen State Medical University of the Ministry of Health of Russia.

Введение. Изучение онтогенетических преобразований в организме млекопитающих и механизмов их реализации на различных уровнях организации остается одним из наиболее актуальных вопросов современной биологии и медицины. Важным является вопрос изучения роли этих преобразований в инициации патологий, особенностях их протекания, динамике лечения. Морфофункциональные изменения в пре- и постнатальном онтогенезе всё чаще рассматриваются как явления, вызванные динамикой адаптационных, компенсаторных и регенераторных возможностей живых систем различного иерархического уровня, во многом определяющие успешность поддержания гомеостаза, обеспечивая структурное и функциональное единство компонентов системы, как в норме, так и при патологии. При оценке адаптационно-компенсаторных ресурсов этих систем применяются различные критерии, но каждый из них не является полностью объективным и интегративным и не позволяет комплексно оценить адаптационные и регенераторные ресурсы исследуемой системы, отображая преимущественно функциональные или морфологические её особенности. Этот факт свидетельствует о необходимости поиска и внедрения в практику новых критериев, позволяющих интегративно, то есть с учетом взаимосвязи как морфологических, так и функциональных параметров, характеризовать состояние адаптационных и регенераторных возможностей биологических систем в динамике. В то же время информационные параметры, рассчитываемые на основе энтропии, всё чаще используется в качестве критерия оценки состояния различных систем и органов млекопитающих, в том числе и в медицинской практике. Можно предположить, что именно энтропия биосистем может явиться критерием, комплексно характеризующим совокупность адаптационно-приспособительных возможностей биосистем при различных

функциональных состояниях. Рассматривая онтогенез как непрерывный процесс адаптации, направленной на поддержание гомеостаза, представляется возможным использовать комплекс информационных параметров, отражающих уровень адаптационных и регенераторных возможностей организма, в качестве рациональных интегративных критериев критичности определённых периодов онтогенеза.

Материалы и методы. Для исследования онтогенетической изменчивости информационного состояния печени млекопитающих нами было использовано 9500 белых крыс линии Вистар. Нами прослеживался онтогенез крыс, начиная с 1-го дня постнатального онтогенеза. При заборе органов строго учитывался возраст животного для создания статистически достоверного массива данных. Для достоверности результатов исследовали органы не менее, чем от пяти животных в каждый день онтогенеза. Максимальный возраст животных, использованных в исследовании – 1300 суток. Определялись: информационная морфологическая ёмкость (H_{max}), информационная морфологическая энтропия (H), информационная морфологическая организация (S), относительная морфологическая энтропия (h), информационная морфологическая избыточность (R).

Результаты и обсуждение. Анализ динамики информационных и морфофункциональных параметров исследованных органов крыс в онтогенезе позволил нам выявить в них определённую цикличность. Нами установлено, что колебания носят достаточно закономерный характер. При анализе динамики изменчивости исследованных параметров видно, что период онтогенеза, на который придется очередная точка экстремума, т.е. точка, в которую изменится направление динамики состояния системы, определяется уравнением: $T_n = T_{n-1} + 1,29T_{n-1}$, где T_n – точка экстремума (с учетом 21 дней пренатального онтогенеза); T_{n-1} – предыдущая точка экстремума с тем же знаком (с учётом пренатального онтогенеза); 1,29 – постоянный коэффициент. Для печени в течение исследованного онтогенеза крыс нами обнаружено пять циклов.

Заключение. Нами отмечено постепенное нарастание величин H и h в онтогенезе и снижение S и R . При этом амплитуда колебания каждого параметра возрастала в течение развития. В онтогенезе печени прирост энтропии (увеличение величины H) составляет 25,8%. Кроме того, при рассмотрении динамики информационных параметров исследованных органов нами обнаружено, что на период молочного кормления у крыс приходится 1 критическая точка, на период полового созревания также 1 критическая точка, в репродуктивном периоде онтогенеза крыс нами отмечается 2 критические точки, и 1 критическая точка в период выраженных старческих изменений.

**ИНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ КАК
ПОКАЗАТЕЛЬ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ ОРГАНА ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ**

**Кириллов Ю.А.¹, Арешидзе Д.А.¹, Козлова М.А.¹, Макарецва Л.А.¹, Чернов И.А.²,
Штемлевская Е.В.¹**

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва,
labcelpat@mail.ru ²ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет
Минздрава России

**INFORMATIONAL STATE OF RAT LIVER IN ONTOGENESIS AS AN
INDICATOR OF THE ORGAN'S REGENERATIVE ABILITIES IN EXPERIMENTAL
TOXIC DAMAGE**

**Kirillov Yu.A.¹, Areshidze D. A.¹, Kozlova M.A.¹, Makartseva L.A.¹, Chernov I.A.²,
Shtemplevskaya E. V.¹**

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, labcelpat@mail.ru
Tumen State Medical University of the Ministry of Health of Russia

Введение. Рядом ранее проведенных исследований нами была показана онтогенетическая изменчивость адаптационно-компенсаторных возможностей печени. Анализ динамики информационных и морфофункциональных параметров исследованных органов крыс в онтогенезе позволил выявить в ней определенную цикличность. Установлено, что колебания носят достаточно закономерный характер. При анализе динамики изменчивости исследованных параметров видно, что период онтогенеза, на который придется очередная точка экстремума, т.е. точка, в которую изменится направление динамики состояния системы, определяется уравнением: $T_n = T_{n-1} + 1,29T_{n-1}$, где T_n – точка экстремума (с учетом 21 дней пренатального онтогенеза); T_{n-1} – предыдущая точка экстремума с тем же знаком (с учётом пренатального онтогенеза); 1,29 – постоянный коэффициент. Для печени в течение постнатального онтогенеза крыс нами обнаружено пять циклов. Представлялось актуальным исследовать регенераторные возможности печени в каждую из точек экстремума при действии гепатотропного вещества.

Материалы и методы. Для определения регенераторных возможностей печени в различные периоды онтогенеза биологически активных веществ на печень было использовано 320 белых крыс линии Wistar. В соответствии с задачами исследования нами было сформировано восемь возрастных групп, в состав которых входили крысы в возрасте 1, 1,5, 3, 4,5, 8, 11, 18 и 30 месяцев. Возраста соответствовали определенным нами точкам экстремума. Каждая возрастная группа была разделена на 2 подгруппы:

- контроль (n=20);
- животных, ингалируемых четыреххлористым углеродом по 2 мин. в сутки в течение 6 дней (n=20);

Проводили патоморфологическое исследование печени, определяли митотический, апоптотический и некротический индексы, вычисляли информационные параметры органа, характеризующие уровень его адаптационно-компенсаторных возможностей.

Результаты и обсуждение. Воздействие CCl_4 осуществлялось в установленные нами периоды смены направления изменения информационных параметров, отражающих уровень адаптационных и регенераторных ресурсов печени. Степень повреждения печени CCl_4 находится в зависимости от возраста подопытных животных, результаты воздействия этого фактора оказываются неодинаковыми в различные периоды онтогенеза. В те периоды онтогенеза, когда печень характеризовалась наименьшим уровнем реального существующего разнообразия, т.е. фактической энтропии системы, эффект действия CCl_4 оказывается менее выраженным по сравнению с теми периодами онтогенеза, которые характеризуются более высокими показателями этого параметра. Печень крыс в возрасте 1,5, 4,5, 11 и 30 месяцев характеризовалась одинаковой картиной патологических изменений в органе, и их тяжесть была значительно более выражена, чем в печени животных в возрасте 1, 3, 8 и 18 месяцев. При этом изменения информационных параметров в возрастах 1,5, 4,5, 11 и 30 месяцев существенно ниже, чем в 1, 3, 8 и 18. В то же время в печени крыс в возрасте 1, 3, 8 и 18 месяцев как в контроле, так и при воздействии CCl_4 более высокими оказывается митотический и апоптотический индекс, но более низким – некротический. Таким образом, уровень адаптационных и регенераторных ресурсов органа после воздействия патогена снижается значительно в периоды онтогенеза, характеризующиеся повышением энтропии системы печени.

Печень животных в возрасте 1, 3, 8 и 18 месяцев (т.е. в возрастные периоды, в которые нами выделена наибольшая устойчивость организма к воздействию неблагоприятных факторов) подвержена патогенному воздействию четыреххлористого углерода в меньшей степени, чем печень крыс в возрасте 1,5, 4,5, 11 и 30 месяцев (периоды онтогенеза, выделяемые нами как критические). Это позволяет нам утверждать, что эффект действия CCl_4 зависит от уровня адаптационно-регенераторных ресурсов в том периоде онтогенеза, на который оно приходится. Соответственно, в периоды онтогенеза, характеризующиеся наибольшим количеством резервных структур, т.е. наибольшей адаптационной и регенерационной способностью, биосистема наиболее устойчива к действию неблагоприятных факторов среды.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ НА КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ КРЫСЫ

Артемова Д.А., Вишнякова П.А., Ельчанинов А.В.

ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, artiomova.darya@yandex.ru

EFFECTS OF PLATELET-RICH PLASMA ON MESENCHYMAL STEM CELLS ISOLATED FROM RAT UTERUS

Artemova D.A., Vishnyakova P.A., Elchaninov A.V.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, artiomova.darya@yandex.ru

Введение. Богатая тромбоцитами плазма (PRP) – это плазма с концентрацией тромбоцитов выше среднего количества в норме, т.е. выше 200000/ μ l. PRP обладает способностью ускорять регенерацию тканей, также, на данный момент, PRP применяют в клинической практике при терапии тонкого эндометрия. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – это мультипотентные клетки, обнаруженные во многих тканях организма, в том числе и в эндометрии. *Цель исследования* – создание модели на основе МСК эндометрия крысы и исследование механизмов действия аутологичной PRP на полученной культуре.

Материалы и методы. У самок крыс линии Wistar забирали кровь пункцией из сердца и получали из нее обычную плазму (ОП) и PRP по стандартным протоколам, из матки крысы получали культуру стромальных клеток эндометрия крысы. После выделения клеток была доказана ее принадлежность к культуре МСК при анализе типичных МСК маркеров методами проточной цитофлуориметрии и иммуноцитохимического анализа, а также путем индуцированной дифференцировки клеток по трем направлениям: адипогенном, остеогенном, хондрогенном.

После доказательства выделенной культуры к культуре МСК мы проводили оценку влияния PRP и ОП на культуру МСК эндометрия крысы: пролиферацию, свойства стволовости, продукцию маркеров клеточного стресса и аутофагии, продукцию эстрогеновых рецепторов и матриксной металлопротеиназы 9 (ММР 9), противовоспалительные свойств.

Результаты и обсуждение. Иммуноцитохимическое окрашивание на маркер пролиферации клеток Ki-67 показало, что процент Ki-67+ ядер был выше в культуре клеток после 24 часов инкубации с PRP по сравнению с культурами клеток, инкубируемых с ОП и в полной питательной среде (ППС). Вестерн-блот анализ показал, что маркер стволовых клеток c-kit экспрессируется только в клетках, инкубируемых в ППС. При инкубации с ОП уровень стресс-индуцируемого белка p53 повышался, а при инкубации с PRP оставался на уровне контроля. Продукция антиапоптотического белка Bcl-2 во всех исследуемых группах

не изменялась. После инкубации с PRP и ОП значительно увеличилась экспрессия маркера аутофагии белка LC3B, MMP 9, ER α , а также продукция противовоспалительного интерлейкина 10.

Заключение. PRP стимулирует клеточное самообновления путем индукции аутофагии и усиления пролиферации МСК, ускоряет ремоделирование внеклеточного матрикса, повышает продукцию ER α в стромальных клетках эндометрия, а также PRP оказывает противовоспалительное действие.

Работа поддержана грантом РФФИ №17-15-01419 и грантом РФФИ №20-04-60027.

ЭКСПРЕССИЯ TGF β В СЕЛЕЗЕНКЕ БЕРЕМЕННЫХ МЫШЕЙ ПРИ СПОНТАННЫХ И ИММУНОЗАВИСИМЫХ АБОРТАХ

Артемяева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н.

ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, artemjeva_ksenia@mail.ru

EXPRESSION OF TGF β IN THE SPLEEN OF PREGNANT MICE DURING SPONTANEOUS AND IMMUNE-DEPENDENT ABORTIONS

Artem'eva K.A., Bogdanova I. M., Stepanova I.I., Boltovskaya M.N.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, artemjeva_ksenia@mail.ru

Введение. Существуют многочисленные механизмы, помогающие плоду избежать иммунной атаки со стороны матери. Трансформирующий ростовой фактор (transforming growth factor, TGF) β является одним из ключевых участников механизма супрессии, индуцируемой Т-регуляторными клетками. В то же время, при преждевременных родах выявлено повышение содержания TGF- β в околоплодных водах более чем в 3 раза. TGF- β обеспечивает положительное регулирование свертывания крови. Тромбоциты могут быть связаны с индукцией иммунной толерантности через высвобождение TGF- β . Учитывая физиологические эффекты TGF- β , очевидно, что в условиях преждевременных родов высокий уровень этого цитокина может быть фактором фиброгенеза.

Цель исследования – изучить экспрессию TGF β в селезенке беременных самок мышей при спонтанных и иммунозависимых абортах.

Материалы и методы. Для моделирования аллогенной физиологической беременности использовали комбинацию линий мышей ♀СВА×♂Balb/c, спонтанных абортот – комбинацию ♀СВА×♂DBA/2. Индуцированные и потенцированные аборты воспроизводили путем внутрибрюшинного введения на 5-й ДГ (завершение имплантации) и 7-й ДГ (до начала формирования плаценты) β -гептилгликозид мурамилдипептида (С7МДП) в 0,1мл 0,9% раствора NaCl (20 мкг на 1 животное, \approx 1 мг/кг) самкам с физиологической

беременностью или спонтанными абортами, соответственно. Методом иммуногистохимического окрашивания определяли уровень экспрессии TGF- β в селезенке самок на 8 день гестации. Оценивали интенсивность окрашивания клеток с применением формулы H-score и плотность распределения TGF- β -позитивных клеток на 100 клеток селезенки, а также локализацию TGF- β^+ окрашивания внеклеточного матрикса.

Результаты и обсуждение. В группе физиологической беременности плотность распределения TGF- β^+ клеток составила 30/100 клеток селезенки, показатель плотности распределения в группе спонтанных абортов был вдвое меньше (15/100 клеток, $p=0,002$). В Показатель плотности при индуцированных абортах увеличился до 36,5/100 клеток, но различия с физиологической беременностью не были статистически значимы, показатель плотности при потенцированных абортах составил 21/100 клеток, значимо превышая показатель спонтанных абортов ($p=0,01$). При физиологической беременности и индуцированных абортах интенсивность TGF- β окрашивания клеток селезенки достоверно не различалась, при потенцированных абортах была значимо меньше, чем при спонтанных ($p=0,032$). В группах физиологической беременности и спонтанных абортов не наблюдали различий в локализации окрашивания клеток и внеклеточного матрикса (красная пульпа и зона периартериоллярных лимфоидных муфт (ПАЛМ-зона)). Группы иммунозависимых абортов характеризовало расширение локализации TGF- β^+ -окрашенных участков. Так, в группе индуцированных абортов положительно окрашенными на TGF- β оказались клетки и межклеточное вещество, локализующиеся в красной пульпе, ПАЛМ-зоне и маргинальной зоне (МЗ) лимфоидных узелков, а в группе потенцированных абортов TGF- β^+ -окрашивание было обнаружено в красной пульпе, ПАЛМ-зоне, МЗ и светлых центрах лимфоидных узелков. Расширение локализации TGF- β^+ окрашивания, очевидно, связано с тем, что при иммунозависимых абортах происходит увеличение объемных долей белой пульпы и Т-зависимой ПАЛМ-зоны под воздействием С7МДП. Вероятно, увеличение зон продукции и депонирования TGF- β отражает усиление Th1-клеточного иммунного ответа, неблагоприятного для развития беременности. Учитывая наблюдаемые в плацентах самок с иммунозависимых абортов гемостазиологические нарушения, усиление отложения фибрина и повышенное тромбообразование, а также роль TGF- β в регулировании свертывания крови, очевидно, что высокий уровень продукции этого цитокина может быть одним из механизмов ранних эмбриональных потерь.

Заключение. Исходя из полученных данных, роль TGF- β в процессе гестации представляется неоднозначной, особенно в условиях изначально скомпрометированной беременности (спонтанные аборты) и введения иммуномодулятора, стимулирующего Th1 иммунный ответ (индуцированные и потенцированные аборты).

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОДНИЖНЕЧЕЛЮСТНЫХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ БЕЛЫХ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Асламов А.П., Мустафина Л.Р.

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, Томск,

ant.aslamov@yandex.ru

SUBMANDIBULAR SALIVARY GLANDS MORPHOLOGY IN WHITE RATS OF DIFFERENT AGE GROUPS

Aslamov A.P., Mustafina L.R.

Siberian State Medical University, Tomsk, ant.aslamov@yandex.ru

Введение. Центральное место в поддержании гомеостаза полости рта позвоночных животных занимают поднижнечелюстные слюнные железы. Помимо внешнесекреторной роли и участия в пищеварении и формировании пищевого комка, доказана их эндокринная функция – они вырабатывают инсулиноподобный фактор роста, фактор, стимулирующий лимфоциты, фактор роста нервов и эпителия, и т.д. В иностранных источниках имеются данные, что с возрастом эти органы претерпевают изменения, но в отечественной литературе мало информации об этих трансформациях и их роли в функционировании слюнных желез. В связи с этим поднижнечелюстные железы являются актуальным объектом для изучения.

Целью нашего исследования явилось изучение изменений удельных объемов структурных компонентов поднижнечелюстной слюнной железы у крыс разных возрастных групп.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали поднижнечелюстные слюнные железы белых беспородных крыс-самцов. Материал распределяли на две группы: первую составили животные в возрасте 6 мес. (n=6), вторую – в возрасте 18 мес. (n=6). Материал фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина и заливали в парафин по общепринятой методике. Приготовленные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе «Микмед-6» (ув. 400). При помощи сетки Автандилова подсчитывали удельные объёмы (%) концевых отделов белковых и слизистых, исчерченные, вставочные, междольковые выводные протоки, стромы и сосудов, с последующим вычислением эпителио-стромального коэффициента (ЭСК). Полученные данные были обработаны методами описательной статистики с вычислением медианы (Me) и квартилей (Q25%-Q75%). Для оценки различий использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. При микроскопическом исследовании паренхимы поднижнечелюстных слюнных желез 6-ти месячных животных отмечались округлые,

неправильной формы концевые отделы. Ацинарные клетки характеризовались кубической формой с базально смещенными ядрами. Исчерченные выводные протоки вытянутой формы были выстланы столбчатыми клетками с апикальной зернистостью. В междольковых соединительнотканых прослойках располагались умеренно полнокровные сосуды.

Ацинусы поднижнечелюстных слюнных желез у 18-ти месячных крыс образованы цилиндрическими клетками и разделены прослойками соединительной ткани. Выводные протоки правильной округлой формы, заполнены секретом. В междольковой и внутридольковой строме наблюдались толстые пучки соединительной ткани с единичными фибробластами. Сосуды бедны эритроцитами.

При количественном анализе выявлено статистически значимое снижение удельных объёмов белковых и слизистых концевых отделов у 18-ти месячных крыс - 51,35 % (43,24-59,46 %) и 59,46 % (54,05-67,57 %; $p < 0,05$) соответственно, по сравнению с таковым у 6-ти месячных - 63,51 % (58,1-68,92 %) и 82,43 % (68,92-87,84 %; $p < 0,05$) соответственно. Также выявлено увеличение площади исчерченных и междольковых выводных протоков у 18-ти месячных животных 13,51% (10,81-21,62%) и 5,4% (5,4-8,1%), при сравнении с 6-ти месячными – 20,27% (10,81-27,03%) и 13,51% (10,81-21,62%; $p < 0,05$) соответственно. Очевидно преобладание удельных объёмов стромы у крыс возрастной группы – 16,22% (10,81-18,91%) в сравнении с таковым у молодых – 10,81% (5,4-13,51%; $p < 0,05$). ЭСК более чем в полтора раза был меньше у 18-ти месячных животных по сравнению с 6-ти месячными – 4,3 и 6,5 соответственно.

Заключение. С возрастом у крыс отмечено снижение объема железистой ткани и разрастание стромы, отражающие инволюционные процессы в поднижнечелюстных слюнных железах. Данные органы являются удобной моделью для объективной морфологической оценки возрастных изменений.

СВЯЗЬ АПОПТОЗА С РЕПАРАТИВНЫМИ ПРОЦЕССАМИ В ПОЧКАХ

Афанасьев Е.В.

*Институт Иммунологии и Физиологии Уральского Отделения Российской Академии
Наук, Екатеринбург, afevgenii@gmail.com*

RELATION OF APOPTOSIS TO RENAL REPAIR

Afanasiev E.V.

*Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of
Sciences, Ekaterinburg, afevgenii@gmail.com*

Введение. При частичном механическом повреждении почки наблюдается активация репаративных процессов. Активация процесса пролиферации в повреждённом органе сопровождается активацией апоптоза. Физиологический смысл активации апоптоза в ситуации? когда активно идут пролиферативные процессы? на данный момент недостаточно изучен.

Цель исследования - оценить уровень пролиферации и апоптоза в повреждённом органе в динамике.

Материалы и методы. Исследования были проведены на 12 беспородных крысах. Повреждение почки моделировали путем частичной левосторонней нефрэктомией (удалялась 1/3 левой почки). Пролиферацию определяли по экспрессии Ki67+ маркера (мышинные антитела (клон М1В-1) на поперечных срезах, окрашенных иммуногистохимическим методом. Оценку уровня апоптоза проводили путем подсчета Caspase 3+ положительных клеток в иммуногистохимических препаратах. В качестве первичных антител использовали кроличьи антитела к каспазе 3 (клон Е87) (Genetex, разведение 1:100). Оценка показателей проводилась с помощью пакета прикладных морфометрических программ анализа изображений ImageJ

Результаты и обсуждение. После частичной нефрэктомии в повреждённой почке отмечается активация пролиферации канальцевой зоны в сравнении с интактной группой. Количество Ki 67+ клеток увеличивается в 2,72 раза в канальцевом эпителии на первые сутки и снижается в 4,57 раза через 1 неделю. Репаративная регенерация почек сопровождается усилением апоптоза в канальцевых нефроцитах на 1 сутки. Через 1 неделю эпицентр апоптоза смещается в межканальцевый интерстиций с увеличением в 3,18 раза количества Caspase+ положительных клеток.

Заключение. Проведённое исследование подтверждает, что апоптоз является обязательным компонентом репаративных процессов в почке. Так как в эксперименте использовался метод определения положительных клеток по исследуемым маркерам на 100

клеток органа в сумме по полям зрения с отнесением к конкретной локации, это дало возможность более точно сравнить процессы в конкретных функциональных элементах органа. В динамике оба процесса демонстрируют достаточные отклонения от контроля, чтобы сделать вывод о индукции апоптоза и пролиферации путём механического повреждения органа. Исходя из данного наблюдения можно предположить, что апоптоз принимает участие в репаративных процессах.

РНК ЛИМФОЦИТОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ АДЬЮВАНТ В ИЗГОТОВЛЕНИИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Бабаева А.Г.¹, Геворкян Н.М.², Тишевская Н.В.³, Зотиков А.Е.⁴

³*ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва*

²*ФГБНУ НИИ биомедхимии им. В.Н. Ореховича, Москва, gevorkiann@yandex.ru*

³*ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский ун-т», Челябинск*

⁴*ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва*

RNA OF LYMPHOCYTES AS A POSSIBLE ADJUVANT IN THE MANUFACTURE OF ANTI-VIRAL VACCINES

Babaeva, A.G.¹, Gevorkyan, N.M.², Tishevskaya, N.V.³, Zotikov A.E.⁴

¹*Research Institute of Human Morphology, Moscow*

²*V.N. Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, gevorkiann@yandex.ru*

³*South Ural State Medical University, Chelyabinsk*

⁴*A.V. Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow*

Введение. Ранее нами на нескольких экспериментальных моделях было продемонстрировано наличие выраженной морфогенетической активности препаратов аллогенных и ксеногенных суммарных РНК, выделенных из лимфоидных клеток здоровых молодых животных, а также лимфоцитов периферической крови человека (Бабаева и др., 2016). Показано также, что указанная активность адекватна таковой самих лимфоцитов. Исходя из свойств и особенностей функционирования таких препаратов РНК, можно предложить их использование в вакцинологии.

Цель и задачи исследования: для повышения эффективности противовирусных вакцин можно предложить способы **повышения реактивности** лимфоцитов инфицируемого как активных участников в борьбе против вирусов, при этом наличие некоторого лаг-периода между попаданием вируса в организм и заражением индивида диктует необходимость изыскания путей **ускорения индукции реактивности** лимфоцитов. Именно такие явления имеют место при восстановительных процессах: изменения реактивности лимфоцитов,

связанные с изменением их состава, а именно с поразительно быстрым появлением в большом количестве хелперных лимфоцитов CD4⁺ направленного действия, с их морфогенетической, каталитической активностями и индукционными свойствами. Взяв суммарную РНК таких лимфоцитов в качестве адъюванта в составе противовирусных вакцин, можно усилить и ускорить процесс обезвреживания попавших в организм вирусов. И препятствием этому не является даже то, что точная природа активатора, стимулирующего каскад реакций при восстановительных процессах, неизвестна.

Исходя из особенностей функционирования лимфоидных клеток на ранней стадии морфогенетического (регенерационного) процесса – с одной стороны, и зная уже, что препараты суммарной РНК лимфоцитов обладают всем комплексом морфогенетических свойств, присущих самим лимфоцитам в момент изъятия из них РНК – с другой, мы полагаем, что можно использовать в составе вакцины суммарную РНК лимфоцитов CD4⁺, тем самым снабдив реципиента регуляторной программой для ускоренной индукции и реализации всех необходимых стадий борьбы с проникшим в организм вирусом.

Заклучение. В качестве адъюванта такая суммарная РНК в кратчайшие сроки (минуты!) вызовет увеличение численности лимфоцитов CD4⁺ за счет превращения большого количества имеющихся в организме предшествующих форм резервных лимфоцитов в лимфоциты с маркерами хелперов, одновременно вызывая стимуляцию деления Т-клеток. Обладая функциональными свойствами активированных лимфоцитов (усиленная миграционная способность и тропность к месту образования антител), основная масса этих лимфоцитов устремится в селезенку и лимфатические узлы, что приведет к длительному и устойчивому лимфоцитозу. Специфичность вакцины обеспечит антиген вируса, а лимфоцит, активированный восстановительным процессом, ускорит и усилит функцию защиты, обеспечив адъювантное действие.

Помимо этого, использование препаратов суммарной РНК, полученной из лимфоцитов на самой ранней стадии морфогенетического процесса, позволяет индуцировать весь функциональный блок в полном объеме, способствуя усилению и ускорению всей совокупности каскадных процессов в ряду антигенпрезентирующих, антигенраспознающих и антигенпродуцирующих клеток, включая и завершающий супрессорный этап, связанный с эффективной выработкой клеток памяти и надежным торможением пролиферативной волны. Такой подход может компенсировать индивидуальную недостаточность реактивных функций на тех или иных стадиях этого сложного и многокомпонентного процесса.

ЛИМФОИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ МОРФОГЕНЕЗОВ И ПОСТУЛАТЫ ИММУНОЛОГИИ

Бабаева А.Г.¹, Геворкян Н.М.², Тишевская Н.В.³, Зотиков А.Е.⁴

¹ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва

²ФГБНУ НИИ биомедхимии им. В.Н. Ореховича, Москва, gevorkiann@yandex.ru

³ФГБОУВО «Южно-Уральский государственный медицинский ун-т», Челябинск

⁴ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва

LYMPHOID REGULATION OF RESTORATIVE MORPHOGENESIS AND POSTULATES OF IMMUNOLOGY

Babaeva A.G.¹, Gevorkyan N.M.², Tishevskaya, N.V.³, Zotikov A.E.⁴

¹Research Institute of Human Morphology, Moscow

²V.N.Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, gevorkiann@yandex.ru

³South Ural State Medical University, Chelyabinsk

⁴A.V. Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow

Введение. В многочисленных работах показана тесная связь многих патологических процессов с функциональным состоянием иммунной системы, что обычно связывают с изменением антигенных свойств организма. При этом повышение уровня антителообразования и других иммунологических реакций обычно объясняют либо внедрением в организм чужеродного антигена, либо изменением свойств собственных антигенов, а известный феномен усиления иммунологического статуса при регенерации объясняют изменением антигенных свойств ткани на раневой поверхности.

Цель исследования – показать, что лимфоидная ткань реагирует повышением активности не только на чужеродный или измененный свой антиген, но и на **утрату** собственного антигена, так как и по сей день в разных формулировках принципа работы иммунной системы об этом не упоминается, несмотря на то, что именно этот сигнал запускает процессы физиологической и репаративной регенерации и компенсаторной гипертрофии.

Результаты и обсуждение. При регенерационных процессах усиление иммунного ответа на антиген обычно связывали со стимулирующим влиянием иммунных реакций на восстановительный процесс. Это казалось бесспорным, пока изучение проводилось на модели регенерации, однако исследование компенсаторной гипертрофии показало, что это не так: что восстановительный процесс и без раневой поверхности сопровождается феноменом усиления и даже в более выраженной форме. Специальные опыты по вариации размера раневой поверхности и объема удаленной ткани органа позволили установить, что

выраженность феномена усиления лишь в незначительной степени зависит от раневой поверхности и определяется в основном не антигенной стимуляцией, а количеством удаленной ткани (Бабаева, Гиммельфарб, 1988). Так, максимальный ответ был получен при двусторонней нефрэктомии: антителообразующая способность лимфоцитов, тестируемая путем их переноса летально облученным реципиентам вместе с введением им антигена, увеличивалась в 5 раз уже через 1 час после операции. При односторонней нефрэктомии она увеличивалась только в 3,5 раза через 5 часов. При удалении половин двух почек – в 2 раза через 12 часов, а при удалении половины одной почки – в 2 раза через 17 часов. Ранение паренхимы почки без удаления ткани в этом временном интервале никаких признаков усиления антителообразования не вызывало. Аналогичная зависимость от уровня удаленной ткани проявлялась и при изучении локальной РТПХ.

Сравнительный анализ иммунного ответа при регенерации и многих заболеваниях, инфекционных и неинфекционных, в том числе и аутоиммунных, показал, что первая фаза (индуктивная) этих процессов сходна и аналогична проявлениям врожденного иммунитета. Отличие между ними касается только скорости индуцируемого процесса и длительности отдельных этапов. По-видимому, все эти процессы относятся к одной и той же категории явлений: к процессам вторичного развития. Симптомокомплекс врожденного иммунитета наиболее быстро развивается при восстановительных процессах. При сочетании процессов регенерации и иммунного ответа инициация, скорость и уровень развития последнего определяются параметрами именно восстановительного процесса. Эта стереотипная индуктивная фаза, характерная для всех указанных процессов, обеспечивает переход в специфическую для каждого из них продуктивную фазу: при иммунном ответе это синтез специфических антител, а при восстановительном процессе – тканеспецифических белков.

Заключение. Большое сходство реакций иммунной системы на индуктор иммунного ответа и индуктор морфогенеза обусловлено тем, что в основе обоих ответов лежит активация системы стереотипных реакций, относимых физиологами к системе универсальных функциональных блоков. В данном случае роль универсального функционального блока играет симптомокомплекс врожденного иммунитета. Таким образом, иммунная система в большей мере отвечает усилением реакции на утрату своего антигена, чем на введение чужеродного или на измененный свой антиген. В связи с этим мы полагаем, что эффективность адьювантов в составе противовирусных вакцин и препаратов для профилактики и лечения аутоиммунных заболеваний будет существенно выше, если их изготавливать на основе морфогенетически активных лимфоцитов.

**ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК**

**Бабенко В.А.^{1,2}, Силачев Д.Н.^{1,2}, Горюнов К.В.², Певзнер И.Б.^{1,2}, Попков В.А.^{1,2}, Зорова
Л.Д.^{1,2}, Плотников Е.Ю.^{1,2}, Зоров Д.Б.^{1,2}**

¹ НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

² ФГБУ НМИЦ АГП имени В.И. Кулакова, Москва, valjababenko90@gmail.com

**AGE EFFECTS ON PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND
NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS**

**Babenko V.A.^{1,2}, Silachev D.N.^{1,2}, Goryunov K.V.², Pevzner I.B.^{1,2}, Popkov V.A.^{1,2}, Zorova
L.D.^{1,2}, Plotnikov E.Y.^{1,2}, Zorov D.B.^{1,2}**

¹A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State
University, Moscow

²V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and
Perinatology, Moscow, valjababenko90@gmail.com

Введение. Старение является сложным процессом, характеризующимся прогрессирующим ухудшением физиологических функций организма, оно может затрагивать все клетки организма, включая стволовые. Одним из современных подходов, предлагаемых для терапии патологий, ассоциированных с пожилым возрастом (инфаркты, инсульты, нейродегенеративные заболевания), являются клеточные технологии с применением мезенхимальных стромальных клеток (МСК). При этом для терапии часто предлагается использовать собственные (аутологичные) клетки пациента. Однако, на сегодняшний день имеются исследования, говорящие о функциональных изменениях в стволовых/прогениторных клетках, происходящих по мере увеличения возраста донора. В то же время отсутствуют убедительные данные об изменении энергетического метаболизма в МСК с возрастом и возможным влиянии старения на терапевтические свойства МСК. *Целью исследования* являлось сравнить физиологические изменения в МСК, полученных от старых и молодых крыс, а также сравнить зависимость от возраста нейропротекторных свойств МСК на модели черепно-мозговой травмы.

Материалы и методы. ММСК получали из костного мозга 10-дневных крысят и крыс 18 месячного возраста. Пролиферацию МСК оценивали *in vitro* с помощью мониторинга электрического импеданса в реальном времени на приборе RTCA iCELLigence. Кроме того, анализировали энергетический метаболизм на приборе Seahorse XFp Analyser, активность бета-галактозидазы, ассоциированной со старением, с помощью фирменного набора Cell

Signaling Technology, а также активность лизосомально-аутофагосомальной системы, используя флуоресцентные зонды CytoID и LysoTracker Green, а также антитела к Beclin-1, LAMP-1 and LC3. Оценка терапевтического эффекта от введения МСК крысам с травмой головного мозга проводилась с помощью МРТ и поведенческих тестов.

Результаты и обсуждение. В первую очередь были оценены нейропротекторные эффекты МСК у животных с экспериментальной травмой головного мозга. Трансплантация перинатальных МСК животным с травмой улучшала неврологический статус после нанесения травмы мозга. При этом не было обнаружено значительных изменений неврологического статуса у животных с травмой мозга, которым вводили МСК, полученные от старых доноров. Снижение нейропротекторных свойств «старых» МСК было ассоциировано со значительно более высокой активностью бета-галактозидазы, ассоциированной со старением, по сравнению с перинатальными МСК. Также было обнаружено, что перинатальные МСК характеризуются более высокой скоростью роста и более высоким уровнем белка PCNA. Таким образом, по мере увеличения возраста донора снижается пролиферативная активность МСК. В дополнение анализировался энергетический метаболизм МСК разных возрастов: измерялась скорость потребления кислорода (OCR) и уровень закисления среды (ECAR). При оценке митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования исследовались исходная скорость дыхания, эффекты олигомицина (ингибитор АТФ-синтазы), CCCP (разобщитель, активирующий максимальную скорость потребления кислорода) и ротенона/антимицина (ингибиторы НАДН-дегидрогеназного комплекса и цитохром-bc1-комплекса митохондриальной дыхательной цепи, полностью ингибирующие окислительное фосфорилирование и потребление кислорода митохондриями). Статистически значимых различий в OCR между МСК от старых крыс и перинатальными МСК не наблюдалось для всех исследованных воздействий. Оценку гликолиза в клетках проводили по показателю ECAR, который коррелирует с продукцией лактата как источника протонов. После добавления D-глюкозы, происходило более выраженное повышение ECAR у МСК от старых крыс по сравнению с перинатальными МСК, что говорит о большей степени использования гликолиза для получения энергии у МСК от старых животных. При оценке эффективности аутофагии не было выявлено различий в флуоресценции CytoID и LysoTracker Green между сравниваемыми типами МСК. Анализ белковых маркеров аутофагии, таких как Beclin-1, LAMP-1 and LC3 выявил только уменьшение содержания LAMP-1 в «старых» МСК, остальные параметры не изменялись.

Заключение. В МСК от старых доноров наблюдаются такие негативные изменения, как накопление маркеров старения, а также снижение пролиферативного потенциала и

увеличение уровня использования гликолиза. Было выявлено, что клетки от старых животных обладают значительно меньшей нейропротекторной эффективностью.

Работа поддержана Грантом РФФИ № 19-29-0409.

ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ ИЗ ПУПОВИННОЙ КРОВИ МОДИФИЦИРУЮТ МИКРООКРУЖЕНИЕ *EX VIVO*, ИНДУЦИРУЯ БИПОТЕНТНОЕ КОММИТИРОВАНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Бобылёва П.И.^{1,2}, Андреева Е.Р.¹, Ездакова М.И.¹, Андрианова И.В.¹, Горностаева А.Н.¹, Буравкова Л.Б.^{1,2}

¹ *ФБГУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем, РАН, Москва*

² *Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, blastoblast@gmail.com*

CORD BLOOD HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS SHAPE THEIR MILIEU *EX VIVO* THROUGH INDUCTION OF BIPOTENTIAL COMMITMENT OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Bobyleva, P.I.^{1,2}, Andreeva, E.R.¹, Ezdakova, M.I.¹, Andrianova, I.V.¹, Gornostaeva, A.N.¹, Buravkova, L.B.^{1,2}

¹ *Institute of Biomedical Problems, RAS, Moscow,*

² *Faculty of Fundamental Medicine, Moscow State University, blastoblast@gmail.com*

Введение. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) из разных тканевых источников способны *in vitro* формировать гемопоз-поддерживающее микроокружение, необходимое для эффективной экспансии кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников (ГСПК). Причём эффективность реализации этой функции зависит от коммитированности МСК: так, бипотентные (остео-/адипогенные) стромальные предшественники обладают более выраженной гемопоз-поддерживающей активностью. В свою очередь, по-видимому, дифференцировочный статус МСК может регулироваться самими ГСПК, на что указывают данные немногочисленных исследований влияния гемопоэтических клеток на стромальный компонент.

Целью данной работы была оценка способности ГСПК оптимизировать функции стромальных клеток, связанные со способностью поддерживать гемопоз и стимулировать экспансию ГСПК *ex vivo*.

Материалы и методы. В работе проводилось сокультивирование ГСПК из пуповинной крови человека с МСК, полученными из жировой ткани человека и предварительно

обработанными митомицином С для остановки пролиферации. В интактных и остеоиндуцированных МСК были оценены транскрипционный и секреторный профиль, связанный с коммитированием, а также гемопоэз-поддерживающая активность.

Результаты и обсуждение. Было продемонстрировано, что в ходе экспансии ГСПК регулировали функциональную активность МСК, способствуя формированию ранних стромальных предшественников, характеризующихся бипотентным остео-адипогенным профилем. В пользу этого свидетельствовало повышение экспрессии генов МСК, связанных с остео- и адиподифференцировкой (*ALPL*, *RUNX2*, *BGLAP*, *CEBPA*, *ADIPOQ*), а также увеличение активности щелочной фосфатазы и изменение профиля секреции белков, являющихся маркерами остеогенеза. В кондиционированной среде от сокультур МСК и ГСПК существовал баланс «положительных» (GM-SCF) и «отрицательных» (IP-10, MIP-1 α , MCP-3) регуляторов миелопоэза, способствующий эффективной экспансии ранних и коммитированных ГСПК. Предварительная краткосрочная 72-часовая остеогенная индукция перед сокультивированием способствовала в дальнейшем более выраженному проявлению признаков формирования бипотентного профиля МСК, о чём свидетельствовали изменения на транскрипционном уровне и на уровне секреции маркерных белков остео-дифференцировки. Увеличение доли поздних CD133⁻/CD34⁺ гемопоэтических предшественников и унипотентных КОЕ указывало на более выраженное коммитирование ГСПК при сокультивировании с остеоиндуцированными МСК по сравнению с недифференцированными МСК.

Заключение. Таким образом, при экспансии *ex vivo* ГСПК могут способствовать бипотентному остео-/адипокоммитированию МСК, обеспечивая специфическое гемопоэз-поддерживающее микроокружение. Предварительная короткая остеоиндукция способствует проявлению признаков бипотентного профиля МСК, приводя к более выраженной функциональной поляризации ГСПК, что может иметь важное значение в контексте применения для конкретных клеточно-терапевтических задач.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-29-04026.

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ СЛУЧАЕВ ЯЗВЕННОГО
КОЛИТА С БЛАГОПРИЯТНЫМ И НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ОТВЕТОМ НА
ТЕРАПИЮ**

Бакулин И.Г., Боднар Н.О., Мавликеев М.О., Гусейнов Х.М., Деев Р.В.

ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.

Мечникова, Санкт-Петербург, bodnar7nikita@gmail.com

**CLINICAL AND MORPHOLOGICAL OBSERVATION OF CASES OF
ULCERATIVE COLITIS WITH A FAVORABLE AND UNFAVORABLE RESPONSE TO
THE THERAPY**

Bakulin I.G., Bodnar N.O., Mavlikeev M.O., Guseinov Kh.M., Deev R.V.

I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint-Petersburg,

bodnar7nikita@gmail.com

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это группа рецидивирующих заболеваний, к которым относятся язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), характеризующиеся хроническим воспалением стенки кишки с развитием местных и системных осложнений. Течение болезни может быть как вялотекущим, без каких либо значимых проявлений с длительными периодами ремиссии так и агрессивным, с частыми обострениями нередко приводящими к длительной потере трудоспособности. У лиц страдающих ВЗК, важно предсказать какие из них более склонны к развитию тяжелых форм заболевания, что особенно важно при выборе лечебной тактики, так как это может существенно помочь в прогнозировании дальнейшего течения заболевания

Цель исследования - изучение морфологических изменений толстого кишечника при язвенном колите в зависимости от ответа на проводимую терапию.

Материалы и методы. Двум пациенткам, 33-х и 36-ти лет с установленным диагнозом «язвенный колит, умеренное обострение», было выполнено патоморфологическое исследование мультифокальных видеокколоноскопических биоптатов с оценкой выраженности повреждения, воспаления и регенерации слизистой оболочки (по иммуногистохимическому окрашиванию с антителами к Ki-67), состояния плотных контактов эпителиоцитов слизистой оболочки толстой кишки на основе (иммуногистохимического окрашивания (антителами к клаудину-1, а также к неприлизину).

Результаты и обсуждение. В ходе изучения биоптатов обеих пациенток было установлено, что белок межклеточных контактов клаудин-1, преимущественно локализован в области латеральных поверхностей эпителиальных клеток, более интенсивное окрашивание наблюдалось в поверхностных колоноцитах. У пациентки-нереспондера в

биоптатах толстой кишки с максимальной активностью наблюдалось неравномерное распределение клаудина-1 с тенденцией к базализации, а также более слабое по сравнению с пациенткой-респондером окрашивание эпителиоцитов крипт. Интенсивное и равномерное иммуногистохимическое окрашивание с антителами к неприлизину (CD10) было выявлено в щеточной каемке эпителиоцитов подвздошной кишки. В биоптатах толстой кишки пациентки-респондера окрашивание с антителами к неприлизину обнаруживалось только в отдельных скоплениях лимфоцитов в составе воспалительных инфильтратов, тогда как у пациентки-нереспондера также в фибробластах собственной пластинки слизистой оболочки толстой кишки под поверхностными колоноцитами и вокруг оснований крипт биоптатов с максимальной активностью воспаления. Максимальная пролиферативная активность была отмечена у обеих пациенток в эпителиоцитах оснований крипт и в поверхностном эпителии с выраженной воспалительной инфильтрацией в подлежащей строме. Проллиферативный индекс у пациента-респондера в среднем составил $39,6 \pm 14,5\%$ в эпителии и $19,8 \pm 5,16\%$ в строме против $32,8 \pm 11,5\%$ в эпителии и $6,72 \pm 5,29\%$ в строме у пациента-нереспондера.

Заключение. Неравномерность мембранного распределения клаудина-1 у пациентов с язвенным колитом может коррелировать с повышением проницаемости кишечного барьера – важного фактора этиопатогенеза язвенного колита. Наличие CD10+ фибробластов в собственной пластинке слизистой оболочки толстой в совокупности со сниженным пролиферативным потенциалом является возможным предиктором неблагоприятного ответа при проведении терапии пациентам с язвенным колитом в стадии обострения.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА. ОТ РАЗРАБОТКИ ДО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Божокин М.С.^{1,2*}, Божкова С.А.¹, Хотин М.Г.², Нащечкина Ю.А.²

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

²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *writeback@mail.ru

USE OF CELL ENGINEERING METHODS FOR REPLACEMENT OF HYALINE CARTAGE DEFECTS. FROM DEVELOPMENT TO EXPERIMENTAL APPLICATION

Bozhokin M.S.^{1,2*}, Bozhkova S.A.¹, Khotin M.G.², Nashchekina Yu.A.²

¹ Research Institute of Traumatology an Orthipedics named after R.R.Vreden,,

²Institute of Cytology, St. Petersburg, *writeback@mail.ru

Введение. Повреждения гиалинового слоя крупных суставов являются важной проблемой для многих людей во всём мире. Низкий регенеративный потенциал суставного

хряща, значительные механические нагрузки и травмы, возникающие в коленном и тазобедренном суставе, а также другие факторы приводят к ускорению дегенеративных процессов, что в конечном этапе требует трудоёмкой, инвазивной и дорогостоящей процедуры эндопротезирования. Существующие методы восстановления гиалинового хряща не способны в полном объёме решить данную проблему, поэтому актуальной задачей является разработка новых и перспективных методик восстановления повреждённой поверхности крупных суставов. Использование для этих задач подходов регенеративной медицины представляется наиболее перспективным.

В костной и хрящевой ткани важнейшую функциональную роль выполняет не клеточная часть ткани, а внеклеточный матрикс. Поэтому предлагается использование клеточно-инженерных конструкций (КИК) из биodeградируемого скаффолда, организующего структуру ткани и клеток пациента. Данный подход помогает создать функциональный аутологичный искусственный объект и заместить им дефектную зону в области повреждения гиалинового хряща.

Цель данной работы – создание КИК на основе полимера молочной кислоты (PLA) и культуры мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК), модифицированной рекомбинантным белком Tgfb3 и оценка её эффективности для регенерации гиалинового хряща.

Материалы и методы: Биodeградируемый скаффолд на основе полимолочной кислоты был создан методом лиофильной сушки. Культуру МСК выделяли из костного мозга половозрелых крыс. Модификацию клеток внутри полимера проводили по разработанному ранее протоколу с использованием важнейшего для хондрогенеза рекомбинантного белка Tgfb3 в концентрации 10 нг/мкл. КИК заселяли клетками при помощи избыточного давления N₂ специально разработанным устройством. Проникновение клеток внутрь биodeградируемого каркаса подтверждалась методикой конфокальной микроскопии. Оценивали пролиферацию клеток, помещенных в КИК, с помощью гистологических методов, а их дифференцировку с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Трансплантация КИК проводилась в область созданного модельного дефекта коленного сустава крысы. Животные выводились из эксперимента на 14, 30 и 90 сутки наблюдения. Анализ результатов производился с помощью методов сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и гистологических методик исследований.

Результаты: Полученная культура МСК одновременно экспрессировала поверхностные маркеры CD90+ и не экспрессировала CD45, что было подтверждено с помощью методов проточной цитометрии. Обработка клеток цитокином Tgfb3 приводила к

образовании хондросфер (клеточных агрегатов) уже на 3 сутки наблюдения, что свидетельствовало о начале дифференцировке клеток и одновременно приводила к увеличению экспрессии основных генов хондрогенеза *tgfb3*, *sox9*, *acan* на 21 сутки культивирования более чем в 80 раз. Результаты гистологических и СЭМ исследований на отдалённых сроках наблюдения (90 суток) у опытной (трансплантация КИК в область дефекта) и контрольной группы животных (без трансплантации, просто дефект) показал значительное увеличение размера созданного повреждения в контрольной группе. Напротив, в группах животных с трансплантацией КИК в область дефекта отмечалось уменьшение размера созданного повреждения

Заключение: Полученная КИК с увеличенной экспрессией основных генов хондрогенеза является перспективной для замещения дефектов гиалинового хряща, однако работа требует дальнейших исследований на крупных экспериментальных животных.

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ ПОД ВЛИЯНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ

Борхунова Е.Н., Надеждин Д.В.

ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И.Скрябина, borhunova@mail.ru

REPARATIVE REGENERATION OF SKIN UNDER CONDITIONS OF APPLICATION OF AUTOLOGICAL SUSPENSION OF STROMAL-VASCULAR FRACTION CELLS

Borkhunova E.N., Nadezhdin D.V.

K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, borhunova@mail.ru

Введение. Успешное применение суспензия аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции (СВФ) для стимуляции процессов физиологической и репаративной регенерации кожи обусловлено особенностями клеточного состава и спектром цитокинов, которые в настоящее время хорошо изучены. Вместе с тем, сведения о морфологических особенностях регенерата на разных сроках заживления кожи фрагментарны. *Цель исследования* – изучить особенности репарации кожи после нанесения лоскутной раны под влиянием суспензии аутологичных клеток СВФ.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование проведено на морских свинках (2 группы по 30 животных) после нанесения им лоскутной раны в области бедра: в контрольной группе рана заживала самостоятельно, в опытной - после однократного внутри-

и подкожного введения суспензии аутологичных клеток СВФ. Макроскопические, планиметрические, гистологические и микро морфометрические исследования проводили на 7, 14 и 30 сутки после операции.

Результаты и обсуждение. В опыте на 7-е сутки дефект был заполнен не только грануляциями, как в контроле, но и белой жировой тканью, содержащей гигантские многоядерные клетки. Макроскопических отличий не наблюдали, они появлялись на 14-е сутки: площадь мягкого, розового рубца в опыте была 15,8% меньше, чем в контроле, где рубец был плотным, багровым и втянутым. Рубцовая ткань в опыте была лучше васкуляризована, более богата фибробластами, отличалась разнонаправленностью пучков коллагеновых волокон (в контроле они взаимно параллельны). К 30-м суткам площадь рубцовоизмененной кожи по отношению к площади исходной раны в опытной и контрольной группах составила соответственно 3,5 и 28,1%. В опытных образцах небольшая рубцовая часть регенерата состояла из эпидермиса и тонковолокнистой, хорошо васкуляризированной рубцовой ткани с диффузной макрофагальной инфильтрацией, что может отражать ремоделирование. Периферическая часть регенерата имела сходство с интактной кожей, отличаясь от нее локальным истончением и склерозом гиподермы. В контрольной группе рубец имел типичное строение, восстановления гиподермы в центральной и периферической частях не наблюдали.

Заключение. Суспензия аутологичных клеток СВФ оказывает стимулирующее действие на заживление раны кожи и активизирует ремоделирование рубцовой ткани. На это указывают более прогрессивное уменьшение площади рубцовоизмененной кожи (в 8 раз по сравнению с контролем), а также восстановление зональной дифференцировки кожи и эпидермальных дериватов на большей части площади регенерата.

**ДЕЙСТВИЕ СЕКРЕТОМА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (ЦИТОКИНОВ) НА
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ
ЯЗВЕ РОГОВИЦЫ**

Борхунова Е.Н., Сароян С.В., Довгий А.И.

ООО Т-ХЕЛПЕР КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, Москва

*ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии – МВА им. К.И.Скрябина, Москва, borhunova@mail.ru*

**THE EFFECT OF STEM CELL SECRETOME (CYTOKINES) ON
INFLAMMATORY AND REPARATIVE PROCESSES IN AN INDUCED CORNEAL
ULCER**

Borkhunova E.N., Saroyan S.V., Dovgii A.I.

T-Helper Cell Technologies, LLC, Moscow

*K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow,
borhunova@mail.ru*

Введение. Совершенствование методов лечения дефектов роговицы остается актуальной проблемой биологии и медицины. В этом отношении перспективным направлением является область регенеративной медицины, особенно в применении коктейлей белков цитокинов и факторов роста для стимулирования регенерации тканей. Первый зарегистрированный российский препарат, основанный на цитокинах, продуцируемых стволовыми клетками, Репарин-Хелпер[®], содержит следующие цитокины: VEGF, GRO/КС, TGF- β 1, TGF- β 2, IL-6, MCP-1, IFN- γ , IP-10, IL-10. В литературе описаны эффекты этих цитокинов на репаративные процессы в тканях – они стимулируют регенерацию поврежденной роговицы, регулируют воспалительный процесс и восстанавливают прозрачность.

Цель исследования – на экспериментальной модели изучить особенности репарации роговицы после нанесения раны в условиях применения препарата Репарин-Хелпер[®].

Материалы и методы. Морским свинкам наносили рану роговицы глубиной 190 ± 2 мкм (3/4 толщины), в 1-ой группе заживление происходило самопроизвольно, во 2-ой группе применяли кератопротектор, в 3-ей группе использовали Репарин-Хелпер[®] в виде капель 3 раза в день согласно инструкции. Исследования проводили через 1,3,7,14,30,60 суток после операции с помощью методов общего офтальмического осмотра, щелевой биомикроскопии, световой микроскопии, микроморфометрии.

Результаты и обсуждение. На ранних этапах в опытной группе 3 (группа Репарин-Хелпер[®]) репарация роговицы протекала на фоне менее выраженной, чем в группах 1 и 2, воспалительной инфильтрации при более ранней резорбции тканевого детрита и более

раннего появлении фибробластов (Фб). К 7-м суткам дефект роговицы восполнялся за счет эпителизированных грануляций, а к 14-м суткам регенерат отличался от такового в группах 1 и 2 большей упорядоченностью хорошо структурированных пучков коллагеновых волокон (КВ). В отличие от групп 1 и 2, значительно снижалось количество Фб и гемокапилляров, несмотря на присутствие цитокина VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), появлялись гиповаскулярные очаги, что прогрессировало к 30-м и особенно 60-м суткам. В эти сроки восстанавливалась толщина роговицы, она вновь приобретала сферическую форму, что говорит о том, что ее кривизна приближалась к нормальным значениям, пучки КВ имели толщину и архитектуру, аналогичные норме, количество гемокапилляров снижалось, появлялись аваскулярные области. В группах 1 и 2 репарация происходила на фоне выраженной воспалительной инфильтрации, регенерат к 30-м и 60-м суткам был представлен рубцовой тканью с толстыми, плотно упакованными и разнонаправленными пучками коллагеновых волокон, количество Фб и гемокапилляров превышало таковое в группе 3, сохранялись очаги деструкции. Толщина роговицы не достигала исходных значений, сферичность не восстанавливалась, и как следствие, снижалась её кривизна.

Заключение. Применение препарата Репарин-Хелпер® при лечении ран роговицы на экспериментальной модели привело к восстановлению ее зональности, толщины и формы. При этом, несмотря на то что состав препарата содержит цитокин VEGF, соединительнотканная часть регенерата гиповаскулярна, ее фиброархитектоника близка к норме, что наряду с наличием аваскулярных областей может указывать на частичное восстановление прозрачности. Наши результаты доказывают положительный эффект действия цитокинов на воспалительные поражения роговицы.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ХЛОРНОГО
КАНАЛА CFTR У БЛИЗНЕЦОВ С ГЕНОТИПОМ F508DEL/R334W**

***Будатенко Н.В., Ефремова А.С., Бухарова Т.Б., Петрова Н.В., Каширская Н.Ю.,
Мельяновская Ю.Л., Кондратьева Е.И., Гольдштейн Д.В.***

*ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова»,
Москва, bnv695@gmail.com*

**ASSESSMENT OF RESIDUAL CFTR CHLORIDE CHANNEL FUNCTION IN
TWINS BEARING F508DEL/R334W GENOTYPE**

***Bulatenko N.V., Efremova A.S., Bukharova T.B., Petrova N.V., Kashirskaya N.Y.,
Melyanovskaya Y.L., Kondratyeva E.I., Goldshtein D.V.***

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, bnv695@gmail.com

Введение. Муковисцидоз (МВ) - это летальное аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутациями в гене *CFTR*, которые могут приводить к нарушениям синтеза мРНК, фолдинга белка, функциональной активности канала CFTR или его стабильности. Продолжительность жизни пациентов с МВ существенно увеличилась за счет ранней диагностики и улучшения схем лечения. Разнообразие мутаций и несколько способов воздействия на дефектный белок с помощью потенциаторов и корректоров CFTR являются ключевыми моментами при назначении таргетной терапии. Редкий генетический вариант R334W (с.1000C>T, р.Arg334Trp) относится к миссенс мутациям, представляет собой однонуклеотидную замену цитозина в 1000-м положении гена на тимидин, относится к IV классу («мягкий»). *Цель исследования* – комплексное изучение функциональной активности канала CFTR и эффективности CFTR модуляторов у близнецов с генотипом F508del/R334W.

Материалы и методы. Из биоптатов толстого кишечника каждого из пациентов были получены культуры кишечных органоидов. Функциональную активность канала CFTR исследовали при помощи метода определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП) и форсколинового теста на кишечных органоидах. Контрольные группы были сформированы из пациентов с генотипом F508del/F508del и здоровых добровольцев для каждого метода.

Результаты. Обследованы близнецы 2012 г.р. с генотипом F508del/R334W, диагноз: Муковисцидоз. Преимущественно легочная форма (Е 84.0). Хронический гнойный обструктивный бронхит. Бронхоэктазы. Течение муковисцидоза у детей - близнецов средней тяжести, протекает с однотипными клиническими проявлениями: течением полипозного гайморита, эпизодами роста грамотрицательной флоры, развитием желчекаменной болезни. В динамике наблюдения у второго близнеца имеется тенденция к снижению функции

поджелудочной железы по уровню панкреатической эластазы с 500 мкг\г (норма от 200 мкг\г) в 2016 г до 125 мкг\г в 2019 году.

У близнецов получены различные результаты при оценке функционирования натриевого и, в меньшей мере, хлорного канала методом ОРКП. В ответ на введение форсколина у обоих близнецов функция CFTR канала была снижена и соответствовала «мягким» клиническим вариантам. Снижение функции было более выражено у второго близнеца со снижением панкреатической эластазы в динамике. Однако работа натриевого канала соответствовала контрольной группе и компенсировала нарушения функционирования CFTR-канала.

Культуры кишечных органоидов, полученные от обоих близнецов, морфологически схожи с F508del/F508del контролем. Данные форсколинового теста указывают на наличие высокой остаточной функциональной активности канала CFTR. Применение корректора (VX-809) и потенциатора (VX-770) эффективно восстанавливают работу канала, при их совместном воздействии наблюдается аддитивный эффект. Полученные на обеих культурах количественные результаты близки по значениям.

Заключение. Несмотря на то, что близнецы имеют одинаковый генотип, у одного из них наблюдается снижение функции поджелудочной железы. Методами ОРКП и кишечных органоидов обнаружена высокая сохранность остаточной функции канала CFTR. Снижение функции CFTR-канала у второго близнеца, которая была исследована методом ОРКП, было ассоциировано со снижением функции поджелудочной железы. Подтверждена терапевтическая эффективность доступных модуляторов CFTR у пациентов с генотипом F508del/R334W.

Работа выполнена на средства государственного задания для ФГБНУ «МГНЦ» и при финансовой поддержке Благотворительного Фонда «Острова».

РЕГУЛЯЦИЯ ТРОМБОПОЭЗА ТРОМБОЦИТАРНЫМИ МИКРОВЕЗИКУЛАМИ

Бутов К.Р.^{1,2,3}, Осипова Е.Ю.², Соколова С.Р.^{1,2}, Колчин Н.А.³, Николаева Е.И.³,

Николаев Р.В.², Пантелеев М.А.^{1,2}

¹ЦТП ФХФ РАН, Москва

²ФГБУ "НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва

³ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва,

krbutov@gmail.com

PLATELET DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES REGULATE THROMBOPOIESIS

Butov K.R.^{1,2,3}, Osipova E.Y.², Sokolova S.R.^{1,2}, Kolchin N.A.³, Nikolaeva E.I.³, Nikolaev

R.V.², Panteleev M.A.^{1,2}

¹CTP PCP RAS, Moscow

²Dmitry Rogachev Pediatric Hematology Hospital, Moscow

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

krbutov@gmail.com

Введение. Известно, что при воспалении гемопоэз переходит в режим «экстренной» продукции миелоидного ряда с уклоном в мегакариоцитарный росток. Однако, ясного понимания, как костный мозг (КМ) способен быстро реагировать на изменения в периферической крови все еще нет. Мы предполагаем, что основная роль мессенджеров в этом процессе принадлежит тромбоцитарным везикулам.

Цель исследования – изучить состав тромбоцитарных микровезикул в периферической крови и влияние тромбоцитарных микровезикул на CD34+ клетки костного мозга и дифференцированные мегакариоциты.

Материалы и методы. Для оценки инфильтрации везикулами КМ мышам C57BL/6 и cMpl^{-/-} были произведены трансфузии СМРТХ-меченых тромбоцитов перед введением ЛПС для моделирования воспаления. Эффективность трансфузии была оценена с помощью проточной цитометрии (Cytex Augora) сразу после трансфузии и через 4 часа. Оценку эффективности инфильтрации везикулами КМ производили через 24 часа методом ИГХ бедренной кости на экспрессию cMpl. Для изучения взаимодействия везикул и мегакариоцитов тромбоциты были помечены СМРТХ или MitoTracker-Red и активированы смесью тромбина и коллагена для получения меченых везикул. Меченые везикулы были инкубированы с дифференцированными мегакариоцитами костного мозга, инкубированы в течение 1 часа, зафиксированы, ядра были контрастированы с Hoechst 33342 и препараты были визуализированы на конфокальном микроскопе Zeiss Axio Observer Z1 с Yokogawa

CSU-X1. Для оценки эффекта тромбоцитарных микровезикул на тромбоцитопоз CSU-X1-меченые везикулы были добавлены в культуры клеток костного мозга $sMpl^{-/-}$ и C57BL/6 мышей. Экспрессия CD41 в культуре была оценена с помощью проточной цитометрии на 3 день, а наличие мегакариоцито-подобных клеток методом прижизненной микроскопии.

Результаты и обсуждение. Инфузия тромбоцитов у $sMpl^{-/-}$ мышей вызывает активную инфильтрацию тромбоцитарных везикул в КМ. Инфильтрация значительно увеличивается у мышей с предварительно введенными ЛПС, что подтверждается как цитометрическими, так и данными ИГХ. Визуализированные мегакариоциты показывают связывание везикул, как на поверхности мегакариоцитов, так и в цитоплазме. Инкубация микровезикул с гемопоэтическими клетками $sMpl^{-/-}$ мышей привела к «спасению» гемопоэза и появлению CD41 положительных событий и мегакариоцито-подобных клеток в культуре.

Заключение. Полученные результаты дают первые шаги к пониманию новых механизмов регуляции тромбопоэза. Многие воспалительные реакции сопровождаются быстрым изменением уровня тромбоцитов, которое трудно описать классическими, тромбопоэтин-зависимыми механизмами регуляции. Данные исследования показывают, что активированные тромбоциты могут продуцировать микровезикулы – мессенджеры траты тромбоцитов – которые способны мигрировать в костный мозг и стимулировать тромбопоэз.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИТОЗАН-КОЛЛАГЕНОВОГО КОМПЛЕКСА ПРИ РЕПАРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ*Варпетян А.М., Павлова Н.В., Харитоновна Е.А.*pavlnv@yandex.ruФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет, pavlnv@yandex.ru**STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE USE CHITOSAN-COLLAGEN COMPLEX IN THE BONE TISSUE REPAIR***Varpetyan A.M., Pavlova N.V., Khatittonova E.A.*Tver State Medical University, pavlnv@yandex.ru

Введение. Стимуляция генетически детерминированного процесса репаративной регенерации осуществляется разнообразными способами и их сочетаниями, в частности, посредством использования различных аллогенных материалов. Одним из наиболее важных для живых систем биополимеров является коллаген, составляющий основу костных и других видов соединительной ткани млекопитающих, в том числе и человека. В последние годы в практической медицине используется хитозан, который является производным хитина. Механизм действия хитозана основан на его способности образовывать динамические ассоциаты с противоположно заряженными молекулами поверхностно-активных веществ в водной среде. Использование этих двух полимеров биогенного происхождения легло в основу разработки новых методов стимуляции восстановления костной ткани при травматическом повреждении.

Цель исследования – создание и изучение хитозан-коллагенового композита, используемого для замещения дефекта костной ткани в условиях воздействия лазерного излучения.

Материалы и методы. Для создания композита использовались коллаген (V), хитозан, дистиллированная вода. В равных соотношениях (1:1) смешивали коллаген и хитин, после чего добавляли дистиллированную воду в объеме, составляющим 30% от смеси, тщательно перемешивали до образования губчатого материала. Полученный композит наносили на предметное стекло и изучали с помощью оптического микроскопа модели «Carl Zeiss Jena Amplival». Композит облучали полупроводниковыми лазерами с различными спектрами действия (синий, красный и зеленый) с интенсивностью порядка 1 Вт/см² непосредственно на предметном столике микроскопа. Изменения исследуемого материала в процессе лазерного воздействия наблюдали с помощью микроскопа. Образцы регистрировали видеокамерой в проходящем и отраженном свете, поляризованном и неполяризованном проводили. Помимо композитной смеси, в аналогичных условиях облучения тремя видами лазеров, отдельно

исследованы хитозан и коллаген. В качестве контроля изучали структурные особенности коллагена, хитозана и их композита без лазерного воздействия.

Результаты и обсуждение. Субстанция хитозана, исследованная в поляризованном свете, отличалась по структуре от водной смеси коллагена. Частицы хитозана определялись как пятна повышенной яркости, тогда как суспензия коллагена в скрещенных поляризаторах не визуализировалась. Эксперимент показал выраженную оптическую анизотропию хитозана, так как его отдельные частицы в исходном состоянии имели выраженное кристаллическое упорядочение, в то время как суспензия в исходном состоянии оптически визуализировалась изотропной. При воздействии лазером различного цветового спектра на хитозан-коллагеновый композит, оптически анизотропные зоны выявлялись сначала в участках непосредственного воздействия лазера, а впоследствии анизотропия равномерно распространялась на всю площадь опытной суспензии. Выраженные изменения структуры, характеризующиеся равномерной кристаллизацией хитозан-коллагенового комплекса, определяемой в поляризованном свете, обнаруживались только на вторые сутки после экспозиции в темном месте при свободном доступе воздуха. В ходе дифрактометрии, проведенной через 1 месяц, было выявлено формирование прочной, ориентированной структуры. В исследуемой суспензии, находившейся без воздействия лазерного облучения, признаки прочной ориентированной структуры не найдены. При сравнении результатов кристаллизации в условиях лазерного излучения различного цветового спектра было доказано, что наиболее выраженным эффектом характеризовался лазер зеленого цвета, в результате воздействия которого композит приобретал структуру с равномерным формированием анизотропных зон. Характеристики композита не изменялись при использовании его в качестве материала, которым заполняли дефект изолированной трубчатой кости крысы, образованный в результате, распила шириной 2 мм на глубину радиуса.

Заключение. Композит хитозана и коллагена, кристаллизующийся в условиях воздействия лазерного облучения зеленого цветового спектра, является перспективным материалом для дальнейшего изучения эффективности его использования в репарации костной ткани в эксперименте на животных.

КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ РЕАЦЕТИЛИРОВАННОГО ХИТОЗАН-ГЛИЦЕРОФОСФАТНОГО ГИДРОГЕЛЯ С ВЫСОКОПОРИСТЫМИ ПЛА-ГРАНУЛАМИ И ВМР-2 ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Васильев А.В.^{1,2,4}, Кузнецова В.С.^{1,2}, Бухарова Т.Б.¹, Григорьев Т.Е.³, Загоскин Ю.Д.³,

Бабиченко И.И.^{2,4}, Чвалун С.Н.³, Гольдштейн Д.В.^{1,4}, Кулаков А.А.²

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», Москва,

vav-stom@yandex.ru

²ФГБУ НМИЦ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии

челюстно-лицевой хирургии» МЗ РФ, Москва

³НИЦ «Курчатовский институт», Москва

⁴Российский Университет Дружбы Народов, медицинский институт, Москва,

**THERMOSETTING COMPOSITION OF REACYLATED CHITOSAN/
GLYCEROPHOSPHATE HYDROGEL WITH HIGHLY POROUS PLA-GRANULES AND
BMP-2 FOR BONE REGENERATION**

Vasilyev A.V.^{1,2,4}, Kuznetsova V.S.^{1,2}, Bukharova T.B.¹, Grigoriev T.E.³, Zagoskin Yu.D.³,

Babichenko I.I.^{2,4}, Chvalun S.N.³, Goldshtein D.V.¹, Kulakov A.A.²

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, *vav-stom@yandex.ru*

²Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow

³NRC "Kurchatov Institute", Moscow

⁴Peoples' Friendship University of Russia, Medical Institute, Moscow

Введение. Высокопористые полилактидные (PLA) гранулы могут длительно высвобождать малые дозы BMP-2, обеспечивая экто- и ортотопический неоостегенез и исключая вероятные риски воздействия на организм избыточными концентрациями BMP-2 (Vasilyev, et al., 2019, 2020). Их использование в сочетании с хитозан-глицерофосфатным гелем позволит улучшить его прочностные и манипуляционные свойства за счёт получения пластилиноподобной композиции, способной отверждаться под действием температуры внутренней среды организма и её буферных систем после внесения в рану. Помимо степени наполнения PLA-гранулами, степень деацетилирования хитозана (DD%) может иметь решающее влияние на цито- и биосовместимость, а также прочностные свойства системы, что должно быть дополнительно исследовано.

Материалы и методы. Один образец хитозана (ChitoClear HQG 1600, «43040», Primex, Iceland) был реацетилирован до 19,5, 39, 49, 55, 56 DD% для исключения воздействия других факторов: длины цепи, степени очистки и пр. DD% устанавливали с помощью ¹H-ЯМР и ИК-Фурье спектроскопии. Для получения гидрогелей стерильный хитозан растворяли в 0,1 М уксусной кислоте, добавляли водный раствор β-глицерофосфата при температуре 4°C.

Высокопористые (пористость 98%) частицы полилактида получали распылением замороженных эмульсий полимера с применением сублимационной сушки. BMP-2 импрегнировали в PLA-гранулы в концентрации 10 и 50 мкг/мл. PLA-гранулы смешивали с хитозановыми гидрогелями в соотношении 1-20 масс.%. Оценку цитотоксичности проводили на мультипотентных стромальных клетках (ММСК) человека с помощью МТТ-теста. Адгезию и выживаемость клеток на поверхности композиций оценивали с помощью витального окрашивания РКН-26, DAPI и кальцеином. Прочностные характеристики были исследованы на электромеханической системе «Instron-5965» (Instron, США). Биосовместимость и способность индуцировать экто- и ортотопический остеогенез исследовали на моделях подкожной имплантации и критического дефекта теменных костей у крыс линии Wistar. Для этого через 14 и 28 дней имплантированный материал подвергали гистологической обработке с последующей морфометрией.

Результаты и обсуждение. Снижение DD% хитозана в составе гидрогеля с β -глицерофосфатом приводило к увеличению относительной выживаемости ММСК *in vitro* и снижению лейкоцитарной инфильтрации при подкожной имплантации *in vivo*. Включение 12 масс.% PLA-гранул оказалось оптимальным с точки зрения моделируемости композиции и приводило к возрастанию модуля упругости материала на основе гидрогеля в ~ 100 раз по сравнению с гидрогелем без наполнителя. Избыточное наполнение PLA-гранулам более 15% приводило к разрушению материала при деформации $\sim 10\%$. При изучении остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств композиций на основе хитозанового гидрогеля из реацетилированного хитозана (39 DD%) и высокопористых полилактидных гранул, импрегнированных BMP-2, было продемонстрировано, что при имплантации материала внутрь критического дефекта теменных костей крыс, концентрация BMP-2 10 мкг/мл оказалась оптимальной: костная ткань в виде островков заполняла толщу всего материала. В то время как при имплантации композиции с 50 мкг/мл BMP-2 происходило избыточное разрастание костной ткани и выталкивание материала за пределы дефекта. Достаточные остеоиндуктивные свойства материала с 10 мкг/мл BMP-2 были также показаны при подкожной имплантации, то есть в условиях без костного окружения.

Заключение. Разработанная матрица на основе реацетилированного хитозана, β -глицерофосфата и высокопористых PLA-гранул с BMP-2 может быть использована для получения костно-пластических материалов, способных к моделированию и биорезорбции, а также обладающих выраженными остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами.

Работа выполнена при поддержке госзадания для ФГБНУ «МГНЦ».

**ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ОРГАНОВ
РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ САМЦОВ КРЫС НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ
ОНТОГЕНЕЗА**

Власова А.А.

ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург,

vlasova.9@mail.ru

**MAST CELLS AND PHYSIOLOGICAL REGENERATION OF ORGANS OF THE
REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE RATS AT DIFFERENT STAGES OF
ONTOGENESIS**

Vlasova A.A.

Institute of Immunology and Physiology of the UB RAS, Ekaterinburg, vlasova.9@mail.ru

Введение. В связи с увеличением возраста людей, собирающихся стать родителями, проявляется все больший интерес к изучению мужской репродуктивной системы в возрастном аспекте. Все этапы онтогенеза мужской половой системы сопровождаются физиологической регенерацией, которая регулируется как за счет дальноранговых механизмов, так и локальным микроокружением, одним из регуляторных звеньев которого выступают тучные клетки (ТК). *Цель исследования* – изучить зависимость состояния органов репродуктивной системы самцов крыс разного возраста от морфофункционального состояния в них ТК.

Материалы и методы. Работа выполнена на интактных крысах-самцах линии Wistar 3х групп: молодые животные (3, 4 мес.), зрелые животные (10, 12 мес.) и старые животные (18, 19, 24 мес.). Из семенников, семенных пузырьков и придатков готовили гистологические препараты, которые окрашивали толуидиновым синим, альциановым синим-сафранином и гематоксилином-эозином по стандартным методикам. На препаратах определяли число и зрелость ТК, средний гистохимический коэффициент (СГХК) и индекс дегрануляции (ИД). Физиологическую регенерацию оценивали по морфофункциональному состоянию тканей исследуемых органов.

Результаты и обсуждение. В исследуемых органах 3-х месячных животных содержится наименьшее число ТК, которое увеличивается в последующие сроки. В 4 месяца в семенных пузырьках отмечается снижение дегрануляции ТК с одновременным увеличением СГХК. При этом усиливается пролиферативная активность эпителиальных клеток самого органа. В то время как в придатках и семенниках не происходит никаких существенных изменений, пролиферативная активность клеток не изменяется.

У зрелых животных изменения в семенниках схожи с изменениями в придатках. В этот период число ТК и ИД в этих органах максимальны среди всех исследуемых групп, в то время как в семенных пузырьках максимальным является значение СГХК. Одновременно с этим происходит усиление трофики тканей в семенниках и их придатках, а в семенных пузырьках ее снижение с одновременным уменьшением пролиферативной активности клеток.

У старых животных в семенных пузырьках и придатках происходит уменьшение числа ТК и ИД на фоне резкого увеличения СГХК. При этом снижается миграция ТК во все исследуемые органы, о чем свидетельствует наличие более зрелой тучноклеточной популяции, в сравнении с молодыми и зрелыми животными. Вместе с этим обнаруживаются деструктивные изменения клеток самих органов, что в совокупности с активной дегрануляцией ТК может свидетельствовать о наличии патологических процессов.

Заключение. Морфофункциональное состояние ТК в органах репродуктивной системы самцов крыс указывает на их регуляторную роль в процессах функционирования семенников, семенных пузырьков и придатков. Прослеживается одинаковый характер изменений в исследуемых органах. С возрастом происходит уменьшение числа ТК и их синтетической активности, с одновременным усилением дегрануляции и увеличением процента зрелых ТК. При этом у молодых и зрелых животных пролиферативная активность клеток и трофика органов поддерживаются на нормальном уровне, тогда как в органах у старых животных обнаруживаются деструктивные изменения.

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ ОКОЛОУШНЫХ
СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО
СТРЕССА И ЦЕНТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ БЛОКАТОРА TLR4 CLI-095**

Гаверова Ю.Г., Гева О.Н., Деркачева Н.И., Островская И.Г.

ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет

имени А.И. Евдокимова, j_gaverova@mail.ru

**CHANGES IN ENZYME ACTIVITY IN THE TISSUES OF THE PAROTID
SALIVARY GLANDS OF RATS UNDER THE INFLUENCE OF IMMOBILIZATION
STRESS AND CENTRAL INTRODUCTION OF THE TLR4 INHIBITOR CLI-095**

Gaverova J.G., Geva O.N., Derkacheva N.I., Ostrovskaya I.G.

A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, j_gaverova@mail.ru

Введение. Изменения количества и состава слюны способствуют развитию воспалительных процессов в тканях полости рта. В норме смешанная слюна обладает высоким регенеративным потенциалом и содержит значительное количество различных белков и пептидов, способствующих ранозаживлению и обладающих противовоспалительным действием. Первостепенную роль в образовании слюны играют большие слюнные железы. Активность ферментов в тканях околоушной слюнной железы отражает физиологическое состояние самих желез, их реакцию на воспаление окружающих тканей и может коррелировать с состоянием организма в целом. Представляется актуальным изучение влияния различных экзогенных и эндогенных факторов на метаболизм околоушных слюнных желез. *Целью данного исследования* было изучение изменений активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и щелочной (ЩФ) в ткани околоушной слюнной железы крыс под действием стресса и введения ингибитора TLR4 в переднюю поясную кору.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 40 крысах самцах Вистар со средней массой тела $285,0 \pm 3,9$ г. До начала эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы по 10 животных в каждой. Все препараты вводили центрально в переднюю поясную кору. 1-ой контрольной группе животных вводили 5 мкл 1% раствора ДМСО в ФР. 2-ой группе животных проводили введение 5 мкл 1% раствора ДМСО в ФР и подвергали стрессу. Стресс-реакцию вызывали путем 24 часовой иммобилизации в индивидуальных пластиковых пеналах с пищевой и питьевой депривацией. 3-ей группе животных вводили блокатор TLR4 – CLI-095 (0,02 мг/мкл) в 5 мкл 1% растворе ДМСО в ФР. 4-ой группе животных вводили блокатор TLR4 – CLI-095 (0,02 мг/мкл) в 5 мкл 1% растворе ДМСО в ФР и подвергали стрессу, как описано выше.

По окончании эксперимента крысы декапитировали под эфирным наркозом. У животных извлекали околоушные слюнные железы. Извлеченную ткань гомогенизировали, исходя из расчета 0,1мл на 1г ткани. Полученные образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин с воздушным охлаждением. В надосадочной жидкости определяли активность щелочной фосфатазы (ЩФ) и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) спектрофотометрическим методом.

Результаты и обсуждение. Показано достоверное ($p < 0,05$) повышение активности ЩФ под влиянием стресса и после введения блокатора TLR4, причем действие блокатора имело несколько более выраженный эффект. Повышение уровня ЩФ может быть объяснено необходимостью утилизации монофосфатов в условиях гипоэнергетического состояния при стрессе. Кроме того, можно предположить влияние катехоламинов и глюкокортикоидов на экспрессию гена ЩФ. Блокирование TLR4 влияет на активность ЩФ подобно стрессу, а при совместном действии блокатора TLR4 и стресса их действие суммируется, и активность ЩФ достигает максимального уровня. Полученные данные позволяют предположить антистрессорное действие на синтез ЩФ в тканях слюнных желез сигнального пути, запускаемого через активацию TLR4 в ЦНС.

В условиях стресса наблюдалась закономерная тенденция к снижению активности АХЭ в тканях околоушной слюнной железы, соответствующая уменьшению парасимпатического влияния. Действие блокатора TLR4, напротив, приводило к недостоверному повышению активности этого фермента, что позволяет предположить активирующее влияние сигнального пути от TLR4 на симпатические центры ЦНС. При совместном действии стресса и блокатора TLR4 активность АХЭ была достоверно ($p < 0,05$) ниже по сравнению с той активностью, которая наблюдалась после введения одного блокатора (группа 3).

Заключение. Повышение активности ЩФ и снижение активности АХЭ в околоушных слюнных железах крыс в условиях иммобилизационного стресса свидетельствует о высоких адаптационных возможностях этих тканей. Изменение активности ЩФ и АХЭ в тканях околоушных слюнных желез в ответ на центральное введение ингибитора TLR4 указывает на взаимосвязь TLR4-опосредованного сигнального пути с вегетативными центрами ЦНС. Полученные результаты позволяют предположить наличие разнонаправленных взаимодействий между симпатической нервной системой и процессами, связанными с активацией TLR4, которые требуют дополнительных исследований.

**ЭФФЕКТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ПЕРЕНОСОМ СУММАРНЫХ РНК
ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ
И КРЫС, РАНЕЕ ПЕРЕНЕСШИХ АЛЛОКСАНОВЫЙ ДИАБЕТ,
У БОЛЬНЫХ, ВЫЛЕЧЕННЫХ И ЗДОРОВЫХ ЖИВОТНЫХ**

Геворкян Н.М.,¹ Тишевская Н.В.,² Бабаева А.Г.³

¹ФГБНУ НИИ биомедхимии им. В.Н. Ореховича, Москва, gevorkiann@yandex.ru

²ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский ун-т», Челябинск

³ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва

**EFFECTS CAUSED BY THE TRANSFER OF TOTAL RNA OF SPLEEN
LYMPHOCYTES OF RATS WITH ALLOXAN DIABETES AND RATS WITH
PREVIOUS ALLOXAN DIABETES IN SICK, CURED AND HEALTHY ANIMALS**

Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G.

¹V.N.Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, gevorkiann@yandex.ru

²South Ural State Medical University, Chelyabinsk

³Research Institute of Human Morphology, Moscow

Введение. Ранее нами было показано, что препараты аллогенной суммарной РНК, выделенной из лимфоидных и стволовых клеток здоровых животных, вызывают 100%-ную нормализацию уровней глюкозы крови у крыс со стойким аллоксановым диабетом (АД) (Геворкян и др., 2019).

Цель исследования: (а) оценка влияния суммарной РНК лимфоцитов селезенки крыс с АД на уровень глюкозы в крови интактных и перенесших АД животных и (б) сравнение полученных эффектов с влиянием на животных этих двух групп самого аллоксана тригидрата, вводимого в дозе 100 мкг/кг; (в) оценка влияния суммарной РНК лимфоцитов селезенки крыс, ранее перенесших АД, на уровень глюкозы крови и его динамику у животных с АД.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 48 белых беспородных крысах-самках массой 250-280 г: 18 интактных животных; 30 – с экспериментальным АД, у 18 из которых уровень глюкозы крови был полностью нормализован путем введения им аллогенных суммарных РНК клеток костного мозга, селезенки и поджелудочной железы здоровых молодых крыс (крысы, *вылеченные* от АД), а остальные 12 животных (крысы с АД) продолжали получать базисную инсулинотерапию. Диабет моделировали путем однократного подкожного введения полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,5 мл/крысу и последующего подкожного введения аллоксана тригидрата в дозе 200 мг/кг. Достигнутая у

18 пролеченных животных нормогликемия сохранялась в течение последующих 60 дней. Все использованные в эксперименте препараты суммарных РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции и вводили крысам однократно внутривентриально в дозе 15 мкг/100 г веса.

Результаты и обсуждение. (а) показано, что суммарная РНК селезенки крыс с АД (РНКсад) вызывала гипергликемию как у интактных животных, так и у крыс, ранее перенесших АД, при этом реакция последних оказалась достоверно сильнее; (б) сравнение гипергликемического эффекта, вызываемого РНКсад в дозе 15 мкг/100 г, с таковым, вызываемым аллоксаном в дозе 100 мг/кг, показало, что действие РНКсад и на интактных, и на ранее перенесших АД крыс сравнимо с действием 650-кратной дозы самого аллоксана; (в) при введении суммарной РНК селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, животным с аллоксановым диабетом у последних развивалась стойкая и длительная рефрактерность к лечению многократно нами испытанными суммарными РНК, указанными выше (Геворкян и др., 2020).

Заключение. В ходе эксперимента нами был выявлен выраженный диабетогенный эффект РНКсад, что доказывает не только патогенетическое значение лимфоцитарной РНК, но и свидетельствует о принципиальной возможности создания персонифицированных животных моделей заболеваний человека с помощью РНК лимфоидных клеток больного, не имеющей, согласно нашим данным, ни аллогенного, ни ксеногенного ограничений. Феномен повышенной чувствительности крыс с аллоксановым диабетом к суммарной РНК селезенки по механизму развития напоминает эффект повторного ответа организма на антиген, в данном случае – на повреждающее действие аллоксана.

Явление обнаруженной нами рефрактерности гипергликемичных крыс к действию лимфоцитарной РНК животных, ранее перенесших аллоксановый диабет, может объясняться наличием механизма адресного взаимодействия компонентов суммарной РНК, происходящей из отдельных клонов Т-лимфоцитов памяти у вылеченных доноров, с соответствующими им клонами лимфоцитов-мишеней в организме реципиентов с аллоксановым диабетом.

**АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В
МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ НА ОПУХОЛЕВЫЕ
СФЕРОИДЫ IN VITRO**

Гилязиева З.Е.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,

zegilazieva@gmail.com

**STUDY OF THE EFFECT OF CYTOCHALASINE-INDUCED B MEMBRANE
VESICLES OF GLIOBLASTOMA CELLS ON TUMOR SPHEROIDS IN VITRO**

Gilazieva Z.E.

Kazan (Volga region) Federal University, zegilazieva@gmail.com

Введение. На сегодняшний день особое внимание уделяется изучению внеклеточных везикул, которые представляют собой мембранные структуры, выделяющиеся клетками. Данные клеточные структуры имеют колоссальное значение в коммуникации между клетками, путем переноса различных факторов и создании определенного микроокружения. Поэтому исследование влияние различных типов везикул на опухолевые сфероиды представляет интерес.

Целью данной работы является изучить влияние индуцированных цитохалазином В мембранных везикул (иМВ) клеток глиобластомы человека на опухолевые сфероиды in vitro.

Материалы и методы. В данной работе клетки колоректальной карциномы (HCT-15) использовались для создания опухолевых сфероидов методом «висячая капля». Мембранные везикулы были получены из клеток глиобластомы (SNB-19) человека с помощью обработки клеток 10 мкг/мл цитохалазина В и серии последовательных центрифугирований. Добавление иМВ к сфероидам производилось в разных концентрациях. Было сгенерировано 3 группы сфероидов: 1 - контроль (без добавления иМВ), 2 - с добавлением 1 мкг иМВ (иМВ 1), 3 - с добавлением 2 мкг иМВ (иМВ 2). Везикулы были добавлены после 12 часов культивирования клеток. Измерения производили на 3 сутки. Влияние иМВ 1 и иМВ 2 на опухолевые сфероиды анализировали с помощью конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

Результаты и обсуждение. Сканирующая электронная микроскопия показала, что иМВ имеют округлую форму и разные размеры. Результаты конфокальной микроскопии подтвердили слияние везикул и клеток, образующих сфероид после 24-х часов культивирования. Окрашивание аннексином V показало небольшое увеличение количества жизнеспособных клеток после добавления иМВ 1 как в опухолевых сфероидах, так и в

монослойной клеточной культуре. После переноса опухолевых сфероидов на культуральный пластик, все группы сфероидов прикреплялись к пластику и начинали образовывать монослойную культуру клеток.

Заключение. Таким образом, в данной работе мы показали возможное влияние иМВ SNB-19 на опухолевые сфероиды колоректальной карциномы. Для обнаружения детальных механизмов данного влияния необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10044).

БИОСОВМЕСТИМОЕ РАНЕВОЕ ПОКРЫТИЕ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ

Гильмутдинова И.Р.¹, Костромина Е.Ю.¹, Якупова Р.Д.², Еремин П.С.¹, Рачин А.П.¹

1 ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии, Москва, gilm.ilmira@mail.ru

2 ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки им. М.П. Чумакова, Москва

BIOCOMPATIBLE WOUND COATING FOR RECONSTRUCTION AND REPAIR SURGERY

Gilmutdinova I.R.¹, Kostromina E.Yu.¹, Yakupova R.D.², Eremin P.S.¹, Rachin A.P.¹

1 FSBI National Medical Research Centre for Rehabilitation and Balneology, Moscow, gilm.ilmira@mail.ru

2 FSBSI Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-biological Products, Moscow

Введение. Ожоговая травма остается существенной проблемой медицинского и экономического характера. При глубоких ожогах (III степень по МКБ-10) выделяют несколько критических факторов, определяющих исход ожоговой травмы: возраст пациента и дефицит донорского ресурса. В связи с этим возникает необходимость в разработке новых современных раневых покрытий, способствующих более эффективному лечению и регенерации кожных покровов. Современный рынок биопластических материалов в основном представлен продуктами децеллюризированной дермы: свиной или донорской человека. Так же широко используются синтетические раневые покрытия, как правило, витализированные аллогенными донорскими клетками. Основным недостатком которых является высокая цена, большой процент побочных нежелательных реакций.

Одним из перспективных биоматериалов являются биоматериалы, полученные из внеклеточного матрикса тканей, используемые в комбустиологии, травматологии, пластической хирургии. *Цель исследования* - изучить биологические свойства раневого покрытия на основе растворимой формы стабилизированного внеклеточного матрикса.

Материалы и методы. Раневое покрытие было получено путем фотохимической сшивки гидрогеля, состоящего из 70% коллагена, 20% гиалуроновой кислоты и 10% эластина – пропорции их содержания в дерме человека. Для оценки биосовместимости и цитотоксичности полученного биоматериала на исследуемые образцы, размером 1×1 см², пассировали 20×10^3 клеток фибробластов человека (P3), выдерживали 30 мин., заливали средой DMEM (содержание глюкозы 4500 мг/л) с 10% FBS и переносили в CO₂ инкубатор (37° С, 5% CO₂). Исследование витализированного раневого покрытия проводили на 5 сутки культивирования при помощи флуоресцентного микроскопа.

Результаты и обсуждение. Полученное раневое покрытие представляет из себя эластичную высокопористую пленку толщиной 1,5 мм. Благодаря такой структуре биоматериал возможно использовать на поврежденных участках кожи со сложным рельефом или на подвижных участках. Поры размером 100-200 мкм позволяют осуществлять газообмен раневой поверхности. Материал обладает стабильными физическими свойствами в течение продолжительного времени. Находясь в культуральной среде при 37° С, биоматериал деградирует постепенно, без распада на фрагменты. К 5 суткам масса образца уменьшается на 15-20%, полная деградация наступает через 14-20 суток. Совместное культивирование культуры клеток фибробластов и раневого покрытия показало отсутствие цитотоксического действия раневого покрытия на клетки, в течение 3-х суток сокультивирования в ростовой среде отсутствовали мёртвые клетки. К 5 суткам фибробласты образовывали плотный монослой. Данный эффект достигается за счет пористой структуры биоматериала, который создает оптимальное микроокружение для клеток.

Заключение. Разработанное раневое покрытие не оказывает цитотоксического действия на культуру клеток фибробластов человека и обладает биосовместимостью. Благодаря своему составу и структуре материал обеспечивает оптимальные условия для хорошей пролиферации клеток, что позволяет рассматривать его не только как перспективное раневое покрытие, но и сделать предположение о возможности создания более сложной трехмерной конструкции для реконструктивной хирургии.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ОТ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК НОВАЯ СТРАТЕГИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ МОЗГА

**Головичева В.В.^{1,3}, Данилина Т.И.¹, Шевцова Ю.А.^{1,2}, Горюнов К.В.², Гуляев М.В.⁴,
Туровский Е.А.³, Плотников Е.Ю.^{1,2}, Зинченко В.П.³, Зоров Д.Б.^{1,2}, Д.Н. Силачев Д.Н.^{1,2}**

¹Научно-исследовательский институт Физико-Химической Биологии им. А.Н.

Белозерского, Москва, Россия, viktorii.golovicheva@yandex.ru

²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии имени акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия

³Институт биофизики клетки РАН - обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ
ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская область, Россия

⁴Лаборатория магнитной томографии и спектроскопии факультета
фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

EXTRACELLULAR VESICLES FROM STEM CELLS AS A NEW STRATEGY FOR BRAIN REGENERATION

**Golovicheva V.^{1,3}, Danilina T.¹, Schevchova J.^{1,2}, Goryunov K.², Gulyaev M.⁴, Turovsky E.³
Plotnikov E.^{1,2}, Zinchenko V.³, D. Zorov D.^{1,2}, Silachev D.^{1,2}**

¹A.N Belozersky research institute of physic-chemical biology, Moscow, Russia

²V.I. Kulakov National medical research center for obstetrics, gynecology and perinatology,
Moscow, Russia

³Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Federal Research
Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",
Pushchino, Russia

Введение. Внимание научного сообщества последние несколько лет приковано к изучению нейропротекторных свойств внеклеточных везикул (ВВ) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), однако молекулярные механизмы их нейропротекторного действия пока не изучены.

Материалы и методы. ВВ были получены методом дифференциального центрифугирования из кондиционированной среды от ММСК, полученных из послеродовой плаценты человека. ВВ были охарактеризованы с помощью вестерн-блоттинга, электронной микроскопии, мультиплексного анализа и анализа траекторий наночастиц, как рекомендовано MISEV 2018. Оценку нейропротекторных эффектов ВВ in vivo проводили на моделях черепно-мозговой травмы (ЧМТ, n=30) взрослых крыс и неонатальной гипоксии-ишемии (ГИ, n=30) 7сут. крысят. Неврологический дефицит оценивался в тестах «Цилиндр» и «Постановка конечности на опору». Объем повреждения оценивали по МР-изображениям.

Для более детального изучения нейропротекторных механизмов ВВ использовали модель кислородно-глюкозной депривации (КГД, 40 минут) и модель NH_4Cl -токсичности (48 часов, 8 мМ) на нейроглиальной культуре клеток гиппокампа крысы, клетки предварительно инкубировали 24 часа с различными концентрациями ВВ. В экспериментах оценивалось влияние ВВ на кальциевую сигнализацию нейронов и астроцитов до повреждения и во время 40 минут КГД, также оценивалось влияние ВВ на выживаемость клеток в культуре после повреждающих воздействий. Уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ клеток оценивали с помощью красителя Fura-2AM (1 мкг/мл). Число жизнеспособных и мертвых клеток определяли с использованием двойного окрашивания Hoechst 33342 (1 мкг/мл) и Propidiumiodide (1 мкг/мл).

Результаты. Неврологический дефицит, оцененный в тесте «Постановка конечности на опору», статистически значимо снижался ($p < 0,01$) на 14-е сутки после моделирования ЧМТ, и на 40-е и 60-е сутки после моделирования ГИ в группах с интраназальной инстилляцией ВВ по сравнению с контрольной группой без лечения. Анализ частоты использования контралатеральной поврежденному полушарию лапы («поврежденной») в тесте «Цилиндр» выявил значимое функциональное восстановление использования данной конечности в группах с интраназальным введением ВВ после ЧМТ и ГИ ($p = 0,018$ и $p = 0,015$, соответственно). Объем повреждения нервной ткани достоверно снижался в группах с лечением ВВ после ЧМТ на 14 сутки (с 91,5 до 64,5 мм³, $p = 0,009$) и после ГИ на 60-е сутки (с 1089 до 593 мм³; $p = 0,0036$). ВВ статистически значимо защищали клетки гиппокампа от гибели после моделирования КГД через снижение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время второй фазы глобального роста цитозольного кальция. ВВ инициировали аберрантную осцилляцию $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах через 30 минут инкубирования в нормальных условиях культивирования. Инкубация 24 часа с ВВ культуры гиппокампа приводила к статистически значимому снижению количества мертвых клеток после 48 часов моделирования гипераммонимии. ВВ значительно ускоряли рост нейритов в ходе развития нейроглиальной сети гиппокампа *in vitro* в течение 7 суток культивирования.

Выводы. В результате исследования было показано, что при интраназальном введении ВВ обладают нейропротекторными свойствами в моделях ЧМТ и неонатальной ГИ. Мы предполагаем, что терапевтические свойства ВВ могут быть объяснены влиянием на кальциевую сигнализацию в нейронах и астроцитах и усилением нейропластичности за счет положительного влияния на рост и развитие нейритов.

Работа поддержана грантом РФФИ №20-015-00414.

НЕЙРОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ИСТОЧНИК КАРЦИНОГЕНЕЗА ГЛИОМ

Гореликов П.Л., Косырева А.М.

ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, petr_gorelikov@mail.ru

NEURONAL STEM CELLS AS A SOURCE OF GLIOMA CARCINOGENESIS

Gorelikov P. L., Kosyreva M. A.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, petr_gorelikov@mail.ru

Стволовые клетки являются необходимой составной частью организма. Плюрипотентность, способности к перманентному поддержанию популяции и **осуществлению клональной дифференцировки, характеризует эти клетки как необходимое звено для** поддержания тканевого гомеостаза. В последнее время целый ряд авторов склонны считать, что стволовые клетки могут стать мишенью для канцерогенных факторов и основным объектом процессов эпигенетических модификаций и мутагенеза. Поликлональная концепция рассматривающая опухолевые стволовые клетки (ОСК) или их прогениторы. в качестве одной из причин способствующих прогрессии, гетерогенности и метастазированию многих опухолей, а возможно и первоначальными клетками (Cell of Origin) злокачественного новообразования впервые получила экспериментальное обоснование – так существование ОСК подтвердилось при ксенотрансплантации иммунодефицитным мышам подтвердилось при остром миелоидном лейкозе, раке молочной железы, толстой кишки, легких и других видов рака.

Распространение поликлональной концепции на опухоли ЦНС и глиомы в частности, которая является наиболее распространенными первичными злокачественными новообразованиями центральной нервной системы, способствовали открытию в мозге зрелых млекопитающих двух основных нейрогенных областей - субвентрикулярной зоны (СВЗ) боковых желудочков и субгранулярной зоны (СГЗ) зубчатой извилины в гиппокампальной формации содержащие нейральные стволовые клетки с таким же перманентным потенциалом к пролиферации и дифференцировки, что и эпителиальные и гемопоэтические клетки, предполагаемые согласно поликлональной концепции в качестве транзитного амплифицирующего прогениторного пула опухолевых клеток в других видах рака.

Для экспериментального подтверждения участия ОСК в развитии глиомы применяют рекомбинацию Cre-Lox – новейшую инновационную технологию сайт-специфической рекомбиназы, используемой для выполнения делеций, вставок, транслокаций и инверсий в определенных сайтах ДНК клеток, с целью детекции всех клеточных клонов. Эта технология позволяет нацеливать модификацию ДНК на определенный тип клеток за счет

специфической активации Cre во всех клеточных клонах, продуцируемых исходными клетками. Для исследования ОСК в развитии глиом созданы экспериментальные модели со спонтанным развитием опухоли - трансгенные мыши с драйверами Cre (NIH Blueprint for Neuroscience Research) и с нокаутными опухолевыми супрессорами Pten, P53, Rb, Trp53, Nf1, Ink4a/Arf.

С помощью этих моделей продемонстрирована возможность дифференцировки нейрональных стволовых (nestin-creERT2) и биполярных прогениторных клеток (Ascl1-creERTM) в нейроны или олигодендроциты, а также выявлена способность униполярных Gfap-creERTM дифференцироваться не только в астроглию, но и служить источником ОСК в глиобластоме у мышей.

Трансгенные мыши со спонтанно возникающими астроцитомами в непосредственной близости к СВЗ и СГЗ, а также инициация опухолевого роста после введения в СВЗ аденовируса с Cre нокаутным мышам по генам-супрессорам опухоли Nf1, Trp53 и Pten подтверждают гипотезу о существовании стволовых клеток и их прогениторов, потенциально способных к малигнизации и образованию опухоли.

Однако, несмотря на полученные данные, природа ОСК не установлена, неясно, возможна ли обратная дифференцировка ОСК в прогениторные или стволовые клетки, отсутствуют сведения о механизмах трансформации стволовых клеток в ОСК и не определена роль микроокружения в этом процессе.

ВЛИЯНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю.

*Уральский государственный медицинский университет, ГАУЗ СО «Институт
медицинских клеточных технологий»*

THE AGE-DEPENDENT IMPACT OF STEM CELLS ON THE RESTORATION OF THE JEJUNUM EPITHELIUM AFTER EXPOSURE TO IONIZING RADIATION

Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu.

Ural State Medical University, Institute of Medical Cell Technologies

Введение. Проблема клеточного восстановления быстрообновляющихся тканей после воздействия ионизирующего излучения продолжает оставаться актуальным вопросом современной медицины. Накоплен экспериментальный материал, доказывающий способность мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических

стволовых клеток (ГСК) активировать регенерацию тканей путем слияния с клетками реципиента, через паракринные механизмы, а также через формирование межклеточных контактов. ММСК способны усиливать хоуминг и формировать ниши для ГСК. Особый интерес представляет изучение механизмов активации регенерации тканей при старении. Известно, что определяющую роль в восстановлении структуры быстрообновляющихся тканей имеет функциональное состояние стволовых клеток. Также известно, что при старении снижается чувствительность клеток к факторам роста, их хоуминг и дифференцировочный потенциал.

Целью настоящего исследования стало изучение влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на регенерацию эпителия тощей кишки зрелых и старых животных при действии ионизирующего излучения.

Материалы и методы. Исследование выполнено на мышах-самцах. Получение клеточной культуры ММСК и ГСК производилось из хориона плаценты животных. При этом моноклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной (раствор аккутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 (StemCell Technologies, США) и CD 117 (StemCell Technologies, США). Проточная цитометрия была проведена на цитометре FACSCalibur (BD Biosciences, США). В суспензии трансплантируемых клеток оценивалось содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117, Sca-1 и отрицательных по Lin- (CD45, C3e, Ly-6G, M1/70, Ter-119). Проведенные исследования позволили установить, что содержание жизнеспособных клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+ (рис. 1), Sca-1+, Lin- составило 70-93%. При трансплантации лабораторным животным была использована культура ММСК третьего пассажа. Для подтверждения принадлежности культуры к ММСК производилась идентификация клеток с помощью набора антител Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США), содержащего позитивные (антитела к integrin β 1, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45). Для оценки функциональных свойств ММСК производилась дифференцировка клеток в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Облучение животных проводилось на гамма-терапевтической установке типа АГАТ – С с радионуклидным источником ^{60}Co – 60, поглощенная доза составила 4,0 Гр, мощность поглощенной дозы 20 сГр/мин. Зрелые и старые лабораторные животные были разделены на две группы. В каждой группе были выделены опытная и контрольная подгруппы. Животным опытной подгруппы внутривенно вводились ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным контрольной подгруппы вводили 0,9 % раствор NaCl — 0,2

мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после воздействия ионизирующего излучения. Оценка регенераторных процессов в слизистой оболочке тощей кишки осуществлялась с помощью расчетов индекса пролиферации (ИП), апоптотического индекса (АИ). Средняя клеточность в одной крипте (СКК) была определена как отношение числа криптальных клеток к количеству анализированных крипт. Пролиферативная активность клеток определялась как отношение иммунопозитивных ядер эпителиоцитов по белку Ki-67 к общему числу подсчитанных ядер эпителиоцитов. Верификация выраженности апоптоза осуществлялась с использованием метода ApopTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) (Millipore, США). Апоптотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу подсчитанных эпителиоцитов.

Результаты исследования. На 1 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при определении активности апоптоза в эпителии кишечника у старых животных выявлено снижение данного показателя на 21,7 % ($p < 0,05$). У зрелых животных, в отличие от старых, на 1 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации клеток существенных изменений в эпителии тощей кишки установлено не было. На 7 сутки у зрелых животных отмечено увеличение количества эпителиоцитов крипт за счет увеличения пролиферативной активности клеток криптального эпителия на 35,4% ($p < 0,05$), а также снижения запрограммированной клеточной гибели на 46,7% ($p < 0,05$). У старых лабораторных животных трансплантация ММСК и ГСК не приводит к существенному изменению уровня пролиферативной активности. Увеличение количества эпителиоцитов крипт в этой возрастной группе на 30,8% ($p < 0,05$) достигалось за счет снижения уровня апоптоза.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о возможности сочетанной трансплантации ММСК и ГСК вызывать восстановление клеточности эпителия тощей кишки у зрелых и старых животных. При этом механизмы, обеспечивающие восстановление количественного содержания эпителиоцитов крипт у зрелых и старых животных отличаются. В зрелом организме это достигается за счет активации пролиферативной активности клеток и ингибирования апоптоза, в то время как в старом организме – только за счет снижения выраженности запрограммированной клеточной гибели.

**ПРОГЕНИТОРНЫЕ СВОЙСТВА И СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК –
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВНУТРЕННИХ ИСТОЧНИКОВ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ
ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА**

Григорян Э.Н.

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, leonore@mail.ru

**PROGENITOR TRAITS AND SPECIALIZATION OF CELLS, POTENTIAL
INTRINSIC SOURCES FOR RETINAL REGENERATION IN VERTEBRATES AND
HUMAN**

Grigoryan, E.N.

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, RAS; Moscow, leonore@mail.ru

Введение. Ряд дегенеративных заболеваний сетчатки приводят к гибели ретинальных, в частности фоторецепторных, нейронов, что понижает зрение и в крайних случаях заканчивается слепотой. В последние два десятилетия в глазу позвоночных животных и человека выявлены клетки - потенциальные источники регенерации сетчатки (КИРС). В связи с эндогенным происхождением и аутологичностью КИРС обладают большими преимуществами по сравнению с чужеродными стволовыми клетками (ЭСК, МСК, ИПСК), предлагаемыми в настоящее время для трансплантации с целью восстановления сетчатки.

Цель исследования. Основная цель исследования (Grigoryan, 2020, Biomedicines, v. 8) - определение свойств и поведения каждого из типов КИРС позвоночных разных классов и разного возраста в контексте экспрессии генов и эпигенетического ландшафта, отражающих как их прогениторные свойства, так и особенности специализации.

Материал и методы. Исследование проведено на основе полученных в течение многих лет данных лаборатории «проблем регенерации» ИБР РАН и результатов лабораторий мира, работающих в том же или близких направлениях.

Результаты и обсуждение. К категории КИРС глаза относятся клетки его цилиарной зоны (ЦМЗ), аналога ЦМЗ - цилиарного тела (ЦТ), ретинального пигментного эпителия (РПЭ), радужки и клетки Мюллеровской глии (МГ). У низших позвоночных перечисленные клеточные популяции принимают участие в росте и регенерации сетчатки, демонстрируя *in vivo* способность к пролиферации, дифференцировке (ЦМЗ) или репрограммированию (РПЭ, радужка, МГ) в нейральном, в том числе фоторецепторном, направлении. У млекопитающих и человека - эта способность данных популяций клеток утрачивается, однако, обнаруживается в перmissive для этих процессов условиях *in vitro*. Найден широкий спектр экзогенных факторов, обеспечивающих и контролирующих конверсию КИРС позвоночных *in vitro*, а также *in vivo*. Это оказалось возможным благодаря накопленным в

последнее время знаниям о молекулярных механизмах формирования глаза, гистогенеза сетчатки и пониманию фенотипического статуса КИРС, обусловленного пространственно-временными особенностями их развития (Markitantova, Simirskii, 2020). Анализ молекулярно-генетических свойств КИРС свидетельствует о том, что клетки РПЭ, ЦТ, радужки и МГ в ходе конверсии, направленно спровоцированной условиями *in vitro* или в некоторых случаях при повреждении сетчатки *in vivo*, у взрослых млекопитающих способны конвертироваться в специфический фенотип с признаками прогениторного. При этом полной потери признаков дифференцировки не происходит, и клетки чаще всего демонстрируют только отдельные черты клеток предшественников на фоне сохранения на определенном отрезке времени некоторых черт исходной дифференцировки. Это проявляется в инициации экспрессии ряда генов, характерных для прогениторов глаза и сетчатки в развитии, а также генов и факторов, ответственных за плюрипотентность и вход в клеточный цикл. Факты, известные к настоящему времени в отношении эпигенетического регулирования процесса конверсии, свидетельствуют о том, что КИРС обладают эпигенетическим ландшафтом, находящимся в определенной готовности (“open minded”) для развития в ретинальном направлении и напоминающим таковой у прогениторных клеток сетчатки глаза в развитии. Однако устойчивая специализация КИРС, а также возраст, приводящие к изменению эпигенетического ландшафта у млекопитающих, накладывают запрет на полную реализацию потенциала и регенераторных ответов КИРС. В этих двух ключевых особенностях КИРС (возможности рекрутировать и реэкспрессировать «развитийные» гены и иметь открытый для этого эпигенетический ландшафт) существует большое число различий, связанных с типом КИРС, видовыми отличиями, возрастом и способами индукции фенотипической конверсии.

Заключение. Таким образом, более глубокие знания биологии КИРС в терминах как молекулярно-генетического профиля, так и эпигенома, наряду с пониманием роли регулирующих факторов клеточного и системного окружения, могут помочь подойти к решению вопроса регенерации сетчатки, ее основных мишеней (РПЭ, фоторецепторного слоя и ганглиозных клеток) при офтальмологических заболеваниях, за счет эндогенного клеточного ресурса.

Исследование выполнено в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2021 года № 0088-2021-0017

**МОРФОЛОГИЯ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ПРИ ФОКАЛЬНОЙ И
ДИФфуЗНОЙ ФОРМАХ ВРОЖДЕННОГО ГИПЕРИНСУЛИНИЗМА**

Губаева Д.Н.¹, Прощина А.Е.², Кривова Ю.С.², Меликян М.А.¹

¹ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ, Москва, *gubaevadn@gmail.com*

²ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва

**PANCREATIC ISLETS MORPHOLOGY IN FOCAL AND DIFFUSE FORMS OF
CONGENITAL HYPERINSULINISM**

Gubaeva D.N., Proschina A.E., Krivova Y.S., Milikyan M.A.

Endocrine Research Centre, Moscow

Research Institute of Human Morphology, Moscow

Введение. Врожденный гиперинсулинизм (ВГИ) является генетическим заболеванием с высоким риском развития тяжелых неврологических осложнений. Существуют две основные гистологические формы заболевания: диффузная и фокальная. В случае отсутствия положительного эффекта от медикаментозной терапии пациентам с диффузной формой ВГИ проводится субтотальная панкреатэктомия. При фокальной форме заболевания возможно удаление участка гиперпродукции инсулина с дальнейшим полным выздоровлением пациента и исключением возможности развития сахарного диабета. Предоперационная дифференциальная диагностика различных форм ВГИ вызывает затруднения, так как ее невозможно выполнить с помощью доступных методов визуализации (УЗИ, МРТ, КТ). Учитывая различия в хирургической тактике лечения, чрезвычайно важным представляется определение гистологических критериев ВГИ.

Данные о морфологических изменениях в ткани поджелудочной железы при ВГИ важны для понимания механизмов патогенеза данного заболевания и фундаментальных принципов дифференцировки и регенерации бета-клеток.

Цель исследования: изучить морфологию островков Лангерганса у пациентов с фокальной и диффузной формой ВГИ.

Материалы и методы. Исследованы операционные биопсии поджелудочной железы от 10 пациентов с фокальной формой ВГИ и 7 пациентов с диффузной формой ВГИ, наблюдавшихся в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ. Диагноз ВГИ был установлен на основании клинической картины (потеря сознания/судороги на фоне гипогликемии), результатов пробы с голоданием (отсутствие адекватного снижения уровня инсулина на фоне гипокетотической гипогликемии) и генетического исследования (патогенные мутации в генах *ABCC8*, *KCNJ11*, *GCK*). Биопсии поджелудочной железы пациентов с ВГИ были получены после проведения субтотальной панкреатэктомии или резекции участка

поджелудочной железы по жизненным показаниям в связи с отсутствием положительной динамики на фоне медикаментозной терапии. Группой сравнения служили 7 аутопсий поджелудочной железы детей без признаков нарушения углеводного обмена.

Материал фиксировали в 10%-м растворе кислого или нейтрального формалина. Анализ морфологии островков Лангерганса выполнен на срезах поджелудочной железы маркированных мышиными моноклональными антителами к инсулину (I2018, Sigma-Aldrich, США). В качестве визуализирующей системы применяли Ultra Vision ONE Detection System (TL-015-HDJ, «Thermo Fisher Scientific Inc.») согласно протоколу производителя.

Результаты и обсуждение. Участок гиперсекреции инсулина (фокус) был визуализирован у 4/10 пациентов с фокальной формой ВГИ. В фокусе отмечалась интенсивная сплошная окраска антителами к инсулину на протяжении всего участка без возможности выделить отдельные островки Лангерганса, что ярко отличало данный участок. У оставшихся пациентов препарат поджелудочной железы был представлен тканью вне фокуса, где визуализировались островки Лангерганса, а также одиночные эндокринные клетки. В целом, ткань поджелудочной железы вне фокуса была схожа с тканью поджелудочной железы у пациентов с диффузной формой ВГИ и у пациентов без признаков нарушения углеводного обмена. Однако, имелось заметное различие в форме островков Лангерганса в группах пациентов: у 9/10 пациентов с фокальной формой ВГИ: островки Лангерганса вне фокуса аденоматоза имели неровные края и неправильную продолговатую форму, в то время как у пациентов с диффузной формой заболевания и в группе детей с предположительно здоровой тканью поджелудочной железы островки Лангерганса имели ровную округлую или овальную форму с четкими краями.

Заключение. По результатам иммуногистохимического исследования с антителами к инсулину, у пациентов с фокальной формой ВГИ удалось четко дифференцировать очаг аденоматоза от оставшейся ткани поджелудочной железы. Более того, в исследовании были отмечены значимые различия между формой островков вне фокуса при фокальной форме ВГИ и у пациентов с диффузной формой заболевания. Данное наблюдение позволит помочь в дифференциальной диагностике различных гистологических форм ВГИ в случае, когда при резекции ткани поджелудочной железы не был выполнен захват области фокуса.

**ВЛИЯНИЕ ЧЕРЕДУЮЩЕГОСЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ НА
ЭКСПРЕССИЮ ФАКТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАНОЗАЖИВЛЕНИЕМ**

Дариенко К.А., Соловьёва Е.В., Пантелеев А.А.

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, darcrystal@gmail.com

**THE INFLUENCE OF INTERMITTENT EXPOSURE TO HYPOXIA UPON
EXPRESSION OF
WOUND HEALING ASSOCIATED FACTORS**

Darienko K.A., Solovieva E.V., Panteleyev A.A.

NRC Kurchatov Institute, Moscow, darcrystal@gmail.com

Введение. Гипоксия является одним из основных факторов физиологического гомеостаза оказывающим воздействие практически на все жизненно важные клеточные процессы [Greijer & Wall, 2004]. Ключевым молекулярным регулятором адаптивного ответа на гипоксию на клеточном, тканевом и организменном уровне является транскрипционный фактор HIF1 (hypoxia-inducible factor), представляющий собой гетеродимер белков Hif1 α и Hif1 β (ARNT) [Wilgus, 2012]. Одним из эффектов активации HIF-каскада на фоне гипоксии является повышение экспрессии генов, контролирующих и ускоряющих процесс ранозаживления [Ruthenborg et al., 2014; Province et al., 2017]. Вместе с тем, недостаток кислорода, в целом, оказывает угнетающее действие на процессы клеточного и тканевого роста. Разрешение этого противоречия могло бы внести вклад в разработку методов стимуляции тканевой регенерации. Полученные нами предварительные результаты позволяют предположить, что кратковременное гипоксическое воздействие (с последующей реоксигенацией) может вести к активации синтеза ключевых белков ранозаживления, но избежать негативного воздействия гипоксии на клеточный рост.

Материалы и методы. Нами была проведена оценка экспрессии генов и белков внеклеточного матрикса (*Col I, Fn, P4ha1, P4ha2* и *Plod2*) и ангиогенеза (*Vegf- α*) в условиях реоксигенации на культуре первичных дермальных фибробластов человека (sFb), полученных из кожи пациентов после пластической операции. Фибробласты были выбраны в качестве экспериментальной модели, поскольку они играют ключевую роль в процессе заживлении ран кожи [Newman et al., 2011], а также при восстановлении структуры и функциональной целостности дермы [Frantz et al., 2010]. Экспрессия генов ВКМ и ангиогенеза оценивалась методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Количественный уровень белков оценивали методом иммуноцитохимии.

Результаты и обсуждение. В ходе проведения экспериментов было выявлено значительное увеличение экспрессии генов ранозаживления при культивировании sFb в

условиях воздействия гипоксии (1% O₂ в течение 24 и 48 ч) по сравнению с контролем (21% O₂): *Hif1a* – в 7,4 и 16,9 раза, соответственно; *Vegf1a* - 21/60; *Egln1* - 9/9; *Egln2* - 6,5 / 5; *Egln3* - 53/110; *COL1* - 2,4 / 3; *Fn* - 3,3 / 1,7; *P4HAa1* - 5,8 / 7,8; *P4ha2* - 6,6 / 8,5; и *Plod2* - 9/25 раз. Вместе с тем, более длительное воздействие гипоксии (72 часа) вело к подавлению экспрессии. В экспериментах по иммуноцитохимии мы увидели, что синтез белков ВКМ (Col I, Col III, Fn) и белка Vegf- α в sFb при 3 и 6 ч воздействия гипоксии остается неизменным. При более длительном воздействии гипоксии (18- 24 ч), продукция Col I, Col III снижается. Полученные результаты указывали на вероятную недостаточность 24 часов экспозиции гипоксии для выработки и полноценного процессинга (фолдинга) достаточного количества интересующих нас белков. Нами было принято решение оценить уровень их экспрессии при культивирования фибробластов при непродолжительной гипоксии (1% O₂) с последующей реоксигенацией культуральной среды (21% O₂). Для этого, после кратковременной гипоксии (3-6 ч) клетки помещали в условия 18- и 24-часовой нормоксии (реоксигенация). Этот режим вёл к активации синтеза белков Col I, Col III, Vegf- α , хотя уровень Fn оставался неизменным. Таким образом, этот методологический подход к стимуляции необходимых для ранозаживления факторов позволяет получать фибробласты с высоким ранозаживляющим потенциалом.

Заключение. Результаты проведенных нами исследований позволяют предположить, что периодическое изменение уровня оксигенации дермальных фибробластов (режим гипоксия-реоксигенация) при их предварительном культивировании перед дальнейшей трансплантацией в раневое поле, может быть использовано в качестве нового подхода для стимуляции процессов, связанных с ранозаживлением, например, при клеточной терапии хронических диабетических язв.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 19-015-00306А и внутренним грантом Курчатовского института.

ВАРИКОЗНАЯ БОЛЕЗНЬ КАК ЦИЛИОПАТИЯ**¹Деев Р.В., ²Чекмарева И.А., ³Швальб А.П., ¹Абросимова Т.И.**¹ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург²ФГБОУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского», Москва³Бюро судебно-медицинской экспертизы Рязанской области, Рязань**VARICOSE DISEASE AS AN POSTNATAL CYLIOPATHY****¹Deev R. V., ²Chekmareva I. A., ³Shvalb A. P., ¹Abrosimova T. I.**¹I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg²National Medical Research Center of Surgery named after A. Vishnevsky, Moscow³Bureau of Forensic Medical Examination of the Ryazan Region, Ryazan

Цилии – недостаточно изученные органеллы эукариотических клеток. Сенсорные цилии имеются на многих клетках многоклеточного организма. Они выполняют функцию улавливания изменений физических и химических факторов внешней по отношению к клетке среды. Такие органеллы описаны на многих клетках: механоцитах (фиброцитах, хондроцитах, остеоцитах), эпителиоцитах (нефроцитах, холангиоцитах и др.) и ряде других. Механосенсорные цилии, улавливая механические сдвиги сред внешней среды, регулируют функциональную активность механозависимых ионных кальциевых каналов, модулируя таким образом реализацию различных внутриклеточных сигнальных путей, задействованных в дифференцировке, специализации, синтетической активности клеток. Последнее положение позволяет считать цилии одним из инструментов реактивности клеток, а следовательно, предполагать их непосредственное участие в процессах физиологической и репаративной регенерации. Дефекты в генах (мутации), кодирующих белки структуры цилий приводят к нарушению пре- и постнатального морфогенеза некоторых органов, проявляющихся заболеваниями – поликистозом почек, синдромом Кароли и др.

Описано наличие цилий и на эндотелиоцитах. Причем, у нокаутных по белкам цилий животных, отмечается снижение реактивности клеток в ответ на изменение тока крови (Kallakuri S. et al., 2015; Viol A.-C. et al., 2018). Механизмы, приводящие к нарушению в структуре сосудистой стенки – клеточного состава, а также ремоделированию внеклеточного матрикса пока остаются малопонятными (Ma N., Zhou J., 2020). Имеются предположения, что помимо гуморальной регуляции короткодистантными молекулами паракринного действия, могут являться и непосредственные межклеточные контакты. Недавно описанной клеточной популяцией, входящей в состав стромы большого числа внутренних органов, являются т.н. телоциты – клетки предположительно нейроэктодермального цитогенеза, проявляющие, однако, свойства мезенхимоподобных элементов. Подавляющее большинство

авторов единодушно наделяют эти клетки функцией регулирования ремоделирования внутритканевых процессов, в том числе и перестройки межклеточного матрикса. Установлено, что им принадлежит существенная роль при ангиогенезе. Следует отметить, что и эндотелиальные цилии, и телоциты в стенке сосудов описаны, прежде всего в структуре артерий, а также в микроциркуляторном русле; венозное звено русла в этом отношении остается неизученным. Немаловажно, что цилии были обнаружены и на телоцитах (Cantarero I. Et al., 2011).

Имеющиеся на сегодняшний день сведения о преобразованиях в стенке вены при варикозной болезни, позволяют выдвинуть гипотезу, согласно которой прогрессирующее изменение состава и структуры внеклеточного матрикса вены при варикозной болезни является следствием нарушения механотрансдукционной молекулярной сигнальной цепи от эндотелиальных цилий, к расположенным субэндотелиально телоцитам, которые регулируют процессы ремоделирования в т.н. сосудистой тканевой нише. Проверка указанной гипотезы позволит определить новые молекулярные и клеточные таргеты для профилактики и лечения варикозной болезни.

УЧАСТИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ ГИСТОГЕНЕЗА МАТКИ КРЫС

Диндяев С.В., Ромашин Ф.А., Касаткин Д.В.

ФГБОУ ВО Ивановская государственная медицинская академия, dindyayev@mail.ru

PARTICIPATION OF FAT CELL NEUROMEDIATORS IN THE PROCESSES OF UTERUS HISTOGENESIS IN RATS

Dindyayev S.V., Romashin F.A., Kasatkin D.V.

Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, dindyayev@mail.ru

Введение. Нейромедиаторные биогенные амины (катехоламины, серотонин, гистамин) принимают активное участие в регуляции гистогенетических процессов, происходящих в матке в течение жизни организма. Одним из основных источников биоаминов являются тучные клетки. *Цель исследования* – изучить содержание катехоламинов, серотонина и гистамина в тучных клетках тела и шейки матки крыс в течение полового цикла (120 животных), беременности (75 животных) и в послеродовом периоде (100 животных).

Материалы и методы. В нефиксированных криостатных срезах тела матки с помощью параформальдегидного метода Фалька-Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной определяли содержание катехоламинов и серотонина в тучных клетках. Флуоресцентно-гистохимическим методом Кросса-Эвана-Роста с использованием ортофталевого альдегида

(фирма «MERCK-Schuchardt») изучали содержание гистамина в тучных клетках. Материал изучался с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ с набором светофильтров, адекватных режиму флуоресценции биоаминов. Цитоспектрофлуориметрию производили при помощи фотометрической насадки ФМЭЛ-1А. Содержание биоаминов определяли в условных единицах шкалы регистратора.

Результаты и обсуждение. В процессе полового цикла наибольшая концентрация исследуемых биоаминов в тучных клетках всех оболочек и тела, и шейки матки отмечается в проэструс. Минимум этих показателей имеет региональные различия. В эндометрии и миометрии тела матки он отмечается в поздний эструс и метаэструс, в периметрии этой части матки – в ранний эструс. В шейке матки минимальная концентрация биоаминов в тучных клетках выявляется в метаэструс и ранний диэструс. Во время беременности наибольшее содержание серотонина и катехоламинов в тучных клетках отмечается на 15-16-е и 21-е сутки. Минимум этих показателей имеет региональные различия. В эндометрии и периметрии тела матки он отмечается на 20-й день, а в миометрии на 4-й день беременности. В шейке матки минимальная концентрация биоаминов выявляется на 10-й день. Максимальное содержание гистамина в тучных клетках эндометрия и периметрия приходится на 21-е сутки беременности.

В послеродовом периоде наибольшее содержание исследуемых биоаминов отмечается в первые сутки. Сразу после родов уровень моноаминов постепенно достоверно снижается. В теле матки уменьшение содержания серотонина продолжается до 4-х суток, а катехоламинов – до 5-х, после чего отмечается увеличение этого показателя до 7-х суток. Минимальные значения уровня моноаминов в тучных клетках тела матки наблюдаются на 10-е сутки. Динамика содержания биоаминов в тучных клетках слизистой оболочки шейки матки в послеродовый период имеет менее выраженный характер. Здесь минимум уровня катехоламинов отмечается на 15-е сутки, а серотонина – на 8-е и 9-е.

Параметрический корреляционный анализ демонстрирует высокую степень положительной линейной зависимости между концентрациями серотонина и катехоламинов по точкам зондирования ($r=0,72-0,95$) в течение полового цикла и беременности. В послеродовый период происходит увеличение силы связи исследуемых параметров от средней в первые сутки после родов ($r=0,6$) до сильной к 3-м суткам в шейке ($r=0,74-0,82$) и к 7-м – в теле матки ($r=0,71-0,72$).

Заключение. Достоверные изменения содержания гистамина, серотонина и катехоламинов в тучных клетках различных оболочек матки крыс в течение полового цикла, беременности и послеродового периода указывают на активное участие тканевых базофилов в регуляции гистофизиологических процессов, происходящих в органе. Тучные клетки

участвуют в обеспечении серотонином и катехоламинами структур миометрия. Для гладких миоцитов указанной оболочки они являются, видимо, основным поставщиком гистамина. Катехоламины и серотонин по многим аспектам своего биологического действия являются антагонистами, поэтому их количество в нормально функционирующей матке должно быть четко сбалансировано, что подтверждается высокой степенью корреляционной связи между их уровнем по точкам зондирования. Оптимальное соотношение содержания нейромедиаторов в микроокружении рабочих клеток создает в нем баланс обменных процессов, обеспечивающих реконструкцию тканей и их регенерацию в зависимости от функциональной активности органа.

ВАРИАТИВНОСТЬ МЕХАНИЗМОВ РЕГЕНЕРАЦИИ У ИГЛОКОЖИХ**Долматов И.Ю.***НИЦМБ им. А.В. Жирмунского, Владивосток, idolmatov@mail.ru***VARIABILITY OF REGENERATION MECHANISMS IN ECHINODERMS****Dolmatov I.Yu.***A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Vladivostok,**idolmatov@mail.ru*

Введение. Одной из особенностей восстановительных морфогенезов является их значительная гетерогенность. Полнота и механизмы регенерации варьируют в зависимости от характера повреждения, локализации раны, стадии индивидуального развития животного и других факторов. Даже у близких видов способность к восстановлению и процесс формирования утраченной структуры могут сильно различаться. Такая гетерогенность часто имеет “количественный” характер и связана с видовыми особенностями строения, а также с различиями в величине и клеточном составе оставшейся части органа, уровнях экспрессии определенных генов и/или функциональной активности задействованных в регенерации белков. В то же время в животном мире имеются многочисленные примеры регенерации, когда у близких видов одни и те же структуры формируются за счет кардинально различающихся механизмов. Этот феномен нельзя объяснить лишь количественными флуктуациями морфогенетических механизмов. Для более четкого определения данного явления предлагается использовать термин “вариативность механизмов регенерации”, под которым подразумевается наличие нескольких принципиально разных вариантов формирования какой-либо структуры у близкородственных видов или у одного вида. Изучение этого феномена, несомненно, имеет большое значение для понимания сути регенерации.

Результаты и обсуждение. Рассмотрим феномен вариативности механизмов регенерации на примере типа Echinodermata (Долматов, 2020). Наиболее древними представителями иглокожих являются морские лилии (Crinoidea). Многие виды этих животных способны к регенерации пищеварительной системы после полного удаления всех структур энтодермального происхождения. При этом восстановление кишечного эпителия у одних видов (надсемейство Antedonoidea) происходит за счет трансдифференцировки клеток целомического эпителия (мезотелия), а у других видов (надсемейство Himerometroidea) – в результате трансдифференцировки специального типа мезенхимных клеток эктодермального происхождения.

Другой яркий пример вариативности механизмов регенерации демонстрируют голотурии (Holothuroidea). У голотурий четко выявляются три варианта восстановления кишки, которые реализуются в зависимости от размера оставшейся части пищеварительной системы. Первый вариант запускается, если у животного или его фрагмента сохраняется значительный участок кишки. В этом случае формируется один зачаток, а пищеварительный эпителий утраченных отделов кишки образуется из эпителия оставшейся ее части, за счет дедифференцировки, пролиферации и редифференцировки оставшихся энтероцитов. Вторым вариантом реализуется при утрате большей части пищеварительной трубки. В этом случае у голотурий сохраняются короткий передний отдел (пищевод) и клоака, за счет преобразования которых закладываются два зачатка. Передний развивается у пищевода, а задний отрастает от клоаки. В обоих зачатках пищеварительный эпителий формируется из сохранившихся энтероцитов. В дальнейшем оба зачатка растут по кишечному мезентерию навстречу друг другу и объединяются с образованием единой кишки. Третьим вариантом восстановительного морфогенеза у голотурий наблюдается при удалении всей пищеварительной системы. Клетки энтодермального происхождения сохраняются только в составе клоаки. Как и в предыдущем варианте, закладываются два зачатка, однако пищеварительный эпителий в переднем зачатке формируется из клеток целомического эпителия в результате их трансдифференцировки.

Заключение. Таким образом, у иглокожих отчетливо прослеживается вариативность механизмов регенерации пищеварительной системы. Этот феномен проявляется в различиях пространственной организации процесса восстановления и в использовании разных клеточных источников регенерации. Анализ имеющегося фактического материала показывает, что вариативность механизмов регенерации в типе Echinodermata обусловлена наличием у предковых форм вторичноротых животных нескольких вариантов восстановления, которые различаются вовлеченностью разных типов клеток, глубиной процесса репрограммирования их генома (дедифференцировка или трансдифференцировка) и ролью эпителио-мезенхимной трансформации.

ЭВОЛЮЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЖИВОТНЫХ

Ельчанинов А.В.

ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, Москва

ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, elchandreya@yandex.ru

EVOLUTION OF REGENERATION IN ANIMALS

Elchaninov A.V.

*V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Moscow*

Research Institute of Human Morphology, Moscow, elchandreya@yandex.ru

Проблема эволюции регенераторной способности органов многоклеточных животных является одной из самых сложных и интригующих в биологии. Регенерация представляет собой сложный и многогранный процесс, присущий практически всем уровням организации жизни.

Несмотря на длительный срок исследований, вопрос о закономерностях эволюции регенерационной способности у животных далек от решения. Во многом перечень проблем, вокруг которых ведутся экспериментальные работы и теоретические построения остался прежнем со времен А. Вейсмана и А. Нидхема: является ли регенерация первичным признаком всех живых организмов или является адаптивным признаком, роль частоты повреждения в эволюции регенерационной способности, роль окружающей среды, причины понижения и повышения регенераторного потенциала, связь регенерации и бесполого размножения и др.

С самого начала изучения было высказано два противоположных мнения на счет происхождения регенерации в филогенезе: регенерация - первичное свойство живых организмов или это свойство возникло в ходе эволюции у каких-то первых организмов вместе с возникновением многоклеточности. В соответствии со вторым взглядом, регенерация возникла как эпифеномен, когда программа, лежащая в основе того или иного морфогенетического процесса (эмбриогенез, бесполое размножение, рост), была задействована вновь при повреждении организма. Оба взгляда на сущность происхождения регенерации не противоречат друг другу, так как позволяют сделать вывод о том, что регенерация как свойство многих современных видов животных является гомологичным явлением и задействовала в своем развитии высококонсервативные механизмы поддержания гомеостаза.

Наибольшее внимание исследователей по понятным причинам приковывают к себе такие проявления регенерации, как восстановление целого организма из фрагмента или

регенерация конечности. В связи с этим эволюцию регенерации рассматривают на примере лишь небольшого числа моделей, при этом другие проявления восстановительных процессов ускользают от внимания исследователей, что приводит к одностороннему взгляду на проблему. Наиболее продуктивным для исследований эволюции регенерации является подход, предложенный рядом авторов. Необходимо выделять несколько форм регенераторного процесса в зависимости от уровня организации, и далее рассматривать регенерацию каждого из них. При этом очевидным становится, что эволюция регенерации не является однонаправленным процессом, ведущим только к ее ослаблению. У разных групп животных на первый план выступают те или иные формы проявления регенерации, но она никогда не исчезает полностью. Особенно это заметно на примере млекопитающих, в филогенезе которых произошло снижение масштаба регенерации, то есть они не способны образовывать целый организм из части или восстанавливать ампутированные конечности, затруднена регенерация краевых участков наружных органов, но хорошо развита регенерация, характеризующаяся внутренним формообразованием. Характерными примерами являются восстановление тканей ушной раковины после сквозного ранения, восстановление исходной массы печени после резекции.

Конечно, нельзя отрицать, что снижение способности к регенерации довольно часто наблюдается в ходе, что также привлекает внимание исследователей, так как обнаружение причин уменьшения способности к репарации позволяет найти конкретные способы стимуляции регенерации. Среди причин, приводящих к снижению регенераторной способности, называют приобретение теплокровности и выраженного адаптивного иммунитета, снижение пластичности клеток, высокую энергетическую ценность регенерации.

Для выявления общих закономерностей регенерации необходимо преодолеть несколько недостатков. В первую очередь, регенерационная способность по-прежнему изучена на ограниченном числе видов животных. Кроме того, стоит отметить, что повреждение органов у животных в естественной среде обитания чаще всего происходит в результате патологических процессов, регенерация после которых значительно отличается от репаративных процессов после механических травм. Данные о регенерации патологически измененных органов получены в опытах, проведенных, в основном, только на млекопитающих. Данные по другим группам позвоночных и тем более беспозвоночных животных отсутствуют.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-15-01419.

**ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК МОЗГОВЫХ ОРГАНОИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ
ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ИНДУЦИРОВАННОЙ
ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬЮ**

***Emelin A.M.¹, Ereemeev A.V.², Shuvalova L.D.², Kozireva E.B.³, Lebedeva O.S.²,
Chernova O.N.^{1,4}, Mavlikeev M.O.¹, Lagarkova M.A.², Deev R.V.¹***

1 – ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.

Мечникова, Санкт-Петербург, Россия. Eamar40rn@gmail.com

2 – ФНКЦ физико-химической медицины, лаборатория клеточной биологии, Москва

3 – ГБУ РО Городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Рязань

4 — ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург

**PROLIFERATION OF CEREBRAL ORGANOID CELLS DERIVED FROM
PATIENT-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL**

***Emelin A.M.¹, Ereemeev A.V.², Shuvalova L.D.², Kozireva E.B.³, Lebedeva O.S.², Chernova
O.N.^{1,4}, Mavlikeev M.O.¹, Lagarkova M.A.², Deev R.V.³***

1 – I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia.

*2 – Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical
Biological Agency of Russia, Moscow, Russia.*

3 – City Clinical Emergency Hospital, Ryazan, Russia.

4 — Saint-Petersburg Medico-Social Institute, Saint-Petersburg, Russia

Введение. Модели in vitro активно применяются для изучения патоморфогенеза заболеваний. Современным перспективным вариантом такой модели являются органоиды (кластеры клеток с высоким содержанием дефинитивных клеточных форм и органоподобной структурой), полученные в результате 3D культивирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Использование технологии индуцированной плюрипотентности и метода 3D культивирования даёт возможность избегать инвазивных, травматичных биопсий для получения клеток нужного типа и воспроизводить элементы гистогенеза в объёме, способствуя формированию органоспецифической цитоархитектоники, что особенно актуально для изучения наследственных нейродегенеративных заболеваний. Данные заболевания сопровождающихся изменением митотической активности клеток при развитии нервной ткани и требуют изучения в модельных условиях искусственного нейрогенеза.

Цель исследования. Определить паттерны пролиферативной активности клеток мозговых органоидов, полученных из клеток пациентов с нейродегенеративными заболеваниями.

Материал и методы. Выделенные от доноров с нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Хантингтона – клеточная линия HD76; спиноцеребеллярная атаксия – клеточная линия SCA17/9) и от здоровых доноров-добровольцев (клеточная линия Huv4s) индуцированные плюрипотентные стволовые клетки культивировали в течение полутора месяцев по протоколу (А.В. Еремеев и др., 2019) на базе лаборатории клеточной биологии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины (Москва, зав. М.А. Лагарькова) с получением мозговых органоидов. Органоиды, подвергали морфологическому исследованию с применением окраски гематоксилином и эозином, а также использовали иммуногистохимическую реакцию с использованием антител к Ki-67 для подсчёта индекса пролиферативной активности.

Результаты и обсуждение. При микроскопическом исследовании во всех органоидах были обнаружены «розетки» - аналоги примитивной нервной трубки, характерный элемент раннего периода нейрогенеза. При оценке распределения Ki-67⁺ клеток было выявлено, что в органоидах, полученных от пациентов со спиноцеребеллярной атаксией наблюдается высокая пролиферативная активность в розетках (Ki-67_i=37,03±12,7%), в кортикальных нейроэпителиальных клетках с радиальным и слоистым ориентированием (Ki-67_i=46,41±4,31%), а также в зонах почкования органоидов (Ki-67_i=90,83±3,24%). Вне перечисленных зон, в которых мелкие мноморфные клетки расположены диффузно, характерен низкий уровень пролиферации клеток (Ki-67_i=9,3±4,78%). Для органоидов, полученных от пациентов с болезнью Хантингтона, выявлена пролиферативная активность, неассоциированная со паттернами нейрогенеза (Ki-67_i=53,31±1,67%). В органоидах полученных из клеток здоровых доноров-добровольцев преимущественная, пролиферирующая их часть располагалась на периферии (Ki-67_i=35,4±22,78%), а в центре располагались митотически инертные клетки.

Заключение. Органоиды, полученные из клеток пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, при разных нозологиях характеризуются отличным друг от друга паттерном распределением пролиферирующих клеток, а в случае спиноцеребеллярной атаксии – разными, выраженными структурными зонами со специфичной митотической активностью.

**ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ ТИМУСА МЫШЕЙ
ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗУЧЕНИЯМИ РАЗЛИЧНОГО
ВИДА**

Ерофеева Л.М., Дорохович Г.П.

ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, gystology@mail.ru

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

**FEATURES OF REGENERATION OF LYMPHOID TISSUE OF THE THYMUS OF
MICE AFTER EXPOSURE TO IONIZING RADIATION OF VARIOUS TYPES**

Erofeeva L.M., Dorokhovich H.P.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, gystology@mail.ru

Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus

Введение. Механизмы высокой радиопоражаемости лимфоцитов в тимусе и последующей регенерации лимфоидной ткани до сих пор широко исследуются. Известно, что ионизирующие излучения могут вызывать неполноценную дифференцировку клеток, запуская процесс апоптоза. Менее подвержены гибели зрелые лимфоциты и клетки, стимулированные к делению. Цель работы – изучить изменение структуры и цитоархитектоники тимуса мышей в остром периоде после однократного воздействия ионизирующих излучений различного вида и процессы восстановления в отдаленные сроки.

Материалы и методы. Мыши-самцы линии Balb/c 3,5–4 мес. были распределены на группы по 56 особей. Животные 1 гр. однократно облучены гамма-излучением ¹³⁷Cs на установке «Свет» (источник 200 Гр-экв.) в дозе 6,9 Гр, животные 2-й группы однократно подвергнуты общему облучению ускоренными ионами углерода с энергией 300 МэВ/нуклон на синхрофазотроне ОИЯИ (г. Дубна) в дозе 4,0 Гр. Мышей из обеих групп (по 8 особей) выводили из эксперимента на 1, 3, 7, 14, 21, 30 и 60 сутки. Контроль составили интактные мыши, выведенные из эксперимента на 1, 30 и 60 сутки.

Результаты и обсуждение. Установлено, что при облучении мышей гамма-излучением в тимусе преобладала интерфазная гибель лимфоцитов, о чем свидетельствует преимущественное поражение малых лимфоцитов коркового слоя, которые, по-видимому, подвергались апоптозу. Однако определенная доля некроза лимфоцитов также имела место, о чем свидетельствует присутствие в тимусе в этот период большого числа лейкоцитов и формирование кистоподобных структур в корковой зоне. При облучении мышей ускоренными ионами углерода преобладала репродуктивная гибель лимфоцитов, так как поражались, в основном, клетки в стадиях митоза и бластные формы клеток. Известно, что тяжелые частицы, к которым относятся ионы углерода, вызывают двунитевые разрывы ДНК,

которые относятся к нерепарируемым повреждениям, поэтому клетка погибает в процессе деления. Нарастание процессов деструкции клеток и прогрессивное уменьшение количества малых лимфоцитов в корковом веществе тимуса наблюдалось до 3 суток, после чего отмечены признаки начинающегося процесса регенерации лимфоидной ткани. Известно, что постлучевое восстановление популяции клеток лимфоидного ряда в тимусе происходит как за счет собственных выживших (радиостойчивых) предшественников, так и за счет пополнения предшественников из красного костного мозга. Нами установлено, что динамика восстановительных процессов после действия разных видов ионизирующих излучений имеет свои особенности. После гамма-облучения восстановление численности лимфоцитов в тимусе протекает в два этапа с пиками на 7 сутки и 21 сутки. На 7 сутки, по-видимому, за счет бласттрансформации и пролиферации радиостойчивых предшественников и за счет вступления в митоз клеток, деление которых было задержано в результате воздействия ионизирующего излучения. Второй период регенерации с максимумом на 21 сутки происходит за счет поступления в тимус предшественников из красного костного мозга, в котором, по данным литературы, к этому времени уже прошли регенерационные процессы. Особенностью восстановительных процессов в тимусе после воздействия ускоренными ионами углерода является резкий подъем митотической активности и увеличение количества малодифференцированных форм клеток уже на 3 сутки после облучения. В последующей динамике восстановительных процессов отмечается только один пик на 15 сутки, когда содержание малых лимфоцитов превышало уровень контроля во всех структурных компонентах органа. В дальнейшем, с 15 до 60 суток после воздействия ускоренными ионами углерода, доля малых лимфоцитов в тимусе неуклонно уменьшалась, и в конце наблюдений была достоверно меньше уровня контроля. По-видимому, происходит нарушение процессов созревания и дифференцировки лимфоцитов в тимусе в отдаленные сроки после облучения ускоренными ионами углерода, что может явиться впоследствии причиной постлучевых иммунодефицитных состояний.

Заключение. После однократного облучения мышей гамма-излучением в дозе 6,9 Гр и ускоренными ионами углерода с энергией 300 МэВ/нуклон в дозе 4,0 Гр в тимусе подавляется лимфоцитопоз, уменьшаются размеры органа и нарушается корково-мозговое соотношение. В динамике постлучевых процессов выделены 3 фазы: деструктивная фаза (1-3 сутки), фаза компенсации (7-30 сутки) и фаза вторичного поражения тимуса (30-60 сутки). Повреждающее действие гамма-излучения сопровождается гибелью малых лимфоцитов в корковом веществе тимуса. Ускоренные ионы углерода повреждают клетки, способные к делению, что приводит к сокращению числа зрелых форм лимфоцитов в отдаленные сроки.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОИНТЕНСИВНОГО ИМПУЛЬСНОГО ЭРБИЕВОГО ЛАЗЕРА Er:(YAG) И РАСТВОРА ПРОНТОСАН® В ЛЕЧЕНИИ ГНОЙНЫХ РАН

Зайцев А.Е.¹, Чекарева И.А.², Асанов О.Н.¹, Паклина О.В.², Тинькова И.О.²

¹Филиал Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Москва, doc.zaitsev@yandex.ru

²ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского», Москва,

APPLICATION OF A HIGH-INTENSITY PULSE ERBIUM LASER Er:(YAG) AND PRONTOSAN® SOLUTION IN THE TREATMENT OF PURULENT WOUNDS

Zaytsev A.Ye¹, Chekmareva I.A.², Asanov O.N.¹, Paklina O.V.², Tinkova I.O.²

¹The branch of the Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Moscow, doc.zaitsev@yandex.ru

²National Medical Research Center of Surgery named after A.V. Vishnevsky, Moscow

Введение. Широкий спектр методов, ускоряющих заживление гнойных и хронических ран различной этиологии, должен быть направлен на демедиализацию и поиск принципиально новых способов борьбы с инфекционными агентами. Одним из таких методов является высокоинтенсивный импульсный эрбиевый Er:(YAG) лазер (ЭЛ), позволяющий комплексно воздействовать на процесс заживления в разные фазы раневого процесса.

Цель исследования. Изучить в эксперименте особенности репаративных процессов в гнойной ране после воздействия ЭЛ в сравнении с использованием раствора Пронтосан®.

Материал и методы. Объектом исследования явилась экспериментальная гнойная рана мягких тканей у 40 белых беспородных крыс-самцов. В 1-ой группе осуществлялись перевязки раны через день с использованием раствора Пронтосан®. Во 2-ой группе применялся ЭЛ с длиной волны 2,94 мкм. В I фазе применялся режим лазерной абляции. С очищением раны и наступлением последующих фаз раневого процесса (регенерации и эпителизации) лазерное воздействие осуществлялось только в режиме стимуляции регенерации. Сеансы проводились через день, плотность мощности лазера в режиме абляции составляла 10 Дж/см², а в режиме стимуляции регенерации – 1,8 Дж/см², с частотой импульсов 2-3 Гц. С такой же периодичностью проводилась обработка раны раствором Пронтосан®. Морфологическое исследование проводили на 1,3,5,7 и 12 дни наблюдения. Биоптаты отправляли на гистологическое и электронно-микроскопическое исследование.

Результаты и обсуждение. До лечения отмечали выраженную воспалительную реакцию. Фагоцитарная функция клеток была угнетена, о чем свидетельствует небольшое количество фагосом, фаголизосом, единичные цитоплазматические выросты и деструкция органелл. При электронно-микроскопическом исследовании обнаруживались скопления

микробов, заключенные в биопленку. На 3 сутки лечения гнойных ран раствором Пронтосан® (1-я группа) биопленка теряла плотность, была рыхлой, расслаивалась, а заключенные в нее микробные клетки находились в состоянии разной степени деструкции. Раневой дефект был заполнен молодой растущей грануляционной тканью с функционально активными макрофагами, фибробластами и небольшим количеством новообразованных капилляров. На 5–7 сутки лечения происходило активное прорастание сосудов, а на 12 сутки раневые дефекты заполнялись зрелой грануляционной тканью.

На 3 сутки во 2-ой группе животных после воздействия на гнойную рану ЭЛ отмечали деструкцию биопленок и микробных клеток в поверхностном слое раны. Раневые дефекты начинали заполняться грануляционной тканью. На 5–7 сутки комплексного лечения глубокие слои раневых дефектов состояли из правильно ориентированных коллагеновых пучков, а количество клеточных элементов и сосудов было меньше, чем в первой группе животных. Все это указывало высокую степень зрелости грануляционной ткани после применения ЭЛ в стимулирующем режиме. На 12 сутки лечения количество фибробластов уменьшалось. Коллагеновые волокна были ориентированы параллельно поверхности раны. Степень зрелости соединительной ткани была выше, чем при лечении ран раствором Пронтосан®.

Заключение. Проведенное морфологическое (электронно-микроскопическое) исследование показало эффективность использования ЭЛ в различных режимах работы в соответствии с фазой раневого процесса, что обеспечивается его различным воздействием на ткани. При использовании прибора в режиме лазерной абляции происходило эффективное удаление микробных биоплёнок из гнойного очага, что приводило к ускоренному переходу I фазы раневого процесса (воспаление) во II (регенерация). Применение ЭЛ в стимулирующем режиме приводило к усилению репаративных процессов на этапе созревания грануляционной ткани и, в частности, стимуляции функциональной (коллагенсинтетической) активности фибробластов. Комплексное воздействие ЭЛ на раневой процесс является весьма перспективной методикой нуждающейся в дальнейших исследованиях для более широкого внедрения в клиническую практику.

**ПУРИНОВЫЕ НУКЛЕОТИДЫ ВЫЗЫВАЮТ МОДУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ
РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА ТРИТОНА**

Илизарова Т.Э.^{1,2}, Радугина Е.А.², Маркитантова Ю.В.²

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова

² ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва,

taisya.ilizarova@gmail.com

**EXTRACELLULAR PURINE NUCLEOTIDES CAUSE THE MODULATION OF
REGULATORY GENES EXPRESSION IN THE NEWT EYE RETINA**

Ilizarova T.E.^{1,2}, Radugina E.A.², Markitantova Yu.V.²

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology of RAS, Moscow, taisya.ilizarova@gmail.com

Введение. В процессе регенерации сетчатки у тритонов происходит реактивация многих генов, участвующих в регуляции дифференцировки клеток в эмбриогенезе и поддержании гомеостаза тканей взрослого организма. Изучение механизмов дифференцировки клеток и поддержания гомеостаза нейральных тканей глаза у позвоночных, дают ключи к управлению этими процессами. Пуриновые нуклеотиды вовлечены в регуляцию большинства клеточных процессов, в том числе в сетчатке глаза позвоночных. Ранее, на модели глаза эмбрионов бесхвостых амфибий (шпорцевой лягушки) была выявлена связь компонентов пуринергической системы (АТФ, АДФ, Entpd2, P2ry1) с экспрессией регуляторных «генов глазного поля» Pax6, Otx2, Six3, критическая для дифференцировки и морфогенеза сетчатки и ретинального пигментного эпителия (Maase and Dale, 2012). В глазу мыши, в экспериментах по нокдауну Entpd2/P2ry1, обнаружены отличия во взаимодействиях компонентов пуринергической системы с исследуемыми генами, что не приводило к существенным изменениям характера их экспрессии и нарушениям в сетчатке и РПЭ глаза (Gamp et al., 2015). Представляет интерес изучение связи компонентов пуринергической сигнальной системы и регуляторных генов в сетчатке тритонов, обладающих уникальными регенерационными способностями (Chiba, Mitashov, 2007).

Цель работы состоит в исследовании влияния внеклеточных пуриновых нуклеотидов на гомеостаз сетчатки и РПЭ глаза тритонов. Одна из частных задач состояла в исследовании влияния АТФ на экспрессию эволюционно консервативных генов, участвующих в регуляции дифференцировки клеток сетчатки глаза в эмбриогенезе позвоночных.

Материалы и методы. Объектами исследования служили взрослые тритоны *Pleurodeles waltl*, а моделями – ткани заднего сегмента глаза, после изоляции и 3D-органотипического роллерного культивирования, в норме, после действия АТФ. Эффект на

клетки сетчатки и РПЭ анализировали методами гистологии. Динамику экспрессии генов оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени (qPCR), а локализацию белков методами иммунохимии.

Результаты и обсуждение. Проведено исследование пространственно-временной экспрессии гомеобоксодержащих генов-регуляторов глазного поля (Otx2, Pax6, Pitx1,2), рецепторов P2Y1, после действия внеклеточных пуриновых нуклеотидов – АТФ (агониста P2Y1). После обработки сетчатки глаза АТФ, была обнаружена модуляция экспрессии транскрипционных факторов Pax6, Otx2, Pitx1 и Pitx2. Анализ данных ПЦР в реальном времени, показал значительное увеличение уровня экспрессии гомеобоксодержащего гена Pax6, однако для гена Otx2 не было обнаружено выраженных изменений уровня экспрессии. Уровень экспрессии других гомеобоксодержащих генов – Pitx1 и Pitx2 значительно снижался, после действия АТФ. Способность тканей глаза к высвобождению нейромедиаторов, АТФ, действующих через разные типы рецепторов, оставляет возможность вне целевого действия нейромедиаторов, чрезмерное высвобождение которых особенно важно учитывать, при ряде патологических нейродегенеративных состояний.

Заключение. Результаты исследования, в сопоставлении с данными, полученными на моделях сетчатки глаза других видов позвоночных, свидетельствуют о различиях в работе эндогенных систем (в частности, пуринергической) у эволюционно отдаленных видов. Выявление сходства и различий в молекулярно-генетических механизмах поддержания гомеостаза в сетчатке и РПЭ, а также после их разобщения, с применением моделей *in vivo* и *in vitro*, способствует пониманию стратегий клеточного ответа, поиску фармакологических мишеней, с целью предотвращения развития нежелательных процессов, затрагивающих функционирование этих тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы фундаментальных исследований Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН в 2021 году, № 0108-2020-0005 и использовании оборудования ЦКП ИБР РАН.

**КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ГРАДИЕНТЫ В ПЕРЕДНИХ РОГАХ
СПИННОГО МОЗГА ПО МЕРЕ УДАЛЕНИЯ ОТ ЭПИЦЕНТРА ТРАВМЫ**

Кабдеш И.М.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, ikabdeshe@gmail.com

**CELLULAR AND MOLECULAR GRADIENTS IN THE VENTRAL HORNS OF
SPINAL CORD WITH INCREASING DISTANCE FROM THE EPICENTER OF SPINAL
CORD INJURY**

Kabdeshe, I.M.

Kazan (Volga region) Federal University, ikabdeshe@gmail.com

Введение. Функциональный дефицит нейронных сетей при травме спинного мозга является следствием слабой регенерации поврежденных аксонов и недостаточной реиннервации мишени. Для обеспечения протяженного роста аксонов и нахождения ими мишеней, далеко отстоящих от области повреждения, важно иметь представление об экспрессии потенциальных молекул-ингибиторов их роста в прилежащей к повреждению морфологически сохранной ткани. *Цель исследования* – изучить изменение количества NG2 экспрессирующих клеток, в первую очередь NG2 глии, а также содержание NG2 и маркерных молекул астроцитов и аксонов по мере удаления от эпицентра контузионного повреждения спинного мозга крысы.

Материалы и методы. У самок крыс линии Wistar воспроизводили модель дозированной контузионной травмы спинного мозга высокой степени тяжести (300 кдин). На 7 и 30 сутки после травмы забирали фрагмент спинного мозга на различных расстояниях от эпицентра повреждения (3-5, 6-8 и 10-12 мм каудально) с последующим выделением передних рогов для иммуногистохимического, молекулярного и иммуноэлектронного анализа.

Результаты и обсуждение. На расстоянии 3-5 мм от эпицентра повреждения количество отростчатых NG2⁺/Olig2⁺ клеток увеличивается к 7 суткам после травмы и остается повышенным на 30 сутки. На расстоянии 6-8 и 10-12 мм количество этих клеток по сравнению с интактным контролем несколько уменьшается (нет достоверных различий) с наибольшей выраженностью к 30 суткам и особенно на расстоянии 6-8 мм. Снижение средней интенсивности свечения NG2 протеогликана коррелирует с уменьшением количества NG2⁺ клеток на расстоянии 6-8 и 10-12 мм. Методом вестерн-блот анализа показано увеличение количества маркера астроцитов GFAP к 7 суткам на расстоянии 3-5 и 6-8 мм, а

также к 30 суткам на расстоянии 10-12 мм. Этим же методом показано, что транспортер глутамата GLT-1, экспрессируемый преимущественно в перисинаптических отростках астроцитов, парадоксальным образом увеличивается только на наибольшем из исследованных удалений, а именно на расстоянии 10-12 мм, что прослежено как на 7, так и на 30 сутки после травмы. Методом иммуноэлектронной микроскопии выявлено присутствие NG2 протеогликана в мембране и в цитоплазме клеток NG2 глиии и в большом количестве в мембранах миелина. Изучение колокализации NG2 протеогликана и маркера астроцитовальдегиддегидрогеназыALDH1L1 показало присутствие NG2 в небольшом количестве в интактном спинном мозге в отростках астроцитов, в том числе и отростках, примыкающих к нейрону. В клетках NG2 глииимунопозитивная реакция на NG2 протеогликан не сопровождается присутствием ALDH1L1. К30 суткам на расстоянии 3-5 мм экспрессия NG2 протеогликана представляется повышенной как в NG2 клетках, так и в реактивных астроцитах. Методом конфокальной микроскопии установлено значительное (~ в 8 раз) снижение количества 5-HT⁺ аксонов на расстояниях 6-8 и 10-12 мм от эпицентра в каудальном направлении, что согласуется с выявленным методом вестерн-блот анализа снижением количества β3-тубулина в этих областях.

Заключение. Вместе эти результаты указывают на значительные изменения клеточных и молекулярных ответов не только в области повреждения, но также в прилегающих и удаленных областях, что важно для оценки возможности протяженного роста аксонов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00018.

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ КОЖНОЙ РАНЫ НА ЖИВОТЕ И СПИНЕ КРЫС

Каныхина Е.Ю., Большакова Г.Б.

ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва gbolshakova@gmail.com

MACROPHAGES IN LIVER REGENERATION

Kananykhina E.Yu., .Bolshakova G.B.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, gbolshakova@gmail.com

Введение. Ранее нами было показано, что кожные раны на животе заживают с меньшим по площади рубцом, по толщине неотличимым от интактной. Прочностные характеристики кожи восстанавливаются к 60-м суткам после повреждения: на животе регенерат прочнее (58% прочности на разрыв от интактного контроля), чем на спине (17,4% от контроля), а соотношение коллагенов I и III типа на животе достигает уровня интактной кожи

(Кананыхина и др., 2016, 2019). При заживлении ран активность воспалительного процесса напрямую коррелирует с выраженностью образующегося рубца.

Цель исследования – изучение экспрессии генов провоспалительных (IL1 β , IL6, iNOS) и противовоспалительных (IL4, TGF β 1, Arg1, PDGF) цитокинов.

Материалы и методы. Исследование проведено на разработанной нами модели заживления кожи после эксцизионной раны диаметром 16 мм с использованием 75 крыс-самцов линии Wistar массой тела 250–300 граммов. Подробная методика операции была описана нами ранее [Кананыхина и др., 2016]: на спине или животе крыс вырезали полнослойный круглый лоскут кожи 16 мм в диаметре.

Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира на 3, 5, 7, 14, 20 и 30 сутки. В образцах кожи из области повреждения определяли экспрессию генов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программного пакета SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc.).

Результаты и обсуждение. На ранних сроках после операции (3 и 5 день) уровень экспрессии генов *il-1 β* , *il-6* и *inos* был выше в ранах на животе, что может свидетельствовать о более раннем, по сравнению со спиной, разворачиванием воспалительного процесса. Начиная с 7 дня уровень экспрессии всех провоспалительных цитокинов был значимо выше в ране спины, что может быть связано с тем, что воспалительная фаза заживления ран при локализации повреждения на животе начинается раньше и протекает быстрее, чем на спине. Возможно, на микроскопическом уровне это приводит к различному составу субпопуляций макрофагов в поздние сроки в ранах на спине и животе.

Экспрессия *il4* на спине снижалась на 3 и 7 сутки после операции. Максимум экспрессии *il4* на животе приходится на 7 сутки, после чего снижается, все еще оставаясь повышенным к 14 дню. Поскольку IL4 индуцирует дифференцировку прорегенераторных макрофагов, можно предположить, что в эти сроки в ране на животе идет активное ремоделирование раневого матрикса прорегенераторными макрофагами. Это косвенно подтверждается повышенной экспрессией *arg1*, маркера M2 макрофагов, в эти же сроки. Иной паттерн экспрессии *il4* наблюдается в ране на спине. Ко второй неделе после операции экспрессия начинает расти, и повышение продолжается, достигая максимума к 30 суткам. В связи с этим можно ожидать, что субпопуляционный состав макрофагов грануляционной, а на поздних сроках – и рубцовой ткани в ранах живота и спины будет отличаться: в ране живота после 14 суток прекращается привлечение M2 макрофагов, и, судя по снижению экспрессии *arg1* практически до исходной, начинается элиминация этих клеток. В ране

спины привлечение прорегенераторных макрофагов начинается в довольно поздние сроки – только спустя 2 недели после операции, когда рубец уже сформирован.

Заключение. Таким образом, воспалительная реакция кожных ран, локализованных на животе, начинается раньше и протекает быстрее, чем на спине, что обуславливает различные результаты заживления ран: плотному рубцу на спине и минимальному регенерату дермального типа на животе.

УЛУЧШЕНИЕ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОНЧИКА ПАЛЬЦА ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VIVO БИОРЕАКТОРА, ИНТЕГРИРОВАННОГО С ТРАВМИРОВАННЫМ ПАЛЬЦЕМ

Ковалев А. В.

ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова», Москва, kovalyovav@cito-priorov.ru

IMPROVEMENT OF POST-TRAUMATIC HUMAN FINGERTIP REGENERATION BY USING THE IN VIVO BIOREACTOR INTEGRATED WITH INJURED FINGER

Kovalev A. V.

Priorov Central Institute for Trauma and Orthopedics, Moscow, kovalyovav@cito-priorov.ru

Введение. Концепция консервативного лечения путем вторичного заживления травматических дефектов кончиков пальцев у людей конкурирует с хирургическими методами кожной пластики — закрытием ран кончиков пальцев кожным лоскутом. Ранее нам удалось продемонстрировать возможность стимуляции репаративной регенерации — отрастание от ампутационной поверхности безрубцовых регенератов кончиков хвостов и пальцев у животных моделей в условиях заживления ран в жидкой среде. Также нами разработан новый метод консервативного лечения детей с травматическими дефектами кончика ногтевой фаланги пальцев кисти в жидкой среде, который успешно применяется в клинической практике более 15 лет. Для выращивания кончика пальца у человека мы использовали ин виво биореактор, интегрированный с травмированным пальцем. *Цель исследования* — оценить влияние метода ин виво биореактора на вовлечение структур ногтевой фаланги руки взрослого человека молодого возраста в посттравматическую регенерацию кончика пальца после его травматического усечения и описать способ регенерации кончика пальца в этих условиях.

Материалы и методы. У 12 взрослых мужчин от 21 до 34 лет с частичным травматическим дефектом ногтевой фаланги (2–3-й уровни ампутации [Nelson, 1999]) рана оставалась открытой, на поврежденный палец надевался ин виво биореактор в виде шапочки, представляющий собой прозрачную емкость с элементом герметичного крепления

к эпителию кожи по краям раны и иммобилизующей повязкой. Пространство *in vivo* биореактора между внутренней стенкой устройства и раной заполнялось стерильной питательной средой F-12 для бессывороточного культивирования клеток. Все 20–25 суток от начала лечения травмированный кончик пальца был непрерывно погружен в биореактор. Для изучения и оценки были использованы методы наблюдения и цифровой макрофотосъемки кончика пальца, планиметрия ран, визуализация костной регенерации и регенератов с помощью цифровой рентгенографии и мультиспиральной компьютерной томографии с 3D-реконструкцией. Исследована динамика регенерации и структура кончика пальца во временном интервале от 1 суток до 12 лет после травмы.

Результаты и обсуждение. Регенерация кончика пальца у человека в представленном исследовании происходит преимущественно за счет контракции краев раны и внераневого вставочного роста кожи, в процессе заживления формируются две временные надклеточные структуры — грануляционная ткань и сократительное кольцо (*purse string*), обеспечивающие заживление. В динамике грануляционная ткань заполняла рану и образовывала характерное выпячивание в виде конического выроста, сжимаемого сократительным кольцом у основания. Направление действия сил сжатия кольца к центру ногтевой фаланги формирует видимую глазом борозду вдоль края интактной кожи. Эпителизация по краям раны выражена слабо, поэтому рана длительное время не заживает, формирования какого-либо аналога апикальной эпидермальной секреторирующей шапочки не происходит. Окончательное заживление раны происходит к 23–28-м суткам с момента начала лечения, после извлечения кончика пальца из биореактора и редукции грануляционной ткани. Новообразованный кожный регенерат атипичен, находится в центре, не превышает 20 % от исходной площади раны, не спаян с костью, умеренно подвижен. Ногтевая фаланга частично регенерирует в длину, костномозговой канал путем реканализации восстанавливается, замкнут костной пластинкой, ногтевая бугристость не восстанавливается. Новые кончики пальцев частично отрастают от раневой поверхности у всех пациентов, что не происходит при спонтанном рубцевании при равном уровне ампутации. Несмотря на некоторое укорочение и клювовидную деформацию регенерировавших кончиков пальцев, форма ногтевых пластинок приближена к правильной, рост роговых пластинок поддерживается всеми регенерирующими структурами кончика пальца, палец восстанавливает свою функциональность.

Известно, что пересадка кожного лоскута или ушивание раны подавляют естественный регенеративный ответ в экспериментальных моделях эпиморфной регенерации, а открытая рана способствует проявлению регенерационной способности, поэтому такой вариант ухода

за раной открывает возможности для поиска новых методов восстановления утраченных тканей, в том числе и у человека.

Заключение. Наши данные показывают, что метод ин vivo биореактора, интегрируемого с пальцем человека, улучшает репаративную регенерацию кончиков пальцев рук у взрослых после травматического усечения. Это является важным шагом на пути усовершенствования технологий ин vivo биореакторов для регенеративной медицины и повышения эффективности лечения травматических дефектов кончиков пальцев в хирургии.

**КЛЮЧЕВОЕ ЗНАЧЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ WNT И FGF В
РЕГЕНЕРАЦИИ АННЕЛИД**

Козин В.В.

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, v.kozin@spbu.ru

**CRUCIAL SIGNIFICANCE WNT AND FGF SIGNALING PATHWAYS IN
ANNELID REGENERATION**

Kozin, V.V.

St. Petersburg State University, v.kozin@spbu.ru

Введение. Межклеточные взаимодействия на основе сигнальных молекул Wnt, FGF и BMP играют ведущую роль в регенерации позвоночных. Более того, на моделях регенерации придатков (плавников и конечностей) выявлена консервативная взаимосвязь между каноническим Wnt и FGF путями сигнализации. Именно Wnt обеспечивает запуск FGF-сигналинга, индуцирующего и поддерживающего пролиферацию клеток бластемы. Имеются ли сходные механизмы, управляющие регенерацией беспозвоночных, до сих пор остается загадкой. Перспективной моделью регенерации беспозвоночных являются кольчатые черви, способные восстанавливать все отделы тела и ярко демонстрирующие феномены эпиморфоза и морфаллаксиса.

Цель исследования – определить степень вовлеченности Wnt и FGF-сигналинга в восстановление утраченных сегментов тела у аннелид.

Материалы и методы. У ювенильных морских червей *Alitta virens* (Nereididae, Errantia) проводили ампутацию задней трети тела. Ингибирование Wnt и FGF осуществляли с помощью фармакологических агентов 1-Azakenpaullone, PNU-74654, endo-IWR-1, iCRT14, IWP-2, SU5402, U0126. Для выявления пролиферирующих клеток объекты инкубировали с предшественником ДНК EdU. Фиксацию объектов проводили на нескольких контрольных точках в течение 7 дней после ампутации (дпа). Для анализа морфологических признаков дифференцировки проводили выявление мышц меченым фаллоидином, нервов – антителами к тубулину, ядер – красителем DAPI. Экспрессию генов Wnt, FGF и их мишеней определяли с помощью гибридизации *in situ* на целых объектах.

Результаты и обсуждение. Появление транскриптов *wnt1*, его мишени *engrailed*, лигандов и рецепторов *fgf* выявлено в раневой области уже в первые часы после ампутации. В ходе дальнейшего развития регенерационной почки указанные гены продолжали экспрессироваться в различных перекрывающихся доменах. При ингибиторном воздействии на компоненты Wnt пути был достигнут ярко выраженный разнонаправленный эффект. Малые дозы антагонистов Wnt-сигналинга endo-IWR-1 (10-30 мкМ), iCRT14 (5-10 мкМ),

IWP-2 (10 мкМ), и PNU-74654 (10 мкМ) вызывали небольшое замедление темпов регенерации и дифференцировки мышц и нервов, но характер распределения меченых EdU ядер существенно отличался от контроля. Под влиянием высоких концентраций PNU-74654 (30 мкМ) был достигнут эффект полного подавления пролиферации и закладки бластемы, что однозначно отражает критическую роль Wnt в инициации регенеративного ответа. В случае применения 1-Azakenpaullone (2-5 мкМ), подавляющего белок-антагонист GSK3, тканевая организация регенерата существенно нарушалась. После заживления раны нормальная бластема не формировалась, зато покровы дифференцировались, а пигидиальные цирры сильно разрастались. Включение EdU также происходило преимущественно покровными тканями, но на гораздо меньшем уровне, чем это свойственно и контрольным и менее зрелым объектам. Эксперименты по ингибированию FGF в растворах SU5402 (2-50 мкМ) и U0126 (10-40 мкМ) имели отчетливый градуально нарастающий эффект в зависимости от концентрации. Воспроизводимый эффективный результат заключался в тотальном угнетении клеточного размножения и отсутствии регенерата, если ингибирование начиналось сразу после ампутации. На более продвинутых стадиях регенерации фармакологическая блокада FGF постепенно утрачивала какой-либо эффект.

Заключение. Существующие современные транскриптомные данные (Bideau et al., 2021) говорят о вероятном участии Wnt и FGF пути в регенерации широкого спектра многоклеточных. Продемонстрированные нами описательные и функциональные данные позволяют утверждать, что эти сигнальные системы имеют ключевое значение в регенеративном ответе *A. virens*. Мы впервые выявили существование зон регенерата аннелиды с различной зависимостью от Wnt. Пролиферация прилегающих к области экспрессии Wnt клеток (зоны роста и пигидия) наиболее чувствительна к ингибиторам, где они явственно угнетают или усиливают интенсивность включения EdU. Необходимость существования градиента активности Wnt особенно хорошо демонстрируют эксперименты по гиперактивации данного каскада, которые приводят к транскриптованному фенотипу с частичным гиперморфозом. Полученные данные также являются первым в мире свидетельством функционирования FGF у представителей класы Spiralia.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-14-01089.

ГЕПАРИН ИНДУЦИРУЕТ РЕГЕНЕРАЦИЮ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПОСЛЕ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА

Кондашевская М.В., Алексанкина В.В., Артемьева К.А.

ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, histologist77@mail.ru

HEPARIN INDUCES ADRENAL REGENERATION AFTER PSYCHOEMOTIONAL STRESS

Kondashevskaya, M.V., Aleksankina V.V., Artemjeva K.A.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, histologist77@mail.ru

Введение. Эпидемии, подобные COVID-19, всегда имеют многочисленные негативные социальные, политические, экономические, психологические и ситуативные последствия и, таким образом, оказывают негативное влияние на психическое здоровье населения. По этим причинам распространенность симптоматики посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) значительно возросла во многих странах Мира. Следовательно, необходимы психологические и фармацевтические вмешательства для управления краткосрочными и долгосрочными психопатологическими последствиями пандемии COVID-19. Однако существующие до настоящего времени лекарственные препараты для лечения ПТСР не обладают достаточной эффективностью и имеют существенные побочные действия. *Цель исследования* – изучить влияние курсового введения малых доз нефракционированного гепарина (НФГ) на уровень кортикостерона в крови и морфофункциональное состояние коркового вещества надпочечников крыс Вистар при моделировании ПТСР.

Материалы и методы. Работа выполнена на половозрелых крысах-самцах Вистар (n=60) с исходной массой тела 180–200 г. Были сформированы 3 группы: 1-я – интактные крысы; 2-я – подверженные предаторному стрессу (10 мин, 10 сут, затем 14 сут в обычных условиях, ПТСР); 3-я – подверженные стрессу, после которого вводили НФГ («Сигма» в/м 1 раз в день 64 МЕ/кг, 7 дней, ПТСР-Геп) (n=20). Для выявления поведенческих проявлений развития ПТСР, животных в конце эксперимента тестировали в «приподнятом крестообразном лабиринте» (ПКЛ), вычисляли индекс тревожности (ИТ) по формуле: $ИТ = 1 - [(ВОР/ВТ + ЧЗОР/ОЧЗ)/2]$, где ВОР – время нахождения в открытых рукавах ПКЛ, ВТ – время тестирования в сек, ЧЗОР – число заходов в открытые рукава, ОЧЗ – общее число заходов в рукава. Гистологические экваториальные срезы надпочечников окрашивали гематоксилином и эозином. При помощи морфометрической программы AxioVision на микрофотографиях, полученных с помощью микроскопа AxioPlan 2 imaging, производили на каждом срезе 10 измерений толщины функциональных зон коркового вещества и диаметра карiona эндокриноцитов. В сыворотке крови крыс методом ИФА определяли уровень

кортикостерона («IBL» Германия). Сравнение экспериментальных групп производили при помощи ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение. Процедура тестирования крыс в ПКЛ, позволила установить наличие выраженных поведенческих признаков развития ПТСР у 2-й группы крыс, что подтверждалось характерным для ПТСР значительным снижением уровня кортикостерона (в 2 раза по сравнению с контролем). По сравнению с контролем у всех стрессированных крыс отмечено уменьшение толщины коркового слоя надпочечников в 1,8 раз, происходящее за счет сокращения толщины пучковой в 1,8-2,2 раза и сетчатой в 1,6-2,1 раза зон. Диаметр кариона эндокриноцитов (ДКЭ) клубочковой зоны не имел достоверно значимых отличий от контроля, тогда как ДКЭ пучковой зоны, производящей кортикостерон, снижался в 1,9-2,3 раза, а сетчатой зоны – в 1,5-1,7 раз. Тогда как после введения малых доз НФГ (ниже терапевтических доз для человека), не было выявлено анксиогенного эффекта стресса, а показатели уровня кортикостерона и значения всех показателей морфофункционального состояния коркового вещества надпочечников возвращались к норме.

Заключение. Нефракционированный гепарин, применяемый при моделировании ПТСР способен воздействовать на регуляторные механизмы регенеративных процессов надпочечников, вероятнее всего путем влияния на медиаторные процессы ЦНС. Последнее было показано в наших предыдущих работах. Таким образом, можно рекомендовать применение НФГ в малых дозах, при которых он не обладает нежелательными побочными свойствами, как профилактическое и лечебное средство при воздействии психоэмоциональных стрессорных факторов.

**ВОЗДЕЙСТВИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА В МОДЕЛИ IN VIVO**

Коротких А.Г., Сазонов С.В.

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский, Екатеринбург;

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург,

korotkich.hist@yandex.ru

**EFFECT OF CARBON NANOTUBES ON PERIPHERAL NERVE REGENERATION
IN THE IN VIVO MODEL**

Korotkich A.G., Sazonov S.V.

FSBEI HE Ural State Medical University, Yekaterinburg;

GAUZ SO Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg., korotkich.hist@yandex.ru

Введение. Повреждения нервного ствола вызывают расстройства движений, чувствительности и вегетативно-трофические нарушения. Высокая частота механических травм сочетается с недостаточной эффективностью методов лечения. Травматические поражения периферических нервов верхних конечностей составляют более 70% всех травм нервных стволов. Ежегодно в России в проведении операций по поводу травм периферических нервов нуждается от 4 до 7 тысяч человек. Техника аутологических нервных трансплантатов остается золотым стандартом восстановления целостности нервного ствола. При больших диастазах нерва (меньше 3 сантиметра) применяется техника наложения кондуита. Данные методики не обладают максимальной эффективностью, что приводит к нежелательным для пациента последствиям. По этим причинам необходимо разрабатывать новые методы и материалы в лечении повреждений периферических нервов, например, одностенные углеродные нанотрубки.

Цель исследования – оценить влияние одноходовых углеродных нанотрубок в кондуите нерва на процесс регенерации миелиновых нервных волокон.

Материалы и методы. Травму нерва наносили лабораторным кроликам, 2 выборки ($t_1=3$ месяцев, $t_2 = 6$ месяцев). На левой конечности (опыт) и правой (контроль) выделяли и пересекали седалищный нерв, на пересечённый нерв накладывали конduit из тефлонового сосудистого протеза. В конduit опытной конечности помещали одноходовые углеродные нанотрубки (Carbonnanotube, Single-Walled, Carboxylicacidfunctionalized, Sigma-Aldrich, Германия). На контрольной конечности проводили такое же оперативное вмешательство, только без применения нанотрубок. Через 3 и 6 месяцев соответственно, животных вывели из эксперимента. Из седалищных нервов изготавливали полутонкие гистологические срезы, окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрические

измерения проводились при помощи программы CellSensStandart (Olympus Corporation, Япония) при ув. 20×100. Измеряли диаметр миелиновых нервных волокон опытной и контрольной конечностей в дистальном и проксимальном участке нерва по двум осям. Статистический анализ материала проводился с помощью программы Microsoft Excel, 2019.

Результаты и обсуждение. Средний диаметр нервных волокон на прооперированном нерве (опыт) выборка 1 (3 месяца): проксимальный участок – $36,05 \pm 0,49$ мкм, дистальный участок - $36,62 \pm 0,85$ мкм. Контрольный нерв: проксимальный участок – $29,4 \pm 0,49$ мкм, дистальный участок $21,1 \pm 0,20$ мкм.

Средний диаметр нервных волокон на прооперированном нерве выборка 2 (6 месяцев): проксимальный участок - $43,16 \pm 0,61$ мкм; дистальный участок - $37,50 \pm 0,56$ мкм. Контрольный нерв: проксимальный участок - $32,63 \pm 0,57$ мкм; дистальный участок - $18,73 \pm 0,20$ мкм.

Заключение. Таким образом, использование после повреждения нерва в кондуите углеродных нанотрубок оказывает влияние на диаметр миелиновых нервных волокон. При использовании одностенных углеродных нанотрубок средний диаметр миелиновых нервных волокон дистального участка нерва увеличивается. Увеличение времени эксперимента достоверной разницы результатов не показало.

ВЛИЯНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, НА РЕГЕНЕРАЦИЮ СПИННОГО МОЗГА ПОСЛЕ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ

Костенников А.А.

ФГАОУ ВО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”,

maldito.goldpride@gmail.com

EFFECT OF MICROVESICLES ISOLATED FROM MESENCHYMAL STEM CELLS ON SPINAL CORD REGENERATION AFTER CONTUSION INJURY

Kostennikov A.A.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Kazan (Volga Region) Federal University””, maldito.goldpride@gmail.com

Введение. Микровезикулы представляют собой внеклеточные везикулы, обеспечивающие межклеточную коммуникацию, как в норме, так и в патологии, доставляя белки, липиды и нуклеиновые кислоты к клеткам-мишеням. *Цель исследования* – определение терапевтического потенциала индуцированных микровезикул, как переносчиков активных биомолекул с целью регенерации травмированного спинного мозга.

Материалы и методы. У самок крыс линии Wistar моделировали дозированную контузионную травму спинного мозга (ТСМ) после которой внутривенно инъецировали 10 мкг микровезикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток жировой ткани методом индукции цитохалазином-В. В контрольной группе после аналогичной операции внутривенно инъецировали 500 мкл 0,9%NaCl. Оценку двигательной активности проводили с помощью поведенческой шкалы BBB на протяжении всего эксперимента. На 60 сутки после ТСМ проводили количественную оценку олигодендроцитов при помощи антител к фактору транскрипции олигодендроцитов Olig2.

Результаты и обсуждения. Результаты показали, что введение микровезикул приводит к увеличению количества олигодендроцитов в различных зонах спинного мозга: вентральные рога ($P < 0.05$), вентральные и латеральные канатики при сравнении с контрольной группой. В ходе эксперимента наблюдалось улучшение двигательной функции задних конечностей в опытной группе крыс, где проводили введение микровезикул. Показатель восстановления двигательной функции (BBB) в группе с внутривенной инъекцией микровезикул возрастал более чем в 2 раза ($P < 0.05$) по сравнению с соответствующим показателем у крыс контрольной группы.

Заключение. Результаты исследования показывают, что лечение с помощью микровезикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток, стимулировало восстановление двигательной функции после ТСМ крысы. В сером и белом веществе спинного мозга было отмечено увеличение количества Olig2 экспрессирующих клеток, что косвенно свидетельствует о стимуляции миелинизации на фоне терапии микровезикулами при ТСМ.

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ OCT-4 И SSEA-4 В КУЛЬТУРАХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУЛЬПЫ И ПЕРИОДОНТА

Котова А.В.^{1,2}, Домбровская, Ю.А.³, Рюмина Н. А.², Корчагина Н. М.^{4,5}, Приходько

Е.М.^{2,3}, Енукашвили Н.И.^{1,2}

¹ ФГБУН Институт цитологии, Санкт-Петербург

² Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург,

³ ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

⁴ Клиника репродукции Скандинавия АВА-ПЕТЕР, Санкт-Петербург

anastkotova@gmail.com

PLURIPOTENCE MARKERS OCT-4 AND SSEA-4 EXPRESSION IN PULP AND PERIODONTAL LIGAMENT STEM CELL CULTURES

Kotova, A. V.^{1,2}, Dombrovskaya, Yu. A.³, Rumina, N. A.², Korchagina, N. M.^{4,5}, Prikhodko

Е.М.^{2,3} Enuakashvily, N. I. ^{1,2}

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

² Pokrovsky stem cell bank, Saint Petersburg

³ North-West State Medical University named after I. I. Mechnikoff, Saint Petersburg

⁴ Ava-Peter – Scandinavia Assisted Reproductive Technology Clinic, Saint Petersburg

⁵ St. Petersburg State University, Faculty of Biology, Saint Petersburg

anastkotova@gmail.com

Введение. В современной регенеративной медицине большое внимание уделяется изучению и использованию в практике постнатальных стволовых клеток. Одним из источников стволовых клеток с высокой клоногенной и пролиферативной активностью являются ткани ротовой полости: пульпа зуба, периодонтальные связки, слизистая ротовой полости и т.д. Ряд этих клеток можно получить во время рутинных стоматологических процедур (например, экстракции зуба). Стволовые клетки (СК) зуба представляют собой мигрировавшие во время эмбрионального развития клетки нервного гребня и обладают рядом характеристик мезенхимальных стромальных клеток, такими как фибробластоподобная форма, адгезия к пластику и способность к дифференцировке. Известно, что стволовые клетки из тканей зуба способны дифференцироваться *in vitro* в одонтобласты, остеобласты, нервные клетки, хондроциты, адипоциты, миобласты, фибробласты и эндотелиальные клетки. Помимо стандартных характеристик мезенхимальных СК ряд исследователей обнаруживает в клетках пульпы и периодонтальной связки экспрессию эмбриональных маркеров, таких как Oct-4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog и

других (Ballini et al., 2019, Tomokiyo et al., 2019). Экспрессию эмбриональных маркеров в СК зуба часто связывают с регуляцией таких свойств, как пролиферативная активность и их потенциальная плюрипотентность. В то же время наличие такой субпопуляции плюрипотентных клеток в составе стволовых клеток зуба для клинического применения может представляться потенциальной биологической опасностью, а именно Oct-4 позитивные клетки могут быть источником возникновения опухоли, как в случае с эмбриональными стволовыми клетками.

Целью работы являлось сравнение иммунофенотипа, пролиферативной активности и экспрессии маркеров эмбриональных стволовых клеток (Oct-4, SSEA-4) в первичных культурах СК пульпы и периодонта.

Материалы и методы. В работе сравнивали попарно первичные культуры СК пульпы и периодонта, полученные от одного и того же донора. Всего в исследовании использовали 5 таких пар. Первичные культуры клеток пульпы и периодонтальной связки получали из дистопированных или ретенированных третьих моляров, удаленных по ортодонтическим показаниям. Проводили ферментативную обработку связок зуба раствором коллагеназ. В случае закрытых корневых каналов зуб с неотделяемой частью связок также помещали в аналогичный раствор. Для извлечения СК из пульпарной камеры использовали два метода: заполнения корней и пульпы ферментирующим раствором через вскрытые с апикальной стороны корневые каналы или раскалыванием коронки зуба и последующей ферментацией. Полученные СК пульпы (СКП) и СК периодонтальной связки (СКПд) культивировали отдельно. У полученных первичных культур СК методом проточной цитометрии, иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии изучали иммунофенотип и локализацию антигенов Oct-4 и SSEA-4. Уровень экспрессии Oct-4 исследовали с помощью количественной ПЦР после выделения тотальной РНК и реакции обратной транскрипции. В качестве позитивного контроля экспрессии Oct-4 использовали кДНК бластоцисты человека.

Результаты и обсуждение. СКП и СКПд обладали фибробластоподобной морфологией, типичной для мезенхимальных стромальных клеток. Скорость пролиферации СКПд в два раза превышала скорость роста СКП во всех изученных парах сравнения (т.е. полученных от одного пациента). Обе популяции клеток обладали характерным для постнатальных СК набором поверхностных маркеров (CD90+/CD105+/CD44+/CD73+/CD45-/CD34-/CD14-). СКП и СКПд содержали около 20% CD117-позитивных клеток на ранних

(1-2) пассажах. Экспрессию маркеров Oct-4, SSEA-4 изучали на третьем пассаже. Согласно результатам иммуноцитохимического исследования в 80% СК пульпы в ядрах обнаруживался положительный сигнал по Oct-4 и отсутствовал сигнал от антител к SSEA-4. В свою очередь, в СКПд антитела к Oct-4 не выявили антиген, но 5% клеток оказались

положительны по SSEA-4. Уровень экспрессии Oct-4, согласно результатам количественной ПЦР, среди пар СКП/СКПд различался и внутри пары, и между парами. В одной из пар уровень экспрессии Oct-4 в СКПд оказался в 5 раз выше, чем в СК пульпы, при этом на иммуноцитохимических препаратах сигнал обнаруживался только в ядрах СКП. Остальные пары показали одинаковый уровень экспрессии Oct-4 внутри пары СКП/СКПд, однако отличались между собой (экспрессия в одной из пар Oct4 и в СКП, и в СКПд была в 4 раза выше чем в другой). Поскольку известно о существовании транскрибирующихся псевдогенов Oct-4, его идентификация при ПЦР-анализе СКПд может быть артефактом, что частично объясняет отсутствие ответа при иммуноцитохимическом исследовании. В тоже время есть сведения, что подавление коэкспрессии Oct-4 и Nanog в СКП снижает их пролиферативную активность, способность к остеогенной дифференцировке, а также уровень экспрессии STRO-1, CD146 и щелочной фосфатазы (ALP). Напротив, совместная сверхэкспрессия Oct-4 и Nanog повышает уровень экспрессии STRO-1 и CD146, скорость пролиферации и способность дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном, адипогенном направлениях (Huang C.E, Hu F.W et al.,2014). Наличие подобной закономерности может свидетельствовать, что «настоящий» эмбриональный Oct-4 всё же экспрессируется в клетках пульпы и выполняет определенную функцию.

Заключение. В нашей работе мы исследовали характеристики СК пульпы и периодонтальной связки, выявили повсеместную экспрессию маркера Oct-4 в парах СКП/СКПд, обнаружили различия между культурами пульпы и периодонтальной связки по скорости пролиферации, а также при иммуноцитохимическом выявлении антигенов Oct-4 и SSEA-4. Изучение закономерностей экспрессии Oct-4 и его псевдогенов, а также оценка биобезопасности субпопуляций СК пульпы и периодонта будут продолжены.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОРЕГУЛЯТОРОВ,
СПОСОБСТВУЮЩИХ ВОССТАНОВЛЕНИЮ И РЕГЕНЕРАЦИИ****Краснов М.С.**

ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

**EXPERIMENTAL MODELS FOR STUDYING BIOREGULATORS PROMOTING
RESTORATION AND REGENERATION****Krasnov M.S.**

A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds RAS

Введение. Для изучения механизмов, лежащих в основе регенерации в организме, важно подобрать экспериментальные модели, отражающие основные этапы этого процесса, по которым можно проследить за судьбой клеточных источников регенерации и молекул внеклеточного пространства, участвующих в восстановлении тканей после их повреждения. В этом аспекте обращают внимание модели стационарного и роллерного органотипического культивирования *in vitro*. Модели экспериментальных патологий *in vivo* также могут дополнять наши выводы о правильности представления о том или ином механизме регенерации, имеющем место в целом организме.

Цель исследования – исследовать различные модели как органотипического культивирования *in vitro*, так и модели *in vivo*, с помощью которых можно определить вклад отдельных клеточных источников регенерации, а также оценить влияние биологически активных веществ на ход и направленность процессов восстановления.

Материалы и методы. У самцов мышей линии СВА/С57В1 воспроизводили модель ранозаживления кожи *in vivo* и исследовали на ней действие восстанавливающих биорегуляторов. Между лопаток на спине у мышей выщипывали волосы, удаляли лоскут кожи диаметром около 10мм, на рану наносили ежедневно исследуемые вещества, действие которых определяли на гистологических срезах, оценивая качество состояния восстановленной кожи (Стрецкий и др., 2011). Производили роллерное органотипическое культивирование целых роговиц глаз тритонов *Pl. waltil* в течение 7 суток, для изучения условий дополнительной активации стволового отдела лимбальной области. На данной модели оценивали состояние эпителия, эндотелия и стромы роговицы на гистологическом уровне и количество слоев клеток (Маргасюк и др., 2008). На модели ампутации конечностей у бесхвостых и хвостатых амфибий изучали регенерацию хвоста и конечностей как в условиях *in vivo* (при ампутации конечности у лягушек) и *in vitro* (при культивировании регенератов конечности тритона) ([Aguillon-Gutierrez et al., 2020](#)). Для этого ампутировали конечности лягушек сразу после метаморфоза на 64 стадии на уровне проксимальнее 1/3

бедр, и изучали состояние регенератов под действием различных биологически активных молекул. Для культивирования регенератов *in vitro* ампутировали конечности тритона на расстоянии 1 см от дистального конца, далее через 40 дней образовавшиеся регенераты конечности повторно ампутировали и культивировали 12 дней *in vitro*. Далее исследовали морфологическое состояние тканей регенератов на гистологических срезах.

Результаты и обсуждение. Приведены данные, полученные на данных моделях при изучении биорегуляторов, принадлежащих к группе мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови, роговицы глаза и кости быка. На модели ранозаживления кожи мыши *in vivo* было показано восстанавливающее действие биорегулятора из сыворотки крови, при этом происходило полное восстановление ткани кожи с потовыми и сальными железами и волосяными фолликулами, отражающее эпиморфную регенерацию, как это происходит в процессе эмбрионального развития. На модели роллерного культивирования ткани роговицы глаза тритона была показана активация стволового лимбального отдела данной ткани под действием биорегулятора из роговицы, выражавшаяся в увеличении слоев клеток эпителия роговицы за счет активной пролиферации клеток лимбального отдела. Аналогичное культивирование роговиц тритона без лимбального отдела не приводило к увеличению слоев эпителиальных клеток роговицы даже под действием исследуемого биорегулятора, что указывает именно на активацию клеток данного отдела, а не базального слоя роговицы в ответ на действие биорегулятора. Под действием биорегулятора из сыворотки крови, было показано восстановление пальца на конечности бесхвостых амфибий после ампутации конечности на стадии после метаморфоза. Обычно процесс регенерации на данной стадии блокирован и происходит образование регенератов в виде спикул без дополнительных образований конечности типа пальцев или кисти. На модели роллерного культивирования регенератов конечностей тритонов было показано протекторное действие на ткани хряща и другие соединительные ткани под действием биорегуляторов из сыворотки крови и костной ткани.

Заключение. На выбранных экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* были получены результаты, показывающие что биорегуляторы, принадлежащие к группе МГТБ, обладают способностью поддерживать, восстанавливать ткани при их повреждении за счет активации клеточных источников регенерации в ткани.

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ К Г-КСФ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС
ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ**

Кривопалов С.А., Юшков Б.Г.

ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург,

s.krivopalov@gmail.com

**DISTRIBUTION OF G-CSF RECEPTORS IN KRUSHINSKY-MOLODKINA RAT
STRAIN BRAIN**

Krivopalov S.A., Yushkov B.G.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,

s.krivopalov@gmail.com

Введение. Наличие рецепторов к колониестимулирующим факторам (КСФ) в головном мозге млекопитающих позволяет рассматривать их не только в роли соединений, управляющих гемопоэзом в костном мозге, но и как более универсальные (гормоноподобные) регуляторные молекулы. Работы, демонстрирующие высокий терапевтический потенциал КСФ в лечении нейродегенеративных заболеваний и инсульта являются основанием для изучения возможности применения цитокинов данной группы при эпилепсии. Такая постановка задачи предполагает сравнительное изучение распределения рецепторов к различным КСФ в норме и при патологии. *Цель исследования* – изучить распределение рецепторов к Г-КСФ в головном мозге крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ), являющихся моделью аудиогенной эпилепсии.

Материалы и методы. Исследование проводилось на крысах линии КМ и Вистар (по 7 самцов в каждой группе, возраст 6 месяцев, вес 270 ± 30 г). Иммуногистохимическая окраска срезов мозга производилась по стандартной методике (фиксатор – формалин, парафиновая проводка в автоматическом режиме) антителами Abcam (ab181053). Локализация CD114-позитивных клеток определялась по атласу головного мозга крыс (G Paxinos, C Watson – 2006).

Результаты и обсуждение. Клетки, несущие на своей поверхности заметное количество рецепторов к Г-КСФ, обнаружены в мозжечке крыс линии Вистар (структуры: MoCb, 6bCb, Crus1, PIF), коре больших полушарий (VO, TeA, M1, M2), обонятельных луковицах (Pir1, OV, Mi, Gro), и стриатуме (CPU). Животные с предрасположенностью к аудиогенным судорогам, помимо вышеперечисленных зон, имеют CD114-позитивные клетки структурах гиппокампа (GrD6, CA1, CA2, Py, PoD6, DS, VS), среднего мозга (LPA6, SNR, PPTg, Mlf, Dscp, Scp, PAG, PN, 3N, InC, Su3, SPTg), гипофиза (HDB, VDB, MS, MPA, LPO, MEE, Mel, SO b VMPO), таламуса (VP, MDM, MDC, VA, Rt, PP, PMCo, SG), и оливарного

комплекса (PnO, RtTg, OV). Часть из этих структур имеет прямое отношение к слуховому анализатору и участвует в распространении аудиогенной эпилептиформной активности (PnO, Ic). При сравнении плотности распределения окрашенных клеток в соответствующих структурах мозга установлено, что у крыс КМ количество клеток, несущих на своей поверхности рецептор к Г-КСФ, выше в среднем в 2 раза, чем у Вистар. При этом есть зоны, где этот показатель достигает более высоких значений (3-4 и более) – GrO, Mi и M2.

Заключение. CD114-позитивные клетки у крыс линии КМ распределены по головному мозгу в значительно в большем количестве. Это связано, прежде всего с тем, что их относительная плотность в соответствующих структурах выше, чем у Вистар на 30-400%, а также с тем, что число структур мозга, в которых обнаружены окрашенные клетки, в разы превосходит таковое у Вистар. Поскольку, колониестимулирующие факторы, прежде всего, рассматриваются, как регуляторы пролиферации различных типов клеток, увеличение числа восприимчивых к Г-КСФ структур головного мозга у крыс с врожденной аудиогенной эпилепсией может свидетельствовать, с одной стороны, о нарушениях регенеративного потенциала мозга, а с другой стороны – о запуске компенсаторных процессов в ответ на эти нарушения.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВАНКОМИЦИНА НА СТРУКТУРНО-ФАЗОВОЕ СОСТОЯНИЕ КОСТНЫХ ЦЕМЕНТОВ НА ОСНОВЕ ФАЗЫ СТРУВИТ, ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ И ОСТЕОКОНДУКТИВНЫХ ПОТЕНЦИЙ IN VIVO

Крохичева П.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва

polinariakroh@gmail.com

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF VANCOMYCIN DOPPING ON THE STRUCTURAL AND PHASE STATE OF BONE CEMENT BASED ON THE STRUVIT PHASE, ESTIMATION OF THE BIOCOMPATIBILITY AND OSTEOCONDUCTIVE POTENTIALS IN VIVO

Krokhicheva P.A.

Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation, polinariakroh@gmail.com

Введение. В последние годы магний-кальций фосфатные материалы (МКФМ) рассматриваются, как альтернатива материалам на основе фосфатов кальция (КФМ), в реконструктивно-восстановительной хирургии. Наша работа сосредоточена на создании и изучении структурно-фазового состояния костных цементов на основе фазы струвит ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$). Ванкомицин часто используется в ортопедической хирургии как местная профилактика бактериальных инфекций, костные цементы выступают в роли носителя антибиотика и обладают способностью адресной доставки медикаментозного препарата непосредственно к месту поражения. Таким образом, было рассмотрено несколько вопросов: 1) Влияние введения ванкомицина разной концентрации на антибактериальную активность костных цементов и кинетику выделения; 2) Влияние введение ванкомицина на механические свойства костных цементов; 3) Влияние введение ванкомицина на поведение костных цементов в исследованиях *in vivo*.

Теория. Существует оптимальные концентрации ванкомицина которые могли бы обеспечить достаточно эффективное время выделения антибиотика (≥ 3 недель), добавленного в магний-кальций фосфатный цемент (МКФЦ) и достаточную механическую прочность на сжатие (> 11 МПа).

Материалы и методы. МКФЦ были получены на основе системы $(Ca+Mg)/P=2$ с 60 моль.% замещения Mg методом осаждения из водного раствора солей, в качестве контроля использовался цемент на основе системы $Ca/P=2$. Для цементных материалов с добавлением ванкомицина было выбрано две концентрации 160мг/г и 100мг/г, ванкомицин вводили двумя

способами в цементное тесто: через порошок и через суспензию. Исследование кинетики выделения ванкомицина проводили методом спектрофотометрии в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко на срок до 21 суток и термостатировании при 37 °С. Исследование антибактериальной активности проводили в отношении штаммов бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* методом погружения в агар. Исследования биосовместимости и остеокондуктивных свойств проводили на модели подкожной имплантации мышам и резекции большеберцовой кости у крыс в срок 3,6 и 12 недель.

Результаты. Было обнаружено, что МКФЦ без добавления ванкомицина проявляет собственную антибактериальную активность в отношении грамм-положительных бактерий с диаметром зоны подавления 5мм. Происходит выделение антибиотика до 98% в цементных образцах, содержащих ванкомицин, в течение 21 суток. Механическая прочность цементных образцов уменьшается от 54МПа до 38МПа при введении ванкомицина вне зависимости от концентрации. По макро- и микро- признакам цементные материалы являются полностью биосовместимыми, к 6 неделе наблюдается образование новой костной ткани.

Заключение. В ходе работы были получены новые МКФЦ на основе фазы струвит, которые расширяют область исследований биоматериалов, применяющихся для замещения костных дефектов. Было показано, что такие цементные материалы могут являться носителем лекарственных средств (ванкомицина) и проявлять антимикробные свойства в течение 21 суток против грамм-положительных и грамм-отрицательных бактерий. По макро- и микро- признакам, полученные цементные материалы являются биосовместимыми: отсутствуют признаки воспаления, лимфоидной инфильтрации, отека окружающих тканей, что подтверждает это заключение. Наличие клеток инородных тел, фрагментация цементных дисков, их прорастание соединительной тканью в сроки 3-12 недель являются косвенным подтверждением процесса разрушения (деструкции/биodeградации) цементных материалов различных составов, наиболее динамично протекающих в группах образцов, в состав которых включен антибиотик – ванкомицин.

ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИОБЛАСТОВ РЫБ

Курилов И.В.

КФУ ИФМиБ, Казань

КФУ ИФМиБ НИЛ LAB «Генно-клеточных технологий»,

Казань, igor.vemogushi@gmail.com

STUDY AND ISOLATION OF FISH MYOBLASTS

Kurilov.I. V.

KFU IFMiB, Kazan

KFU IFMiB NIL LAB of gene-cell technologies,

Kazan, igor.vemogushi@gmail.com

Введение. Миобласты — это клетки, играющие основную роль в построении мышечной ткани. Выращенные *in vitro* миобласты рыб могут использоваться как для изучения различных заболеваний рыб, а также в биотехнологии для получения альтернативных клеточных мясных продуктов.

Цель исследования – изучение особенностей получения и выращивания миоцитов мышечной ткани осетра.

Материалы и методы. В стерильных условиях проводили забор мышечной ткани со спины свежезабитой тушки осетра. Миосателлиты выделяли ферментативным методом. Полученную суспензию клеток высевали на предварительно обработанную 0,1% раствором желатина (ПанЭко, Россия) культуральную посуду T25 (SPL, Корея). Высеянные клетки выдерживали 30 мин, после чего не прикрепившиеся клетки вместе со средой убрали и заливали новой ростовой средой. Клетки инкубировали при 20°C. Определение жизнеспособности проводили с помощью набора Annexin V Apoptosis Detection Kit согласно инструкции производителя (Santa Cruz, sc-4252 АК, США) на проточном цитофлуориметре (Guava easyCyte 8HT, США). Иммуногистохимический анализ клеток на наличие внутриклеточного маркера миобластов – десмина (sc-14026; Santa Cruz, USA) проводили по инструкции производителя. Образцы визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Axio Vision (Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8.

Результаты и обсуждение. Миобласты осетра, выделенные из мышечной ткани, через 24ч прикрепилась к подложке на культуральном пластике и активно размножались, приобретая характерную для миобластов веретеновидную форму с центрально расположенным ядром. 100% выделенных из мышечной ткани осетра клеток окрашивались на белок десмин. Белок десмин является необходимым элементом клеточного скелета

мышечных клеток и одной из ранних белковых «меток» мышечных клеток в эмбриогенезе, так как он обнаруживается в миобластах сомитов. Жизнеспособность миобластов осетра составила 97%. Это является хорошим показателем. По литературным данным хорошим показателем жизнеспособности клеток первичной культуры является наличие 60% живых клеток в образце.

Заключение. Таким образом, выделенные и культивируемые нами клетки осетра являются миобластами и обладают высокой жизнеспособностью, что дает возможность применять разработанную методику для получения миобластов из других видов рыб.

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НЕЙРОНОВ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИПСК

***Кутукова К.А.^{1,2}, Иванов М.В.^{1,2}, Фрумкина Л.Е.¹, Новосадова Е.В.³, Симонова В.В.¹,
Антонов С.А.³, Гривенников И.А.³, Худоевков Р.М.¹, Хаспеков Л.Г.¹***

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, chrisbiomag@mail.ru

²ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

³ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН, Москва

ULTRASTRUCTURE OF IPSC-DERIVED NEURONS

***Kutukova K.A.^{1,2}, Ivanov M.V.^{1,2}, Frumkina L.E.¹, Novosadova E.V.³, Simonova V.V.¹,
Antonov S.A.³, Grivennikov I.A.³, Khudoerkov R.M.¹, Khaspekov L.G.¹***

¹Research Center of Neurology, Moscow, chrisbiomag@mail.ru

²Pirogov Medical University, Moscow

³Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow

Введение. Одним из ключевых научных достижений последних десятилетий стала технология репрограммирования соматических клеток животных и человека в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые могут быть в дальнейшем дифференцированы в любые виды тканей. Возможность получения из ИПСК нейронов различной медиаторной природы позволяет изучать клеточные и молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний, в том числе, болезни Паркинсона, осуществлять скрининг новых фармацевтических препаратов, а также создает основу для трансплантационной персонализированной клеточной терапии.

Цель исследования – охарактеризовать ультраструктуру вентральных мезенцефалических нейронов, дифференцированных из ИПСК здорового донора, на различных сроках культивирования *in vitro*.

Материалы и методы. В работе была использована полученная ранее клеточная линия ИПСК от здорового донора (Novosadova et al., 2016). Дифференцировку в вентральные мезенцефалические нейроны проводили в три этапа: I этап – нейрональная индукция с помощью двойного ингибирования SMAD-пути, II этап – региональная спецификация, III этап – терминальная дифференцировка. К 7-8 дню терминальной дифференцировки в культурах обнаруживались клетки, иммунопозитивные к b-III-тубулину, тирозингидроксилазе, а также транспортёр дофамина, что подтверждает успешность дифференцировки нейрональных предшественников в направлении дофаминовых мезенцефалических нейронов. Для электронно-микроскопического исследования использовали монослойные культуры клеток на стёклах на 7-й, 14-й и 19-й день терминальной дифференцировки. Клетки фиксировали 2% глутаральдегидом, постфиксировали в 1% растворе OsO₄, дегидратировали в этаноле восходящей концентрации и заключали в смолу Epon. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе.

Результаты и обсуждение. На 7-й день терминальной дифференцировки *in vitro* (DIV) нейрональные производные ИПСК по своей ультраструктуре находятся на ранних этапах созревания. Цитоплазма и кариоплазма основной массы клеток тёмные и однородные, ядерно-цитоплазматическое соотношение высокое, в цитоплазме содержатся свободные рибосомы, полисомы и мелкие митохондрии. Клетки образуют друг с другом точечные десмосомовидные адгезивные контакты. На 14-й DIV в культуре обнаруживаются клетки с более развитой ультраструктурой: более светлой цитоплазмой, скоплениями гетерохроматина вблизи внутренней ядерной мембраны, небольшим количеством цистерн эндоплазматического ретикулума. На 19-й DIV в культуре преобладают клетки с более развитой ультраструктурой, в некоторых клетках цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума начинают формировать субстанцию Ниссля. Наряду с адгезивными контактами, впервые выявляются смешанные, симметричные и асимметричные авезикулярные соединения, появление которых предшествует образованию зрелых химических синапсов.

Заключение. Ультраструктурные изменения в клетках, дифференцированных из ИПСК в нейрональном направлении, происходят по общим закономерностям нейрогенеза и синаптогенеза *in vivo* и *in vitro*. Основного признака функционально зрелых нейронов – химических синапсов с синаптическими везикулами – нам обнаружить не удалось. Однако выявленные нами симметричные, асимметричные и смешанные авезикулярные соединения являются ультраструктурным критерием развития и созревания химических синапсов.

**БИОКОМПОЗИТНЫЕ КОСТНОЗАМЕЩАЮЩИЕ МАТЕРИАЛЫ,
СОДЕРЖАЩИЕ ГИДРОКСИЭТИЛКРАХМАЛ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ
АМИКАЦИНОМ**

***Кушнерев К.С., Чумакова А.С., Власкина Е.Р., Ванюшенкова А.А., Белов А.А.,
Воробьев К.А., Межуев Я.О., Дятлов В.А., Лусс А.Л.***

ФГБОУ РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

ФГБУ «НМИЦ ТО им Н. Н. Приорова», Москва, firstavenue@mail.ru

**BIOCOMPOSITE BONE-SUBSTITUTING MATERIALS CONTAINING
HYDROXYETHYL STARCH WITH IMMOBILIZED AMIKACIN**

***Kushnerev K.S., Chumakova A.S., Vlaskina E.R., Vaniushenkova A.A., Belov A.A.,
Vorobev K.A., Mezhuev Ya.O., Dyatlov V.A., Luss A.L.***

D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after N.N.

Priorova, Moscow, firstavenue@mail.ru

Введение. В современной регенеративной медицине широко применяются разнообразные биоматериалы. В частности, в травматологии используют изделия из химически стабилизированных костных матриксов. Главным требованием, предъявляемым к этим материалам, является биосовместимость. Однако практика последних лет показала, что для успешного применения этого класса материалов в регенеративной медицине требуется обеспечивать помимо стабильности свойств и биосовместимости еще и локальный лечебный эффект. При этом в разные периоды после имплантации требуется терапия различными лекарственными веществами. Также в течение всего срока функционирования имплантата необходима длительная защита от бактериальной инфекции. В отличие от живой кости, биопротез не способен самостоятельно сопротивляться бактериальной атаке.

Настоящая работа посвящена созданию новых биокomпозитных материалов на основе бычьего костного матрикса, покрытого полисахаридными гелевыми слоями, способными локально выделять антибиотики при атаке протеза бактериями.

Материалы и методы. Биокomпозитный материал на основе очищенной губчатой бычьей кости и гидроксиэтилкрахмала получали следующим образом: предварительно подготовленный костный матрикс помещали в гелеобразующий раствор на основе гидроксиэтилкрахмала модифицированного эпихлоргидрином с ковалентно связанным амикацином. Обработку проводили способом вакуумной пропитки. Бактериостатические свойства гелевого слоя подтверждали методом локального ингибирования роста культуры

золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus* 209P) на агаризованной среде (метод колодцев).

Результаты и обсуждение. Полимер носитель подбирали таким образом, чтобы он обладал устойчивостью к действию основных ферментов организма, однако легко разлагался бактериями. В качестве основы использовали гидроксипропилкрахмал - широко используемый кровезаменитель. В костной ткани отсутствует фермент способный его разлагать, однако многие бактерии, включая стафилококки, способны вырабатывать амилазу быстро разлагающую гелевый слой с локальным выделением антибиотика. Непосредственное ковалентное связывание амикацина с полисахаридом невозможно без предварительного химического активирования носителя. Гидроксипропилкрахмал активировали эпихлоргидрином с последующим присоединением антибиотика в щелочной среде. При этом формировали устойчивую к гидролизу вторичную аминную связь между полимером-носителем и физиологически активным веществом. Отсутствие спонтанного выхода антибиотика контролировали с применением агаризованных сред и тест культур рекомендованных для определения активности свободного амикацина. Измеряли размер зоны ингибирования роста золотистого стафилококка, образующейся вследствие выхода антибиотика из образца костного матрикса и его диффузии внутрь агаризованной среды. В качестве эталона сравнения использовали гель не содержащий амикацин.

Выход, инициируемый ферментами бактерий, определяли в тесте при котором обеспечивался непосредственный контакт биопротеза с газоном стафилококка на кровяном агаре. Через сутки наблюдается зона ингибирования роста вокруг биоматериала обработанного гелем с антибиотиком. В образце сравнения без антибиотика зона ингибирования роста не образуется. Таким образом, выделение амикацина происходит локально под воздействием ферментов золотистого стафилококка.

Заключение. Показана возможность создания биоконструктивных материалов на основе бычьего костного матрикса путем прививки производных гидроксипропилкрахмала, содержащих реакционноспособные эпоксидные группы и ковалентно связанный амикацин.

Обнаружено, что продукт иммобилизации амикацина на эпихлоргидрин активированном гидроксипропилкрахмале не способен к гидролизу в отсутствие амилазы с выделением гликозидов амикацина, оказывающих бактериостатическое действие.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания по проекту FSSM-2020-0004

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ МАКРОФАГОВ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Лохонина А.В.^{1,2}, Гринберг М.В.³

¹ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, Москва

²ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, lokhonina-av@rudn.ru

³Российский университет дружбы народов, Москва

CHANGES IN THE EXPRESSION OF MACROPHAGE MARKERS DURING LIVER REGENERATION

Lokhonina A. V., Grinberg M. V.

¹V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

²Research Institute of Human Morphology, Moscow, lokhonina-av@rudn.ru

³Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

Введение. Неотъемлемыми участниками репаративных процессов и воспалительных реакций в печени являются резидентные макрофаги – клетки Купфера. Главной функцией макрофагов является синтез и выделение большого числа цитокинов, регулирующих морфогенетические процессы в печени. Разработка новых способов стимуляции регенерации печени невозможна без учета вклада в эти процессы макрофагов.

Цель исследования - изучить профили экспрессии маркеров макрофагов на модели регенерации печени мыши после частичной гепатэктомии.

Материалы и методы. Клетки Купфера печени самцов мышей линии Balb/C получали методом иммуномагнитного сортирования на мануальном сепараторе с использованием магнитных микрочастиц Anti-F4/80 MicroBeadsUltraPure (Miltenyi Biotec) на 1-ые, 3-ьи, 7-ые, 10-ые и 14-ые сутки после резекции 70% паренхимы печени. Чистоту полученных популяций проверяли с помощью антител к макрофагальному маркеру Anti-F4/80. У полученных макрофагов методом проточной цитометрии изучали экспрессию поверхностных и внутриклеточных маркеров: Ly6C, CD11b (маркеры макрофагов костномозгового происхождения), CD163, CD206, CD86 (функциональные маркеры макрофагов), Ly6G (маркер эозинофилов). В качестве контроля использовали F4/80-положительные клетки, выделенные из интактной печени мыши.

Результаты и обсуждение. На модели регенерации печени после резекции 70% паренхимы установлено, что в печень на 1-ые сутки после резекции мигрируют макрофаги костномозгового происхождения (CD11b⁺Ly6C⁺). Максимальное их количество в выделенной популяции наблюдалось на 3-ьи сутки после резекции. Вероятно, с этим связано

снижение среди макрофагов регенерирующей печени доли клеток, экспрессирующих маркеры M2-макрофагов - CD163 и CD206. Резекция печени вызывает миграцию в печень эозинофилов (LybG⁺) начиная с 1-ых суток после операции. Доля CD86-положительных M1-макрофагов также снижается на 1-ые сутки и только к 14-ым суткам достигает количества, которое было до резекции.

Заключение. Получение новых знаний об особенностях пластичности и функциональной активности гетерогенной макрофагальной популяции позволит лучше понять их роль в поддержании/восстановлении гомеостаза, а значит, и разрабатывать новые эффективные способы стимуляции репаративных ответов. Изучение макрофагов как одной из мишеней терапевтического воздействия необходимо для обоснования и разработки новых подходов в лечения разного рода патологий.

**ПАТЕНТОВАНИЕ РАЗРАБОТОК, ВКЛЮЧАЮЩИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ЭМБРИОНОВ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Лысков Н.Б., Никитина Н.Б., Блохина Ю.В., Лебедева Н.А.

ФГБУ «Федеральный институт промышленной собственности», Москва,

otd1463@rupto.ru

**PATENTING DEVELOPMENTS INCLUDING THE USE OF EMBRYOS AND
EMBRYONIC CELLS**

Lyskov N.B., Nikitina N.B., Blokhina U.V., Lebedeva N.A.

Federal institute of industrial property, Moscow, otd1463@rupto.ru

Введение. В условиях новой экономики результаты интеллектуального труда, особенно новейшие передовые технологии, становятся главным ресурсом развития, как отдельного предприятия, так и государства в целом. Интересы ведущих компаний мира лежат в области ускоренного роста знаний, особенно обеспеченных правами собственности. Следовательно, именно наличие прав на знания, то есть на результаты интеллектуальной деятельности, способствует появлению жесткой конкуренции. В связи с этим процесс получения и защиты исключительных прав в сфере интеллектуальной собственности является актуальной задачей для развития нашей экономики. В настоящий момент человеческие эмбриональные клетки находятся в центре внимания исследований из-за их способности к самообновлению и возможности использования в медицинских целях, в том числе при терапии различных заболеваний. В то же время данные исследования порождают споры об этичности использования эмбрионов или эмбриональных клеток в терапии. В законодательствах различных стран используются отличные друг от друга подходы в патентовании данных изобретений. Изобретения с использованием человеческих эмбрионов и эмбриональных клеток в коммерческих целях не могут быть объектами патентных прав в России (Пункт 4 статья 1349 IV Часть Гражданского Кодекса Российской Федерации), Европе (Directive 98/44/EC of the European Parliament and of the Council of 6 July 1998 on the legal protection of biotechnological inventions, Article 6(2)(c)) и странах СНГ- участницах Евразийской патентной организации (Пункт 4 Правило 3 Глава 2 Патентной инструкции к Евразийской патентной конвенции). Согласно закону США, человеческие эмбриональные клетки могут быть объектом патентования, поскольку объектом патента является «любой новый и полезный процесс, машина, производство или состав материала, либо любое новое и полезное их усовершенствование» (Title 35 of the United States Code §101. Inventions patentable, 1952). Таким образом перед патентным правом ставится вопрос о возможности патентования и

границах допустимости патентования объектов, включающих использование эмбрионов и эмбриональных клеток.

Цель. Исследование методологических подходов при рассмотрении изобретений, использующих эмбрионы и эмбриональные клетки человека, на основе сравнительного анализа методологических подходов при рассмотрении данных изобретений в четырех патентных ведомствах: Российского патентного ведомства - Роспатента, Европейского патентного ведомства (ЕПВ), Евразийского патентного ведомства (ЕАПВ) и Патентного ведомства США (USPTO).

Материалы и методы. Проведено изучение ситуации по охране изобретений, использующих эмбрионы и эмбриональные клетки человека методом комплексного и системного подхода с учетом возможности анализа статистического материала Роспатента, ЕПВ, ЕАПВ и USPTO в целом и в динамике по годам. Проведен анализ: изобретательской активности в России, Европе, Евразии и США за 2005 – 2019 гг. в области патентования данных изобретений, и существующие решения Роспатента, ЕПВ, ЕАПВ и USPTO.

Результаты. Анализ патентной активности в области патентования данных изобретений в Роспатенте, ЕПВ, ЕАПВ и USPTO показал, что процент заявок по эмбрионам и эмбриональным клеткам от общего количества поданных заявок в период с 2005 по 2019 гг. в среднем, составляет: 0,3 % - в Роспатенте, 0,3 % - в ЕПВ, 0,2 % - в ЕАПВ, 0,1 % - в USPTO. В Роспатенте максимальное количество заявок по эмбрионам и эмбриональным клеткам приходится на 2014 год, в ЕПВ – на 2018 год, в ЕАПВ – на 2019 год, а в USPTO на 2010 год. При этом суммарное количество заявок по тематике эмбрионов и эмбриональных клеток, поданных в период с 2005 по 2019 гг. в USPTO примерно в 3 раза больше, а в ЕПВ – примерно в 4 раза больше, чем в Роспатент (1543 заявок подано в Роспатент, 109 - в ЕАПВ, 7076 - в ЕПВ, 4719 - в USPTO).

Заключение. Анализируя представленные данные, можно отметить, что существует определенный интерес к патентованию данных объектов с целью защиты своих исключительных прав. В Роспатенте, ЕПВ, ЕАПВ и USPTO существует возможность подачи заявок на изобретения, использующие эмбрионы и эмбриональные клетки. В настоящее время с точки зрения патентования объектов интеллектуальной собственности данная отрасль биотехнологии, развивается, преимущественно, в США и Европе, а также неуклонно растет в России. Необходимо определить ограничения, накладываемые патентным правом на возможность патентования данных объектов. В дальнейшем будет разработан методологический подход по экспертизе заявок на изобретения, использующие эмбрионы и эмбриональные клетки человека, а также представлены соответствующие проекты документов для предложений по внесению изменений в нормативные документы РФ.

**ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ СКЕЛЕТНОЙ
МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ НИЖНИХ
КОНЕЧНОСТЕЙ ПОСЛЕ ГЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО АНГИОГЕНЕЗА**

Мавликеев М.О.¹, Плотников М.В.^{2,3}, Максимов А.В.^{2,3}, Гумерова А.А.⁴, Киясов А.П.⁴,

Деев Р.В.^{1,5}

¹*ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.*

Мечникова, Санкт-Петербург, mmavlikeev@gmail.com

²*ГАУЗ «Республиканская клиническая больница», Казань*

³*КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО, Казань*

⁴*ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань*

⁵*ПАО «Институт стволовых клеток человека», Москва*

**REGENERATION OF STRIATED SKELETAL MUSCLE TISSUE IN PATIENTS
WITH PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE AFTER GENE INDUCED ANGIOGENESIS**

Mavlikeev M.O.¹, Plotnikov M.V.^{2,3}, Maksimov A.V.^{2,3}, Gumerova A.A.⁴, Kiyasov A.P.⁴,

Deev R.V.^{1,5}

¹*North-Western State Medical University named after I.I.Mechnikov, Saint-*

Petersburg, mmavlikeev@gmail.com

²*Republic Clinical Hospital, Kazan*

³*Kazan State Medical Academy, Kazan*

⁴*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan*

⁵*Human Stem Cells Institute, Moscow*

Введение. Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей сопровождаются прогрессирующей хронической ишемией скелетных мышц, формированием критической ишемией нижних конечностей, способствующей инвалидизации и смерти. Возможности открытой и эндоваскулярной хирургической реваскуляризации на поздних стадиях ограничиваются малым диаметром вовлекаемых в патологический процесс кровеносных сосудов. Это диктует необходимость разработки методов непрямо́й реваскуляризации, ведущим направлением в этой области является ген-индуцированный ангиогенез. Важным аспектом является патогенетическое обоснование механизмов лечебного эффекта генной терапии. *Цель исследования* – изучить особенности регенерации поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей после ген-индуцированного ангиогенеза.

Материал и методы. Шести пациентам (степень ишемии IIб–III по А.В. Покровскому – Фонтейну) произведены согласно инструкции по применению две внутримышечные

инъекции плазмиды (препарат «Неоваскулген», РУ ЛП-000671 от 28.09.2011). Помимо клинического обследования, производили патогистологическое исследование биоптатов мышц пораженной конечности до и через 3 мес. после генной терапии.

Результаты и обсуждение. У всех пациентов отмечено увеличение дистанции безболевого ходьбы по результатам тредмил-теста к 3-му месяцу наблюдения в среднем на 31,74% (с $94,96 \pm 49,79$ м до $139,11 \pm 60,78$ м, $p < 0,05$). При изучении первичных биоптатов у 2-х пациентов наблюдалась достаточно высокая капиллярная плотность ($2,17 \pm 0,46$), относительно невысокий уровень фиброза ($11,85 \pm 6,83\%$) и пролиферации (не более 25% PCNA⁺ ядер, локализованных в основном в стенке сосудов). У данных пациентов в повторных биоптатах плотность капилляров статистически значимо не изменилась (с $2,17 \pm 0,46$ до $1,98 \pm 0,79$, $p = 0,68$), как и площадь соединительной ткани ($11,85 \pm 6,83\%$ против $9,51 \pm 3,37\%$, $p = 0,75$). При этом отмечено увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон с $1459,7 \pm 1034,5$ мкм² до $2259,5 \pm 1331,75$ мкм² ($p < 0,05$) и количества PCNA⁺ ядер в мышечных волокнах (МВ) (до 75% от общего числа ядер), что является признаком гипертрофии МВ и сопровождалось появлением в повторных биоптатах молодых МВ с миогенин⁺ ядрами. У 4-х пациентов с исходно сниженной капиллярной плотностью ($1,40 \pm 0,36$) и более выраженным фиброзом ($17,18 \pm 5,87\%$) в повторных биоптатах установлено значительное увеличение плотности капиллярной сети с $1,40 \pm 0,36$ до $3,03 \pm 0,82$ ($p < 0,05$) снижение доли соединительной ткани с $17,18 \pm 5,87\%$ до $12,62 \pm 5,2\%$ ($p < 0,05$) увеличение средней площади поперечного сечения мышечных волокон с $1282,42 \pm 857,37$ мкм² до $2323,46 \pm 1237,58$ мкм², $p < 0,05$. МВ в повторных биоптатах были более мноморфны по форме и размерам, доля PCNA⁺ достигала 25–50%, но не отличалась в биоптатах до и после терапии. Окрашивание с антителами к миогенину в биоптатах до и после терапии выявило единичные миогенин⁺ клетки в интерстиции.

Заключение. Регенерация поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей после генной терапии зависит от исходной капиллярной плотности и уровня фиброза, интенсивность репаративного рабдомиогистогенеза выше при исходно сохранной структуре скелетной мышечной ткани. Ген-индуцированный ангиогенез способствует активации регенерации скелетной мышечной ткани путем нормализации трофики и стимуляции гипертрофии МВ и образования молодых МВ, препятствуя прогрессированию фиброза.

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ**

Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю.

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

**PATHOGENETIC JUSTIFICATION OF STEM CELLS APPLICATION FOR
RESTORING THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE LIVER AFTER PARTIAL
HEPATECTOMY**

Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu.

Ural State Medical University, Institute of Medical Cell Technologies

Введение. Полученные в последние годы данные использования клеточных технологий продемонстрировали многообещающие результаты в отношении активации регенерации печени после ее повреждения. Перспективным в этом отношении является использование сочетанной трансплантации двух видов клеток: мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и перисинусоидальных клеток печени (клетки Ито, звездчатые клетки печени). Введение ММСК обеспечивает «защиту» перисинусоидальных клеток печени (ПКП) от иммунной системы реципиента, предотвращая развитие иммунологических конфликтов. Это достигается за счет иммуносупрессивных свойств ММСК. ПКП в свою очередь обеспечивают выработку факторов роста, ремоделирование внеклеточного матрикса.

Целью настоящего исследования стало изучение влияния сочетанной трансплантации ММСК и ПКП на восстановление морфофункционального состояния печени после частичной гепатэктомии.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на белых мышах-самцах возраста 7-8 месяцев, массой 20-23 г. Производилось выделение культуры ММСК из хориона плаценты мышей-самок. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа. Идентификация ММСК проводилась иммуноцитохимическим методом с использованием набора Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США), содержащего позитивные (антитела к integrin $\beta 1$, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45). Изучение функциональных свойств выделенных клеток было проведено путем направленной дифференцировки полученной культуры в направлениях, характерных для ММСК - в адипоцитарном и остеогенном. Выделение ПКП осуществлялось методом коллагеназно-проназной перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза. Введение ПКП

проводилось сразу после выделения клеток. Идентификация ПКП была проведена на проточном цитометре Beckman Coulter Navios путем оценки эндогенной ретиноидной флуоресценции ЗКП. Животным опытной группы внутривенно вводились ММСК и ПКП соответственно в дозе 4 млн. клеток/кг и 9 млн. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным контрольной группы вводили 0,9 % раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после частичной гепатэктомии однократно. Резекция 2/3 печени у лабораторных мышей выполнена по методике С. Mitchell и Н. Willenbring. Исследовалось влияние сочетанной трансплантации ММСК и ПКП на биохимические показатели периферической крови и морфометрические показатели печени на 7 сутки после частичной гепатэктомии. Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на 1 мм², площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм², митотический индекс (МИ), апоптотический индекс (АИ). Митотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии митоза к общему числу подсчитанных гепатоцитов. Верификация выраженности апоптоза осуществлялась с использованием метода AporTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) (Millipore, США). Апоптотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу подсчитанных гепатоцитов. Изучались следующие биохимические показатели: общий белок, альбумин, мочевины, общий билирубин, аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ).

Результаты исследования. При анализе морфометрических показателей мышей на 7 сутки после частичной гепатэктомии на фоне введения ММСК и ПКП отмечается снижение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов, увеличение количества двуядерных гепатоцитов, повышение размеров ядра, возрастание ЯЦИ. Также выявлено повышение митотической активности на 28,6%, что привело к восстановлению массы печени. При анализе биохимических показателей крови на фоне введения ММСК и ПКП отмечено повышение содержания общего белка, альбумина. Также отмечено повышение мочевины, снижение уровня ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ) и холестаза (щелочная фосфатаза). В проведенных исследованиях установлено повышение фактора роста гепатоцитов на 57,8 %.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о способности сочетанной трансплантации ММСК и ПКП восстанавливать морфофункциональное состояние печени после ее частичной гепатэктомии. Способностью ПКП к выработке факторов роста, в том числе фактора роста гепатоцитов можно объяснить восстановление массы печени, нормализацию белковосинтетической функции. Способность

ММСК к выработке спектра противовоспалительных цитокинов обеспечивает восстановление уровня ферментов, характеризующих цитолиз и холестаза.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МАТРИКС-АССОЦИИРОВАННЫХ ПРОТЕАЗ И ИХ АКТИВНОСТЬ В МСК ПРИ «ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ» ГИПОКСИИ *IN VITRO*

Матвеева Д.К., Якубец Д.А.

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва,

matveeva.dajana@yandex.ru

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF MATRIX-ASSOCIATED PROTEASE GENES AND IT ACTIVITY IN MSCS DURING "PHYSIOLOGICAL" HYPOXIA *IN VITRO*

Matveeva D.K., Yakubets D.A.

Institute of Biomedical Problems of Russian Academy of Sciences, Moscow,

matveeva.dajana@yandex.ru

Введение. Внеклеточный матрикс (ВКМ) является важной составляющей микроокружения стволовых клеток, в том числе мезенхимальных стромальных предшественников (МСК). «Физиологическая» гипоксия, как один из компонентов ниши МСК, определяет поведение клеток и направляет ремоделирование ВКМ. Динамичность ВКМ обеспечивается за счёт синтеза клетками внеклеточных матриксных протеаз и их ингибиторов в ответ на различные сигналы. Полученные нами ранее данные о различиях в структуре ВКМ, занимающего пространство под монослоем клеток при 20% (нормоксия) и при 5% O₂ («физиологическая» гипоксия), могут являться результатом O₂-регулируемого функционирования протеаз. Целью нашей работы было оценить экспрессию генов и активность матрикс-ассоциированных протеаз при 5% O₂ по сравнению с 20% O₂.

Материалы и методы. МСК выделяли из жировой ткани человека и постоянно культивировали при 20% или 5% O₂. Для анализа использовали МСК на 3-5 пассажах. Экспрессию генов основных матрикс-ассоциированных протеаз изучали с помощью полногеномного анализа (набор HumanRef-8) и количественного ПЦР. Для определения ферментативной активности использовали кондиционированную среду от МСК после 14 дней культивирования с добавлением компонентов, стимулирующих продукцию ВКМ. Анализ проводили, используя SensoLyte 520 Generic MMP Assay Kit.

Результаты. МСК синтезируют широкий спектр протеаз, опосредующих ремоделирование окружающего ВКМ. По результатам проведенного полногеномного анализа экспрессия генов ряда протеолитических ферментов и их ингибиторов в МСК при 5% по сравнению с 20% O₂ изменялась. Было отмечено снижение экспрессии *MMP1*, *MMP23*,

ADAM19, ADAMTS1, TIMP3 и увеличение *MMP2, MMP3, ADAM23, PLAU*. При этом количественно с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени подтверждено увеличение транскрипции *MMP2, PLAU* и снижение *MMP1, TIMP3*. Увеличение экспрессии при 5% O₂ матриксных металлопротеиназ *MMP2, MMP7, MMP9*, ферментативно расщепляющих белки базальной мембраны и интерстициальные неколлагеновые белки, а также *PLAU* (урокиназного активатора плазминогена), который может активировать матриксные металлопротеиназы, указывает на потенциал к увеличению деградации ВКМ и облегчению миграции МСК. Согласно данным базы NuroxiaDB, матрикс-ассоциированные протеазы (матриксные металлопротеиназы, адамализины и урокиназа), экспрессия генов которых изменилась в условиях «физиологической» гипоксии, являются гипоксия-зависимыми.

Оценка ферментативной активности матрикс-ассоциированных протеаз выявила сниженную активность *MMP1, MMP2, MMP9* при 5% O₂ по сравнению с 20% O₂. Скорость расщепления субстрата в среднем была увеличена у МСК при 20% O₂ более чем в 1,5 раза.

Заключение. Полученные результаты в сочетании с предыдущими данными о сниженной экспрессии генов, кодирующих как структурные компоненты, так ВКМ-ассоциированные молекулы, могут объясняться преобладанием при «физиологической» гипоксии пролиферативной функции в МСК, по сравнению с продукцией ВКМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ 19-015-00150.

**КОМПЛЕКСНАЯ ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННАЯ ФАРМКОРРЕКЦИЯ
РЕГЕНЕРАТИВНЫХ И ДЕСТРУКТИВНЫХ ЯВЛЕНИЙ У ФОРМЕННЫХ
ЭЛЕМЕНТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИХ СТАРЕНИИ В УСЛОВИЯХ
ИНКУБАЦИИ IN VITRO**

^{1,2} Мещанинов В.Н., ^{1,2}Щербаков Д.Л., ^{1,2}Гаврилов И.В., ^{1,2}Варлашов Е.М., ^{1,2}Лукаш В.А.

¹ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург

²ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург

mv-02@yandex.ru

**COMPLEX INDIVIDUALIZED PHARMCORRECTION OF REGENERATIVE AND
DESTRUCTIVE MANIFESTATIONS IN PERIPHERAL BLOOD FORM ELEMENTS
DURING THEIR AGING UNDER THE CONDITIONS OF THE IN VITRO INCUBATION**

^{1,2}Meshchaninov V.N., ^{1,2}Shcherbakov D.L., ^{1,2}Gavrilov I.V., ^{1,2}Varlashov E.M., ^{1,2}Lukash V.A.

¹Ural state medical University, Yekaterinburg, ²Institute for medical cell technologies,

Yekaterinburg mv-02@yandex.ru

Введение. Фармкоррекция, включая комплексную, позволяет контролировать регенеративные и деструктивные проявления у форменных элементов периферической крови после ее заготовки, что имеет практическое значение для гемотрансфузиологии, травматологии, геронтологии. К фармкорректорам широкого спектра действия можно отнести регуляторные олигопептиды, механизм действия которых заключается в селективном связывании с ДНК ядра клетки с активацией генов дифференцировки, пролиферации и апоптоза [Хавинсон В.Х. с соавт., 2016]. Ранее было показано, что комплексное применение олигопептидов взаимно увеличивало эффективность их действия и повышало регенераторный потенциал организма, связанный с ростом в периферической крови количества CD34+ прогениторных клеток [Мещанинов В.Н. и др., 2014–2020].

Цель исследования – оценка влияния регуляторных олигопептидов пинеалона, везугена и кристагена на регенеративные и деструктивные морфологические проявления в крови при её хранении in vitro, активирующей процессы старения клеток и адаптации к нему.

Материалы и методы. Для оценки гематологических показателей были исследованы образцы крови от 47 практически здоровых доноров в возрасте 30-59 лет обоего пола, стабилизированной ЭДТА, с конечной концентрацией пинеалона (глу-асп-арг), везугена (лиз-глу-асп) и кристагена (про-глу-асп) 20 мкг/мл (хим.-биол. объединение при РАН «Фирма Вита», С.-Пб) в динамике инкубации in vitro как модели ускоренного старения клетки (5 град. С, 0-24-48 часов). Контроль - образцы крови с ЭДТА без олигопептидов. Для оценки динамики изменений качества и количества форменных элементов был использован 18-

параметровый гематологический анализатор. Результаты обрабатывались методами непараметрической статистики.

Результаты и обсуждение. При инкубации крови наблюдалось уменьшение количества эритроцитов на 30% ($p < 0,05$), тромбоцитов - на 80% ($p < 0,05$), что сопровождалось уменьшением гематокрита на 38% ($p < 0,05$), тромбокрита на 75% ($p < 0,05$). При этом в крови увеличивалось содержание деформированных эритроцитов на 30% ($p < 0,05$). Изменения тромбоцитов в крови при хранении *in vitro* сопровождалось увеличением объема клеток на 35% ($p < 0,05$), появлением деформированных клеток. Использование везугена приводило к коррекции изменений, происходящих в крови при её хранении: он тормозил снижение количества эритроцитов на 10% ($p < 0,05$), тромбоцитов на 20% ($p < 0,05$), величины гематокрита на 15% ($p < 0,05$), тромбокрита на 20% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными биообразцами крови. Добавление пинеалона в пробы крови при её хранении также препятствовало уменьшению количества эритроцитов. Гетерогенность эритроцитов, величина гематокрита и количество эритроцитов оставались в пределах референсных значений по сравнению с контролем, что демонстрировало цитопротекторное действие пинеалона. Влияние пинеалона на тромбоциты было не значительно, но сохраняло их количество, показывая повышенную резистентность тромбоцитов по сравнению с контрольными биообразцами крови. Пинеалон и кристаген способствовали большей сохранности количества лимфоцитов и лейкоцитов крови. В присутствии кристагена количество лейкоцитов оставалось больше на 7% ($p < 0,05$), лимфоцитов на - 12% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Выявлено увеличение показателя Mid («средние клетки» или суммарно моноциты, эозинофилы, базофилы и прогениторные клетки крови). Кристаген увеличивал Mid до 90% ($p < 0,05$), что связали с активацией пролиферации клеток-предшественников, как проявление созревания этих клеток. *Заключение.* Хранение крови *in vitro* сопровождалось изменением числа клеточных элементов, выразившимся в снижении количества эритроцитов и тромбоцитов, вероятно, вследствие их разрушения, приводящих к нарушению их функций в крови. Везуген и пинеалон увеличивали резистентность эритроцитов и тромбоцитов к факторам, вызывающим уменьшение количества клеток крови при её хранении. Пинеалон и кристаген препятствовали уменьшению количества лимфоцитов и лейкоцитов крови при её хранении, что связано с индивидуализированным регуляторным влиянием олигопептидов на увеличение резистентности этих клеток и, возможно, с активацией пролиферации и созревания их прогениторных клеток-предшественников. Подход к оптимизации консервации клеток в цельной крови при хранении должен быть клеточно-индивидуализированным и фармакологически комплексным.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России на 2021 г. № 056-00054-21-00 от 17.12.2020 г. тема: «Индивидуализация подбора комплексной геропротективной терапии».

**ИНДУКЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО СПРАУТИНГА В ЗОНЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ
СПИННОГО МОЗГА
В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ**

Михайлова М.М.¹, Пальцев М.А.², Пантелеев А.А.¹

¹НИЦ Курчатовский Институт, Москва, a.a.pantel@gmail.com

²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

**SPINAL CORD DAMAGE-DRIVEN INDUCTION OF ENDOTHELIAL SPROUTING
IN ORGANOTYPIC MODEL**

Mikhailova M.M.¹, M.M., Paltsev M.A.², Panteleyev A.A.¹

¹National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, a.a.pantel@gmail.com

²Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow

Введение. Возобновление нормального кровоснабжения спинного мозга после травмы способствует восстановлению его функций, однако механизмы, контролируемые ангиогенез в зоне повреждения спинного мозга, остаются неясными. *Цель исследования* – выявление молекулярных факторов, влияющих на спраутинг эндотелия в зоне повреждения спинного мозга на основе использования оригинальной органотипической (*ex vivo*) модели.

Материалы и методы. Спинной мозг (продольные срезы) и фрагменты аорты были получены из новорождённых (1-5 дней) мышей линии C57BL/6J. Фрагменты аорты помещались в зону повреждения спинного мозга (поперечное рассечение) и поддерживались в виде органотипической ко-культуры на вставках из PTFE 5-7 дней. Нейроны, а также эндотелиальные и гладкомышечные клетки, мигрирующие из стенки аорты, визуализировали с помощью иммунофлуоресценции. Про- и антиангиогенные белковые факторы, влияющие на спраутинг аорты, идентифицировали используя протеомный анализ культивированных тканей. Анализ экспрессии отдельных генов (уровень мРНК) определяли методом ПЦР в реальном времени.

Результаты и обсуждение. В процессе работы была разработана *ex-vivo* модель (ко-культура спинного мозга и аорты), позволяющая изучать взаимодействие повреждённой нервной ткани с эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Показано, что культивирование аорты в зоне рассечения спинного мозга индуцирует активный спраутинг аорты, в то время как при отдельном культивировании аорты в идентичных культуральных

условиях, либо при расположении аорты рядом со срезом, но вне зоны повреждения – спраутинг отсутствует. Индуцируемая присутствием повреждённого спинного мозга миграция эндотелиальных клеток всегда наблюдалась в зоне миграции других клеток сосудистой стенки – гладкомышечных. Также обнаружено, что при культивировании аорты в зоне рассечения спинного мозга эндотелиальные клетки мигрируют только в области, свободной от нервной ткани, и не проникают в спинной мозг. Таким образом, ткань спинного мозга индуцирует спраутинг, но является фактором негативного таксиса для мигрирующих эндотелиальных клеток. Добавление про-ангиогенного фактора VEGF-A меняет направление миграции эндотелиальных клеток и способствует их проникновению в спинной мозг. С помощью ПЦР в реальном времени показано наличие в ткани спинного мозга мРНК растворимой формы рецептора к VEGF - sFlt1. На основании этих данных выдвинуто предположение, что наличие этого фактора препятствует миграции эндотелиальных клеток аорты в спинной мозг. Добавление избыточного количества экзогенного VEGF-A связывает sFlt1, подавляя его отрицательное воздействие на направление миграции эндотелиальных клеток. С помощью протеомного анализа в культуре обнаружены проангиогенные белки: aFGF, bFGF, Osteopontin, TF, IGFBP2, SDF1, а также подавляющий ангиогенез белок эндостатин.

Заключение. Создана модель, позволяющая изучать молекулярные факторы, влияющие на ангиогенез в поврежденном спинном мозге. С использованием разработанной *ex-vivo* модели показано, что ткань спинного мозга индуцирует спраутинг фрагментов аорты, расположенных в зоне повреждения срезов, вероятно, через изменение баланса активности факторов поддерживающих и подавляющих ангиогенез. Среди факторов, потенциально участвующих в регуляции этого процесса, по нашим данным могут быть aFGF, bFGF, Osteopontin, TF, IGFBP2, SDF1 (проангиогенные) и эндостатин (антиангиогенный). Направление миграции эндотелиальных клеток аорты зависит от уровня активности в ткани спинного мозга фактора sFlt1. Эта активность может модулироваться с помощью экзогенного VEGF-A. Разработанная органотипическая модель является эффективным инструментом исследования взаимодействия нервной ткани и сосудов при повреждении спинного мозга и в процессе восстановления его функциональности (регенерации).

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 19-015-00306А и внутренним грантом Курчатовского института.

**ВЛИЯНИЕ ОРИЕНТАЦИИ ВОЛОКОН РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА
НА РОСТ АКСОНОВ ДОРСАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ И МИГРАЦИЮ КЛЕТОК АОРТЫ
В ТКАНЕВОЙ МОДЕЛИ *EX VIVO***

Михайлова М.М.¹, Сидорук К.В.^{1,2}, Давыдова Л.И.^{1,2}, Богуш В.Г.^{1,2}, Пантелеев А.А.¹

¹НИЦ Курчатовский Институт, Москва, a.a.pantel@gmail.com

²НИЦ Курчатовский Институт- ГосНИИгенетика, Москва

**ORIENTATION OF RECOMBINANT SPIDROIN FIBERS AS A FACTOR
AFFECTING AXONAL GROWTH OF DORSAL ROOT GANGLIA NEURONS AND
MIGRATION OF AORTIC CELLS IN ORGANOTYPIC CULTURE MODEL**

Mikhailova M.M.¹, Sidoruk K.V.^{1,2}, Davydova L.I.^{1,2}, Bogush V.G.^{1,2}, Panteleyev A.A.¹

¹National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, a.a.pantel@gmail.com

²National Research Center Kurchatov Institute – GosNIIGenetika, Moscow

Введение. Хотя периферические нервы сохраняют определённую способность к регенерации, при разрывах больше 2 см восстановление их функциональности требует подшивания «проводников», изготавливаемых из биосовместимых материалов. Как правило, для этих целей используют материалы на основе коллагена I типа. Эффективность регенерации периферических нервов в значительной степени зависит от их направленного роста, который может быть стимулирован использованием материалов с направленной ориентацией волокон, полученных, например, методом электроспиннинга. Коллаген плохо поддается электроформованию, что обуславливает необходимость поиска альтернативных материалов. Наряду с коллагеном в качестве матричной основы для регенерации периферических нервов используют рекомбинантный спидроин, однако характер влияния ориентированного нетканого спидроинового матрикса на рост аксонов периферических нервов остаётся неисследованным.

Цель исследования – оценить влияние ориентации волокон матриксов на основе рекомбинантного спидроина на рост нейрональных аксонов дорсальных ганглиев, а также на миграцию эндотелиальных и гладкомышечных клеток аорты.

Материалы и методы. Дорсальные ганглии и фрагменты аорты были получены из новорождённых (1-5 дней) мышей линии C57BL/6J. Образцы тканей помещались в культуральной среде на следующие типы подложек: 1) на культуральные вставки, покрытые рекомбинантным спидроином rS1/9 или коллагеном I типа; 2) на неориентированный матрикс, полученный электроспиннингом, и состоящий из спидроинов rS1/9 и rS2/12 и поликапролактона (ПКЛ) (5:5:1); 3) на ориентированный матрикс такого же состава. Активность роста аксонов и миграцию клеток оценивали с помощью иммунофлуоресценции.

Для этого в программе Image J вычисляли площадь, занятую аксонами (маркер аксонов - бетаIII-тубулин) или мигрирующими клетками (маркер эндотелиальных клеток - CD31, маркер гладкомышечных клеток - α SMA, маркер Шванновских клеток – Sox 10), а также определяли среднюю длину самого длинного аксона в отдельном ганглии.

Результаты и обсуждение. Полученные данные показали, что спидроин rS1/9, так же как и коллаген I типа, поддерживает рост нейрональных аксонов ганглиев на культуральных вставках: площадь, занятая аксонами не отличается у этих образцов. Кроме того, на вставках, покрытых коллагеном I типа, так же как и на вставках, покрытых спидроином rS1/9, идет активная миграция Шванновских клеток. На обоих типах вставок наблюдается активная миграция гладкомышечных и эндотелиальных клеток аорты. Стоит отметить, что на вставках, покрытых поли-D-лизином, отсутствует спраутинг аорты, а из ганглиев прорастают только единичные аксоны. По уровню роста аксонов и миграции Шванновских клеток неориентированный матрикс на основе двух спидроинов и ПКЛ не отличается от вставок, покрытых спидроином rS1/9. Однако направленность матрикса значительно ускоряет рост аксонов: средний размер самого длинного аксона на ориентированном образце в два раза превышает длину аксона на неориентированном образце того же состава (2324 ± 191 мкм и 1144 ± 247 мкм, соответственно). На ориентированном матриксе аксоны растут строго в направлении волокон; в этом же направлении мигрируют Шванновские клетки. В отличие от аксонов и Шванновских клеток, миграция гладкомышечных и эндотелиальных клеток аорты на ориентированных матриксах носит более хаотичный характер: наблюдается миграция отдельных клеток в направлениях, отличающихся от направления волокон.

Заключение. Рекомбинантные спидроины поддерживают рост аксонов дорсальных ганглиев и миграцию Шванновских клеток, а также миграцию эндотелиальных и гладкомышечных клеток аорты. Направленность волокон матрикса в два раза ускоряет рост аксонов по сравнению с неориентированными образцами. Направление роста аксонов и миграции Шванновских клеток на ориентированном матриксе совпадает с направлением волокон, в то время как направление миграции гладкомышечных и эндотелиальных клеток аорты имеет менее организованный характер. Таким образом, ориентированные матриксы из рекомбинантного спидроина могут служить эффективными проводниками при регенерации периферических нервов, поскольку поддерживают не только рост аксонов и миграцию Шванновских клеток, но и миграцию гладкомышечных и эндотелиальных клеток.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 18-29-17071 мк и внутренним грантом НИЦ Курчатовский институт.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ
КУЛЬТУР РАЗНЫХ ПОДТИПОВ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Могиленских А.С.^{1,2}, Шамишурина Е.О.¹, Гребенюк Е.В.², Сазонов С.В.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава

России, Екатеринбург; annasajler@yandex.ru

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,

Екатеринбург

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PRIMARY CELL CULTURES OF
DIFFERENT SUBTYPES OF BREAST CARCINOMA**

Mogylenskikh A.S.^{1,2}, Shamshurina E.O.¹, Grebenyuk E.V.², Sazonov S.V.^{1,2}

¹ Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Yekaterinburg;

annasajler@yandex.ru

²GAUZ SO Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg

Введение. При отработке методик получения персонифицированных культур клеток рака молочной железы в культурах выявляется появление различных клеточных популяций, определяемых как морфологической гетерогенностью опухоли, так и условиями культивирования, характеризующимися изменением морфологических показателей клеток в культуре, изначальных характеристик опухоли, показателей жизнеспособности, чувствительности опухоли к химиотерапии. *Цель исследования* - изучение изменения клеток двух разных подтипов карциномы молочной железы при культивировании.

Материалы и методы. Для исследования использовали 4 образца биоптатов карциномы молочной железы. Иммуногистохимическое исследование проводилось в автостейнере «Ventana», USA.

Для проведения культивирования каждый образец измельчался до однородной массы и помещался в среду для диссоциации (4 мг/мл коллагеназы, 1 мг/мл гиалуронидазы, 0,1% трипсина, DMEM:F-12). После инкубирования при 37°C в течение 20 часов полученную массу каждого образца центрифугировали при 0, 7 RPM 30 секунд – получали 1 осадок. Супернатант переносили в другую пробирку и вновь центрифугировали при 0,2 RPM 3 минуты – получали 2 осадок. Далее каждый осадок ресуспендировали с трипсином и с раствором Хэнкса с 2% FBS(HF), центрифугировали 5 минут при 1,4 RPM, сливали надосадочную жидкость. Осадок растворяли в диспазе и ДНКазе в течение 1-2 минут до получения тягучей массы, смешивали с HF и центрифугировали при 1,4 RPM. Супернатант тразволили с полной средой Mammocult и и 5% FBS, клетки высаживали во флаконы,

предварительно покрытые коллагеном 1:45. На вторые сутки среду меняли на бессывороточную.

Контроль за состоянием культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100, Nikon при увеличении в 200 и 400 раз.

Результаты и обсуждение. Согласно результатам иммуногистохимического анализа, два образца опухоли отнесены к Luminal A – подтипу, два образца – к HER-2 гиперэкспрессированному (уровень экспрессии Ki-67 составил 30 и 40 соответственно). При микроскопическом исследовании культур образцов клеток опухолей Luminal A выявлено, что уже на 3 сутки в культурах 1 и 2 осадков во флаконах наряду с островками эпителиальных клеток определялись клетки веретеновидной и многоотростчатой формы. На 7 сутки исследования во флаконах увеличивалась площадь островков, формировался монослой, однако сохранялись и популяции фибробластоподобных клеток. В культурах обоих осадков клеток опухолей HER-2 подтипа на 3 сутки определялись также островки с плотно прилегающими друг к другу эпителиальными клетками и множество крупных, диаметром около 50 мкм, маммосфер. В течение последующих суток клетки мигрировали из маммосфер в культуру, и уже на 7 сутки исследования во флаконах присутствовали эпителиальные клетки, формирующие монослой, единичные мелкие маммосферы и отдельные клетки треугольной формы. При подсчёте количества клеток в 5 мл среды во флаконах с культурами клеток опухоли HER2 подтипа показатель составил $3,9 \times 10^5$, все клетки определяли эпителиальную природу, тогда как в культурах Luminal A подтипа этот показатель повысился до $5,6 \times 10^5$ за счёт большого количества веретеновидных и многоотростчатых клеток.

Заключение. Активный рост культуры клеток HER2 подтипа определяется высокой пролиферативной активностью эпителиальных клеток этих образцов опухолей, тогда как в культурах образцов опухолей Luminal A подтипа высока пролиферативная активность фибробластоподобных клеток.

Таким образом, при длительном культивировании клеток карциномы молочной железы с целью создания персонифицированных моделей необходимо учитывать морфологическую гетерогенность опухолей, влияющую на ряд биологических процессов в клетках, условия культивирования, состав культуральной среды, которые во многом определяют рост, изменение морфологических свойств, жизнеспособность культивируемых клеток.

**БИОДЕГРАДИРУЕМЫЙ ИМПЛАНТ FASETEM В АСПЕКТЕ
НЕОКОЛЛАГЕНОГЕНЕЗА**

Могильная Г.М.¹, Ковальчук Ю.В.²

ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет,

Краснодар, fomevg@mail.ru¹

ООО НЭО Промедтек, Москва, kovalchuk@promedtec.net²

**BIODEGRADABLE IMPLANT FASETEM IN THE ASPECT OF
NEOCOLLAGENOGENESIS**

Mogilnaya G.M.¹, Kovalchuk U.V.²

Kuban State Medical University, Krasnodar, fomevg@mail.ru¹

NEO promedtec, Moscow, kovalchuk@promedtec.net²

Введение. Обзор литературы свидетельствует, что среди филлеров, используемых в современной косметологии, хорошо себя зарекомендовали именно те импланты, в состав которых входят кристаллы гидроксиапатита (Zerbinati et al, 2018). Эффект названных филлеров связывают с их способностью к формированию каркаса, а затем и индукции процесса неоколлагеногенеза. В отношении нового дермального препарата Facetem, состоящего из микросфер с кристаллами гидроксиапатита кальция, вопрос о механизме коллагеногенеза изучен недостаточно. *Цель исследования* – изучить механизм биостимуляции коллагеногенеза с использованием препарата Facetem (Корея).

Материалы и методы. Объектом исследования послужили крысы-самцы (n=15), инъекцию филлера проводили субдермально. Забор материала спустя 1 месяц. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, по Массону и Ван-Гизону. Для характеристики фибриллярного компонента экстрацеллюлярного матрикса дермы использовали пикросириус красный (Dayan et al, 1989), а для типирования коллагенов – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к коллагену I и III типов (Abscam, Англия).

Результаты и обсуждение. При изучении микропрепаратов в окраске гематоксилином и эозином установлено, что спустя месяц имплант ограничен капсулой с достаточно большим числом упорядоченно расположенных коллагеновых волокон. Микросферы располагаются раздельно, и каждая из них окружена экстрацеллюлярным матриксом, который окрашивается оксифильно и местами вакуолизирован. При окраске по Маллори вокруг микросфер видны фибриллы, а местами – единичные уплощенные клетки. Кнаружи от микросфер и между ними располагаются мелкие клетки с округлыми гиперхромными ядрами, а также пучки коллагеновых волокон. При окраске по Массону и Ван Гизону

морфологическая структура импланта связана с типированием в нем микросфер, а также фибриллярного и аморфного компонентов. Клетки по морфологии могут быть отнесены к элементам фибробластического ряда.

При окраске пикросириусом красным с последующей поляризационной микроскопией на участке импланта различаются фибриллы, окружающие микросферы. По сути, здесь типированы стенки микросфер, образованные или окруженные фибриллами, формирующими достаточно широкие, короткие, переплетенные между собой пучки. Они обнаруживают сочетание красного и зеленого свечения в соотношении 3:2, что указывает на превалирование коллагена I типа. Встречаются микросферы, окруженные фибриллами только с красным свечением. Коллагеновые фибриллы в зоне между микросфер обнаруживают красно-желтое свечение с вкраплениями зеленых «штрихов» коллагена III типа, содержимое микросфер отсутствует.

При использовании антител к коллагену I типа в зоне импланта обнаружили уплощенные клетки, расположенные вокруг микросфер, как бы формирующие выстилку этих микросфер, иногда здесь типированы тонкие коллагеновые фибриллы с низким уровнем экспрессии коллагена I типа. В зоне под имплантом и над ним достаточно много отростчатых фибробластов с умеренным и даже высоким уровнем содержания проколлагена. При этом единичные клетки с очень высокой экспрессией коллагена лишены отростков, но они содержат интенсивно окрашенный секреторный продукт (проколлаген).

При избирательном выявлении коллагена III типа отчетливо видно, что зона импланта отличается слабым или умеренным уровнем экспрессии коллагена, а вот дерма вокруг импланта напротив увеличивает экспрессию коллагена, на что указывает появление большого числа фибробластов вокруг импланта и в зоне дермы под ним. Среди фибробластов типированы достаточно много клеток с большим числом отростков – это показатель их активации. При этом зона цитоплазмы и отростки заполнены коллагеном III, что указывает на высокий уровень его экспрессии. Вокруг фибробластов выявляется слабо и диффузно окрашенный экстрацеллюлярный матрикс. Соотношение коллагена I и III типов составляет 1:1.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что имплант Facetem стимулирует процесс пролиферации фибробластов в зоне дермы и синтез ими коллагена. Не исключено, что этот эффект является результатом динамического воздействия экстрацеллюлярного матрикса с изменением цитоскелета фибробласта и активацией неколлагеногенеза.

НЕЙРОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ СКАФФОЛДОВ ИЗ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ШЕЛКА *IN VITRO* И *IN VIVO*

Мойсенович М.М.¹, Силачев Д.Н.¹, Мойсенович А.М.¹, Архипова А.Ю.¹, Шайтан К.В.¹, Богуш В.Г.^{2,3}, Дебабов В.Г.^{2,3}, Давыдова Л.И.^{2,3}, Латанов А.В.¹, Певзнер И.Б.¹, Зорова Л.Д.¹, Бабенко В.А.¹, Плотников Е.Ю.¹, Зоров Д.Б.¹

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, a-moisenovich@mail.ru

² НИЦ Курчатовский Институт- ГосНИИГенетика, Москва

³ НИЦ Курчатовский Институт, Москва

NEUROGENIC ACTIVITY OF SCAFFOLDS FROM SILK STRUCTURAL PROTEINS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Moisenovich M.M.¹, Silachev D.N.¹, Moysenovich A.M.¹, Arkhipova A.Yu.¹, Shaitan K.V.¹, Bogush V.G.^{2,3}, Debabov V.G.^{2,3}, Davydova L.I.^{2,3}, Latanov A.V.¹, Pevzner I.B.¹, Zorova L.D.¹, Babenko V.A.¹, Plotnikov E.Y.¹, Zorov D.B.¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow

² National Research Center Kurchatov Institute, Moscow

³ National Research Center Kurchatov Institute – GosNIIgenetika, Moscow

Введение. Инсульт – третья по значимости причина смертности от болезней во всем мире, из них 80% всех случаев приходится на ишемический инсульт головного мозга. В настоящее время набор эффективных долгосрочных клинических методов лечения инсульта ограничен, так как лишь немногие из них приводят к полному функциональному восстановлению. Одной из перспективных стратегий, направленных на увеличение вероятности положительного прогноза при реабилитации после инсульта, является создание тканеинженерных трехмерных конструкций – скаффолдов. Некоторые материалы для изготовления скаффолдов могут обладать собственным нейрогенным потенциалом, обеспечивая структурную поддержку для миграции клеток и прорастания регенерирующих аксонов в самой зоне повреждения, а также генерировать хемотаксические сигналы для активации эндогенных прогениторных клеток в нейрогенных нишах мозга, таких как субвентрикулярная зона желудочков мозга и субгранулярная зона гиппокампа. Одним из таких материалов является рекомбинантный аналог спидроина 1 каркасной нити паутины паука *Nephila clavipes* (rS1/9), обладающий рядом свойств, в числе которых высокая биосовместимость, способность к биодеградации, положительный заряд, наличие NCAM-связывающих сигнальных последовательностей и высокая прочность, делающие его перспективным материалом для инженерии нервной ткани.

Материалы и методы. Для оценки влияния субстрата на основе rS1/9 на рост нейрональной сети и пролиферацию клеток *in vitro* были выделены первичные нейроны коры мозга и нестин-положительные клетки гиппокампа грызунов. Нейрогенный потенциал материала *in vitro* был оценен с применением методов иммунохимии и КЛСМ. Изучение влияния структурных белков шелка на активацию нейрогенных ниш при остром повреждении мозга было проведено на линии трансгенных репортерных мышей нестин-GFP. Было проведено количественное исследование GFP+, BrdU+ и CD 31+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа контра- и ипсилатеральных полушарий через 7 дней после фокальной ишемии.

Результаты и обсуждение. Введение микрочастиц рекомбинантного белка rS1/9 в область ишемического повреждения префронтальной коры приводило к увеличению скорости пролиферации и выживаемости клеток-предшественников в зубчатой извилине гиппокампа, которая функционирует как ниша стволовых клеток головного мозга, расположенных на удалении от зоны травмы. Инъекции суспензии rS1/9 также приводили к увеличению уровня митохондриального зонда в клетках зубчатой извилины, что может свидетельствовать об увеличенном количестве митохондрий и/или потенциале митохондриальной мембраны в клетках-предшественниках. По-видимому, стимуляция клеток-предшественников была вызвана биологически активными продуктами, возникающими в результате биодegradации rS1/9, которые, как было показано, могут влиять на рост первичных кортикальных нейронов, их адгезию, рост нейритов и формирование нейронной сети.

Заключение. Таким образом, в работе продемонстрирован нейрогенный потенциал скаффолдов на основе рекомбинантного спидроина *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, продемонстрирована возможность применения структурных белков шелка для тканевой инженерии тканей ЦНС.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 17-00-00359, включая, № 17-00 00356 и № 17-00-00358.

ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТА НА ПОВЕДЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Надеждин С.В., Маклаков Д.В., Коржева А.С.

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», nadezhdin@bsu.edu.ru

INFLUENCE OF THE SUBSTRATE ON THE BEHAVIOR OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Nadezhdin S.V., Maklakov D.V., Korzheva A.S.

Belgorod National Research University

Введение. В настоящее время основное внимание в области биологии клетки сосредоточено на поиске сигналов микросреды, которые способны управлять судьбой стволовой клетки. Поскольку клеточная микросреда содержит множество биохимических и биофизических сигналов, ключевой задачей является понимание того, какие из этих сигналов необходимы для управления формированием конкретной функциональной ткани. *Цель исследования* – изучение адгезии, пролиферации и дифференцировки мезенхимных стволовых клеток при культивировании на трехмерных полимерных матрицах обладающих остеоиндуктивным потенциалом.

Материалы и методы. Первичную культуру мезенхимных стволовых клеток (МСК) получали из бедренной и большеберцовой костей крысы. Питательной средой для культивирования МСК являлась DMEM/F12 с 10% ЭТС. Фенотипирование МСК выполняли с использованием: CD29, CD31, CD45, CD90, на проточном цитофлуориметре FACSCanto II, дополнительно проводили оценку адгезии клеток к пластику и способности дифференцировки МСК в остеогенном направлении. В качестве субстрата использовали трехмерные полимерные матрицы на основе сополимера поли-dl-лактид-со-гликолида без и с включением в состав фосфатов кальция (ПЛГ и ПЛГ-ФК, соответственно). С использованием растровой электронной и атомно-силовой микроскопии были определены параметры топографии поверхности полимерных матриц: размер пор, толщина волокон, шероховатость поверхности. Оценку адгезии, пролиферации и дифференцировки МСК проводили с использованием иммунофлуоресцентного метода при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования было установлено, что образцы композитной матрицы ПЛГ-ФК за счет большей шероховатости поверхности до 65 нм, развитой пористости от 1 до 100 мкм и наличия фосфатов кальция имеют лучшие адгезионные свойства по сравнению с образцами ПЛГ и обеспечивают эффективную

пролиферацию и дифференцировку МСК в остеогенном направлении не только на поверхности, но и в более глубоких слоях композитной матрицы. Так, в экспериментальной группе МСК, культивированных на матрицах ПЛГ-ФК, отмечается рост интенсивности флуоресценции внутриклеточного кальция, увеличивается экспрессия факторов транскрипции RUNX2 и Osterix, регистрируется экспрессия винкулина и β -катенина.

Таким образом, физические и химические свойства субстрата являются ключевыми факторами, которые будут специфично контролировать клеточные сигнальные системы и влиять на результат регенерации на тканевом уровне.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517X0164.

ОЦЕНКА ОСТЕОГЕННЫХ СВОЙСТВ ГЕН-АКТИВИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПЛАЗМИДЫ С ГЕНОМ *BMP2*

Недору́бова И.А.¹, Бухарова Т.Б.¹, Васильев А.В.^{1,2,3}, Сячина М.А.¹, Бромберг А.А.², Тагсими К.³, Григорьев Т.Е.⁴, Загоскин Ю.Д.⁴, Чвалун С.Н.⁴, Гольдштейн Д.В.^{1,3}

¹ФГБУ МГНЦ им. Н.П. Бочкова, Москва, nedorubova.ia@gmail.com

²ФГБУ НМИЦ «ЦНИИСиЧЛХ», Москва

³ФГАОУ ВО РУДН, Москва

⁴НИЦ «Курчатовский институт», Москва

EVALUATION OF OSTEOGENIC PROPERTIES OF GENE-ACTIVATED MATERIAL BASED ON CHITOSAN AND *BMP2* PLASMID

Nedorubova, I.A.¹, Bukharova, T.B.¹, Vasilyev, A.V.^{1,2,3}, Syachina, M.A.¹, Bromberg, A.A.², Taghsimi, K.³, Grigoriev, T.E.⁴, Zagoskin, Y.D.⁴, Chvalun, S.N.⁴, Goldshtein, D.V.^{1,3}

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, nedorubova.ia@gmail.com

²Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow

³Institute of Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

⁴NRC "Kurchatov Institute", Moscow

Введение. В настоящее время наиболее перспективным направлением разработки остеопластических материалов для регенерации костной ткани является использование ген-активированных материалов на основе плазмидных конструкций, несущих гены остеогенных факторов. Невирусные способы доставки генов исключают риск развития инсерционного мутагенеза и обеспечивают физиологические концентрации целевого белка, что делает их наиболее привлекательными для клинической медицины. Известным недостатком невирусной доставки является относительно низкая эффективность трансфекции клеток,

обусловленная низкой способностью плазмид проникать в клетки и их недостаточной концентрацией *in vivo*. Для решения этих задач в настоящей работе проведено сравнение эффективности двух трансфекционных агентов, TurboFect (TF) и Polyethylenimine (PEI) для доставки плазмид с геном *BMP2* в мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), являющиеся непосредственными участниками регенерации костной ткани. Для обеспечения высокой локальной концентрации плазмидных комплексов в области имплантации их импрегнировали в высокопористые полилактидные (PLA) гранулы, заключенные в хитозановый гидрогель. Цель исследования – разработать ген-активированный материал, импрегнированный плазмидными конструкциями с геном *BMP2*, для регенерации костной ткани.

Материалы и методы. Использовали плазмиды, несущие целевой ген *BMP2* (pcDNA3-BMP2 и TaqRFP-N-BMP2) и ген репортерного белка EGFP (pEGFP-C1). Для *in vitro* исследований ММСК трансфицировали катионными полимерами TF и PEI. Эффективность трансфекции оценивали методом флуоресцентной микроскопии по накоплению EGFP в клетках и с помощью проточной цитометрии. Цитотоксическое действие полиплексов исследовали методом МТТ-теста. Для оценки биосовместимости хитозановых матриц *in vitro* ММСК, окрашенные РКН-26, адгезировали на материалах, импрегнированных полиплексами с плазмидой с геном *EGFP*. Остеогенное действие полиплексов с плазмидами с геном *BMP2* и материалов, импрегнированных данными полиплексами, оценивали методом ПЦР-РВ и путем окрашивания ализариновым красным. Исследование биосовместимости и остеоиндуктивных свойств материалов *in vivo* проводили на самцах крыс линии Wistar при подкожной имплантации в область холки (модель гетеротопического остеогенеза). Через 28 сут. животных выводили из эксперимента, образцы некропсий фиксировали 10% раствором нейтрального формалина и заключали в парафин. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Массону с анилиновым синим.

Результаты и обсуждение. Результаты *in vitro* исследований показали, что TF эффективнее способствует проникновению плазмид в ММСК, чем PEI. Инкубация клеток с полиплексами 4 мкл/мл TF + 2 мкг/мл pEGFP-C1 в течение 1 ч обеспечивает наиболее эффективную трансфекцию и наименьшее цитотоксическое воздействие на ММСК. Трансфекция ММСК полиплексами с геном *BMP2* приводит к увеличению уровня экспрессии генов остеогенных маркеров *OCN*, *OPN* и *BMP2* и минерализации внеклеточного матрикса. *In vitro* были показаны биосовместимость и остеоиндуцирующее действие хитозановых материалов, импрегнированных полиплексами на ММСК. *In vivo* было показано, что хитозановый гидрогель с PLA-гранулами, импрегнированный полиплексами, не вызывает выраженного воспаления и способен инициировать неоosteогенез при

имплантации под кожу. В группах с введением высокой дозы полиплексов (1000 мкл/мл TF + 500 мкг/мл TaqRFP-N-BMP2) наблюдали очаги новообразованной костной ткани преимущественно внутри PLA-гранул, что свидетельствует о создании терапевтических концентраций плазмид внутри пористых частиц.

Заключение. Таким образом, получены ген-активированные материалы на основе плазмидных конструкций с геном *BMP2* и трансфекционного агента TF, импрегнированные в PLA и хитозановый гидрогель. Материалы оказывают выраженное остеиндуцирующее действие *in vitro* на ММСК и *in vivo* на моделях гетеротопического остеогенеза. Разработанные материалы могут стать эффективным решением для лечения костных дефектов.

Работа выполнена при поддержке госзадания для ФГБНУ «МГНЦ».

КЛЕТОЧНАЯ ПЛАЗМОТЕРАПИЯ: ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА L-PE

Неустроев Г.В., Неустроева Ю.Д.

*ФГБОУ ВО Московский государственный медицинский стоматологический
университет им. А.И.Евдокимова*

*ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический
институт им. М.Ф.Владимирского, germanneustroev@gmail.com*

THE CELL PLASMOTHERAPY: ACTIVE L-PE RECEIVING TECHNIQUE

Neustroev G.V., Neustroeva Ju.D.

*A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Moscow Regional Research and Clinical Institute*

germanneustroev@gmail.com

Введение. Для регенеративной медицины представляют интерес препараты плазмы, содержащие стимуляторы роста. Из инъекционных препаратов наибольшее значение имеют Plasmolifting, PRP, L-PRP, L-PE. Особенность последнего биопрепарата в том, что он содержит помимо тромбоцитарных и лейкоцитарных, еще и эритроцитарные ФР (факторы роста), а также обогащен blastными клетками (Неустроев и др., 2020). Четырех – кратное введение такого препарата пожилому пациенту с тяжелой степенью пародонтита привело к лабораторному и клиническому улучшению течения заболевания, однако подвижность зубов практически не уменьшилась. Одной из причин этого могло быть недостаточное количество введенных ФР и их быстрая инактивация. *Цель исследования.* Для повышения эффективности препарата L-PE необходимо перевести его из неактивной формы в активную.

Для этого были использованы те же принципы активации, которые применялись при активации препаратов PRP и L-PRP.

Материал и методы. Основные этапы нашей методики перевода L-PE в активную форму отработывались на 5 добровольцах и включали: 1. забор крови, 2. выделение при низкой температуре препарата L-PE, 3. смешивание L-PE с раствором CaCl₂ в стерильных флаконах, 4. выдерживание смеси при температуре 38 ° C до образования геля, 5. культивирование лейкоцитов в присутствии геля. В некоторых опытах изучали влияние температурного фактора на скорость образования геля. Для обнаружения ФР в гелесодержащих флаконах на полученный гель наслаивали L-PE, обогащенный бластами и зрелыми лейкоцитами, добавляли антибиотик и винбластин. Полученные смеси инкубировали 2 суток при температуре 37 C, наблюдали за бласттрансформацией клеток. В качестве контроля использовали флаконы, содержащие равные по объему количества L-PE и, следовательно, равные с опытом исходные количества ФР. Т.о., на бласттрансформацию клеток действовали ФР, находящиеся в геле (опыт) и ФР, содержащиеся в жидкой среде. После обработки мазков подсчитывали бласты в 50 полях зрения до и после инкубации.

Результаты и обсуждение. Получены следующие данные: в одной из контрольных партий после инкубации количество бластов увеличилось на 23%, а в опытной на 89%. Эти результаты позволяют предполагать о присутствии стимуляторов и в других контрольных и опытных партиях. Обнаруженные различия в стимуляции бласттрансформации связаны не с количеством ФР, сорбирующихся на нитях фибрина, как показано (Timmerman et al., 2016), а с увеличением периода их полужизни. Такие конъюгированные полимером молекулы ФР лучше сохраняются и благодаря этому будут длительно действовать на разные периоды клеточного цикла бластов и разные фазы воспаления (Chicharro-Alcavitorae et al., 2019), приводя к более выраженной пролиферации.

Заключение. Проведенные исследования показывают, что из инъекционной формы L-PE можно получить активный препарат L-PEF.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ МОНОГЕННЫХ ЭНДОКРИННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ИЗУЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ НА ОСНОВЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Панова А.В.^{1,2}, Куликова К.С.¹, Клементьева Н.В.¹, Тюльпачов А.Н.¹, Киселев С.Л.²

¹НМИЦ Эндокринологии, ²ИОГен РАН Москва

GENETIC CORRECTION OF MONOGENIC ENDOCRINE DISORDERS TO CREATE AN IPSC-BASED DISEASE MODEL

Aleksandra V Panova^{1,2}, Kristina S Kulikova¹, Natalia V Klementieva¹, Anatoly N

Tiulpakov¹, Sergey L Kiselev²

¹Endocrinology Research Center, Moscow, Russia

²Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

Введение. Многие эндокринные заболевания имеют моногенные формы, приводящие к врождённым нарушениям гормональной регуляции. Молекулярные механизмы патогенеза при этом остаются слабо изученными. Современные генетические технологии предоставляют возможности для изучения моногенных форм заболеваний. Мы использовали пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), дифференцированные в клетки эндокринной системы, подверженные патологии, для изучения молекулярных механизмов неонатального сахарного диабета и наследственного гиперпаратиреоза.

Материалы и методы. ИПСК получали из фибробластов кожи с помощью репрограммирования набором ReproRNA™-OKSGM - STEMCELL Technologies. Редактирование мутаций в генах проводили с помощью CRISPR-Cas9 системы на основе вектора GeneArt™ CRISPR Nuclease Vector with GFP Reporter Kit.

Результаты. Создана изогенная модель для изучения молекулярных механизмов дефицита инсулина при гетерозиготной мутации в интроне гена инсулина. Методом направленной дифференцировки ИПСК в инсулин-продуцирующие клетки пациента показано, что мутация приводит к появлению нового сплайс-варианта гена. В изогенной системе будет показано, что наличие сплайс-варианта приводит к преждевременной гибели бета-клеток. Для инсулин-продуцирующих клеток пациента с отредактированной мутацией показано отсутствие дополнительного сплайс-варианта гена инсулина, и они могут рассматриваться как клеточный продукт для терапии. Аналогичный подход использовался для моделирования тяжёлого неонатального гиперпаратиреоза, обусловленного мутациями в гене CASR, что приводит к повышенному уровню секреции паратиреоидного гормона.

Генетическое редактирование позволит получить пациент-специфичные клетки, которые будут иметь пониженный уровень секреции гормона, которые могут быть использованы для трансплантации при даже невысокой эффективности ИПСК в клетки парашитовидной железы.

Заключение. Используемые технологии позволяют создавать адекватные модели заболеваний, а также предоставляют возможность получения персонализированного клеточного продукта.

**ГЕНЕТИЧЕСКИ-ДЕТЕРМИНИРОВАННЫЕ ПАТОЛОГИИ ВОЛОСЯНОГО
ФОЛЛИКУЛА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА НА ПРИМЕРЕ
МУТАЦИЙ ГЕНА *HAIRLESS***

Пантелеев А.А.

НИЦ Курчатовский Институт, Москва, a.a.pantel@gmail.com

***HAIRLESS* GENE MUTATIONS AS A CLASSICAL EXAMPLE OF GENETICALLY
DETERMINED HAIR FOLLICLE ABNORMALITIES IN LABORATORY ANIMALS
AND HUMANS**

Panteleyev A.A.

National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, a.a.pantel@gmail.com

Исследования клеточных и молекулярных механизмов циклической регенерации волосяного фолликула представляют значительный интерес не только с точки зрения фундаментальной науки, но также и с клинической и коммерческой сторон. Несмотря на этот интерес, активные исследования биологии цикла (регенерации) волосяного фолликула в течение последних 30 лет пока не привели к решению проблемы самых распространённых его патологий – различных форм алопеции (выпадение волос), включая очаговую (alopecia areata) и андрогенетическую (облысение «мужского» типа). Оба этих состояния, несомненно, имеют генетическую природу, однако зависимость их патогенеза от множества внешних и внутренних факторов, как и их возможная полигенная природа, значительно затрудняют исследование этиологии алопеций. Именно поэтому идентификация в 1998 году человеческого аналога гена “hairless” (Hr) вызвала огромный интерес как научной общественности, так и средств массовой информации. Потеря функциональности этого гена у человека ведёт к полной потере волос при отсутствии каких бы то ни было других симптомов (кроме локализованного формирования крупных дермальных цист). Выявление функций гена *hairless*, как и поиск методов контроля его активности, были расценены как путь к решению проблемы алопеций.

Наши исследования в течение многих лет сосредоточены на механизмах поддержания гомеостаза кожных покровов и на выявлении роли димерных факторов транскрипции PAS (фактор, индуцируемый гипоксией HIF и диоксиновый рецептор AhR) как важнейших сенсорных и регуляторных компонентов системы обмена сигналами между кожными покровами и внешней средой. Как оказалось, безволосые мыши, несущие мутацию в гене *hairless* (линия HRS/J), обладают повышенной чувствительностью к токсическому действию диоксина и являются эффективной моделью для исследования кожных проявлений его действия. Эта уникальная особенность позволила нам не только исследовать механизмы токсического действия диоксина на кожу человека, но и инициировала активные исследования функций гена *hr* и фенотипа «безволосости» у мышей и человека. Нами были выявлены паттерны экспрессии этого гена в волосяном фолликуле в процессе его циклической активности от роста к покою, а так же определены непосредственные причины выпадения волос у животных и пациентов, несущих мутации в гене *hairless*. Были определены и молекулярно-клеточные механизмы этой патологии. Подавление активности гена *hr* ведёт к индукции апоптоза в специфических клеточных популяциях фолликула, что ведёт к нарушению взаимного расположения его слоёв и невозможности фиксации стержня волоса в фолликуле в стадии покоя. Пространственное разделение мезенхимальной и эпителиальной частей волосяного фолликула определяет невозможность его регенерации при переходе к ростовой стадии цикла. Нами так же был идентифицирован целый ряд мутаций в гене *hairless* у человека, лабораторных мышей и приматов. При этом были выявлены патоморфологические особенности каждой из аллелей. Более того, специфическая патоморфология кожи безволосых животных и человека позволила нам разработать новую модель индукции роста нового волоса (стадии анагена) – так называемую гипотезу «преддетерминации волосяного фолликула».

Таким образом, безволосые мыши, несущие мутации в гене *hr*, являются не только удобной моделью для исследования кожного канцерогенеза и фотодерматозов, но и уникальным инструментом для исследования нормальных функций волосяного фолликула. Вместе с тем, фенотипические проявления этих мутаций у человека не имеют ничего общего с распространёнными формами алопеций, а представляют собой совершенно новый клинический синдром – «алопецию с папулами» (“*atrachia with papular lesions*” или “*papular atrichia*”).

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 19-015-00306А и внутренним грантом Курчатовского института.

МОДЕЛИРОВАНИЕ И СИМУЛЯЦИЯ СЛИЯНИЯ ТКАНЕВЫХ СФЕРОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

Пахомова Е.А.^{1,2}

¹ НИЯУ МИФИ, Москва,

² Сколковский Институт Науки и Технологий, Москва,

pakhomovacatherine@gmail.com

MODELING AND SIMULATION OF TISSUE SPHEROID FUSION USING FUNCTIONAL REPRESENTATION

Pakhomova E.A.^{1,2}

¹ National Research Nuclear University MEPhI, Moscow,

² Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow,

pakhomovacatherine@gmail.com

Введение. Рассматривая 3D биопечать как область исследований, стоит отметить, что она является частью большой области исследований "3D печать в медицине". 3D биопечать можно рассматривать как усовершенствованную 3D печать с адаптацией к живым клеткам, тканям и конструкциям. Биопринтеры можно рассматривать как одну из разновидностей медицинских 3D принтеров. Биопечать требует предварительной подготовки цифровой модели не в меньшей степени, чем классическая 3D печать, особенно в случае разработки гетерогенных тканей и сложных органических конструкций [Chua, S.K. and Yeong, W.Y., 2015]. *Цель исследования* – разработать и валидировать модель важнейших процессов в тканевых сфероидах, которые являются основным материалом для биопечати.

Материалы и методы. Так как естественный феномен слияния тканевых сфероидов лежит в основе процесса биопечати, ошибки на данном этапе могут привести как к достижению нежелательного результата, так и к полной нежизнеспособности тканевого конструкта. Стоит отметить, что данный процесс осложняется необходимостью достижения компромисса между необходимостью увеличивать диаметр тканевых сфероидов для лучшего слияния и тем фактом, что в сфероидах большего размера могут возникать некротические процессы ввиду низкого уровня диффузии. Комплексная задача такого рода требует специфического подхода к решению. Ввиду вышесказанного, метода Функционального представления (FRep), позволяющий описать необходимые процессы с помощью математических функций, представляется удобоваримым решением [Alexander P., Adzhiev V., Sourin A., et al., 1995; Pakhomova C. et al., 2020].

Результаты и обсуждение. Проведено моделирование зависимости наличия некротических процессов в центре от диаметра сфероидов с использованием метода FRep,

решена задача реакции-диффузии. Концентрация кислорода в клетках была рассмотрена в зависимости от времени и координаты, чтобы понять, какой диаметр сфероида является максимальным без каких-либо некротических процессов, возникающих в центре. Потребление питательных веществ клетками рассматривалось как источниковый коэффициент OCR (скорость потребления кислорода), зависящий от свойств выбранной клеточной матрицы и выбранных клеток. Апробация и валидация модели проводилась на бычьих хондробластах в клеточной культуре DMEM, OCR был принят в виде $2,47 * 10^{-16}$ г/клетка/с [Guaccio, A. Et al., 2008], разделенных на объем клетки. По результатам моделирования, максимальный диаметр тканевого сфероиды ткани из бычьих хондробластов в клеточной культуре DMEM без каких-либо некротических процессов в центре составляет 285 мкм.

Заключение. Валидация модели была предоставлена в 3D Bioprinting Solutions на тканевых сфероиды на третий день после посева, в концентрациях 29000 клетка/мл и 16000 клетка/мл. Половина тканевых сфероиды была окрашена CellTox Green сразу после посева, вторая половина - Live/Dead на третий день. Сравнивая результаты моделирования и эксперимента, стоит отметить, что в обоих случаях наблюдается тенденция резкого уменьшения концентрации по достижении радиуса в 250 мкм, и по результатам эксперимента первые некротические процессы образуются по достижении 285 мкм. Следовательно, модель прошла валидацию и далее требует учета компактности клеток, для возможности моделирования более сложных биоконструктов.

**ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ (ЭКЗОСОМЫ) - ПЕРСПЕКТИВНАЯ
ПЛАТФОРМА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

***Пешкова К.Ю.¹, Салихова Д.И.^{1,2}, Силачѐв Д.Н.³, Мокроусова В.О.¹, Бухарова Т.Б.¹,
Гольдштейн Д.В.¹***

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени Н.П. Бочкова», Москва,
kseniap2602@gmail.com

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт Морфологии человека», Москва

³НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ, Москва

**EXTRACELLULAR VESICLES (EXOSOMES) - A PROSPECTIVE PLATFORM FOR
REGENERATIVE MEDICINE**

***Peshkova K.Yu.¹, Salikhova D.I.^{1,2}, Silachev D.N.³, Mokrousova V.O.¹, Bukharova T.B.¹,
Goldshtein D.V.¹***

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, kseniap2602@gmail.com

²Research Institute of Human Morphology, Moscow

³A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State
University, Moscow

Введение. Исследования по изучению возможных механизмов стимуляции регенерации нервной ткани при трансплантации стволовых клеток привели к выводу о возможности использования только внеклеточных везикул самих клеток. Использование такого подхода в регенеративной медицине имеет ряд преимуществ перед традиционным использованием стволовых клеток, так как проблемы, связанные с иммунной совместимостью, онкогенезом, переносом вирусных инфекций, при таком подходе отсутствуют (Williams et al., 2020; Y. Zhang et al., 2020; S. Ghosh et al., 2020). Данное исследование направлено на изучение распределения размера и морфологических свойств внеклеточных везикул, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), дифференцированных в глиальном направлении. *Цель исследования* - установить размер и морфологию внеклеточных везикул, полученных из глиальных клеток-предшественников.

Материалы и методы. Для выделения внеклеточных везикул сначала получали кондиционированную среду (КС) культуры глиальных клеток-предшественников (ГКП) культивированием в среде DMEM/F12 с добавлением 1% фетальной телячьей сыворотки, 1% добавки N-2, 2мМ глутамин, 100мг/л пенициллин-стрептомицин, 10 нг/мл EGF и 10 нг/мл CNTF в течении 24 часов. Чтобы избежать возможного заражения везикул, вызванного раствором FBS, КС центрифугировали при 108000g в течение 1,5ч, затем супернатант собирали, фильтровали с использованием системы вакуумного фильтра с крышкой с

диаметром пор 0,22 мкм и использовали для дальнейших экспериментов в качестве культуральной среды без пузырьков. Кондиционированную среду (50 мл) из конфлюэнтных культур собирали и обрабатывали с использованием серийных центрифугирований для удаления клеток и дебриса (400g в течение 10 минут, затем 10000g при 4°C в течение 30 минут). Супернатант использовали для выделения внеклеточных везикул путем ультрацентрифугирования при 108000g в течение 1,5 ч при 4°C на высокоскоростной центрифуге Avanti JXN-30 (Beckman Coulter Inc., Фуллертон, Калифорния, США) с дальнейшей промывкой осадка физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) с последующим центрифугированием при 108000g в течение 1,5 ч для минимизации загрязнения КС белком. Конечный осадок ресуспендировали в 10 мкл отфильтрованного PBS. Образцы везикул хранили при -80°C. Ресуспендированный осадок из некондиционированной культуральной среды, прошедший все центрифугирования, использовали в качестве дополнительного контрольного образца, чтобы убедиться, что наблюдаемые эффекты были вызваны именно везикулами от ГКП, а не примесью случайных наночастиц. Для проведения трансмиссионной электронной микроскопии образцы внеклеточных везикул готовили следующим образом: 10 мкл полученного раствора наносили на покрытые нитроцеллюлозой углеродные сетки PELCO® Cu (Ted Pella Inc., Реддинг, Калифорния, США) и инкубировали в течение 1 мин. Затем жидкость удаляли и на сетку сразу же наносили 10 мкл раствора 2% уранилацетата и снова инкубировали в течение 15 с. Затем капли снова удаляли. Далее образцы исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Thermo Fisher Scientific (Голландия). Концентрацию и распределение внеклеточных везикул по размеру (включая как апоптотические тельца, так и экзосомы) анализировали с использованием прибора NTA LM10 с красным лазером (638 нм, 40 мВт, NanoSight Technology, Лондон, Великобритания) и камерой Merlin F-033B ASG (Allied Vision Technologies GmbH, Stadtroda, Германия). Образцы вносили вручную, и сбор данных производили при температуре окружающей среды.

Результаты и обсуждение. Для установления размера, а также морфологии получаемых внеклеточных везикул, мы использовали методы трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и анализ траекторий наночастиц. Согласно данным ТЭМ, получаемые структуры от глиальных клеток-предшественников представляли собой окруженные цитоплазматической мембраной везикулы, имеющие сферическую форму и гладкую поверхность. Установлено, что фракции внеклеточных везикул содержат нано- и микровезикулы, размер которых составляет от 60 нм до 300 нм с пиком в области 80-100 нм (76,22%-80% от общего количества везикул).

**РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ММСК: ОТ МЕЖКЛЕТОЧНОГО
ТРАНСПОРТА К ТРАНСПЛАНТАЦИИ МИТОХОНДРИЙ**

Плотников Е.Ю.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В.

Ломоносова, Москва, РФ

ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, Москва, plotnikov@belozersky.msu.ru

**REGENERATIVE POTENTIAL OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS: FROM
INTERCELLULAR TRANSFER TO MITOCHONDRIA TRANSPLANTATION**

Plotnikov E.Y.

M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical

Biology, Moscow

V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,

Moscow, plotnikov@belozersky.msu.ru

Явление межклеточного транспорта митохондрий привлекает внимание, как фундаментальной науки, так и клинической медицины. Среди описанных последствий передачи митохондрий: изменение направления дифференцировки стволовых клеток, перепрограммирование дифференцированных клеток и восстановление утраченных митохондриальных функций в клетках-реципиентах. Механизмы транспорта митохондрий между клетками и условия, стимулирующие реализацию этого феномена, активно изучаются в последние годы, и одним из основных объектов таких исследований являются мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (ММСК).

Мы обнаружили, что при сокультивировании ММСК и нейронов коры головного мозга крыс между этими клетками образовывались многочисленные контакты, в том числе по типу туннельных нанотрубочек, и через них происходил обмен митохондриями. При этом митохондрии передавались только от ММСК к нейронам, а не наоборот. Также мы наблюдали увеличение в ММСК после сокультивирования количества белка Miro1, ответственного за межклеточный транспорт митохондрий. Аналогичные явления наблюдались и при сокультивировании ММСК с астроцитами, а сокультивирование с астроцитами ММСК, сверхэкспрессирующих белок Miro1, приводило к увеличению числа клеток, получивших митохондрии от ММСК. Более того, если культура астроцитов перенесла ишемию, то процент клеток, получивших митохондрии от ММСК также значительно возрастал. Еще одним доказательством стимуляции передачи митохондрий при их повреждении стало использование нейральных ро-нулевых клеток, в которых отсутствует

или повреждена митохондриальная ДНК. Сокультивирование таких клеток с ММСК также вызывало значительный прирост доли клеток, получивших митохондрии из ММСК.

Интересно, что митохондрии участвуют в перекрестном взаимодействии между астроцитами и нейронами в условиях ишемии, когда нейроны выбрасывают свои поврежденные митохондрии с последующей их утилизацией в соседних астроцитах. Это указывает на важность митохондриального переноса между нейрональными и не-нейрональными клетками в реакции мозговой ткани на ишемическое повреждение. Кроме того, недавние работы показали, что астроциты обмениваются митохондриями с нейронами однонаправленно: от астроцитов к нейронам. Это явление наблюдалось в условиях ишемии тканей или других повреждающих воздействий, и, по-видимому, перенос митохондрий к поврежденным нейронам выполняет нейропротекторную функцию.

Дальнейшие исследования показали, что еще один новый способ или компонент межклеточной коммуникации может представлять собой непосредственно митохондриальная ДНК. Более того, именно перенос мтДНК может способствовать обнаруженным недавно кардиопротекторным эффектам митохондриальной трансплантации. В этих работах выявлено, что возможен прямой перенос (трансплантация) изолированных митохондрий в кардиомиоциты сердца при инъекции изолированных митохондрий. Данные митохондрии в дальнейшем встраивались в клетки, сохраняли там свою функцию и обеспечивали улучшение энергетики миокарда после ишемии.

Нами также была показана возможность передачи митохондрий *in vivo* из трансплантированных ММСК в нейроны головного мозга. Мы считаем, что именно передача митохондрий от ММСК в нейроны может, по крайней мере, частично обеспечивать нейропротекторные свойства стволовых клеток при инсульте. Этот подход может использоваться для дальнейшей разработки способов клеточной терапии и улучшения свойств ММСК при лечении инсульта и других поражений головного мозга, а возможность терапевтической трансплантации митохондрий с помощью стволовых клеток открывает новые перспективы для клеточных регенеративных технологий и митохондриальной медицины.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-54-56028.

НАПРАВЛЕННОЕ ПРОГРАММИРОВАНИЕ МАКРОФАГОВ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Полтавец А.С.¹, Вишнякова П.А.¹, Ельчанинов А.В.^{1,2}, Фатхудинов Т.Х.^{1,2}

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова", Москва;

²ФГБНУ "НИИ морфологии человека", Москва.

MACROPHAGE DIRECTED PROGRAMMING FOR CELL THERAPY

Poltavets A.S.¹, Vishnyakova P.A.¹, Elchaninov A.V.^{1,2}, Fatkhudinov T.Kh.^{1,2}

¹National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov.

² Research Institute of Human Morphology

Введение. Одними из важнейших клеток врожденного иммунитета являются макрофаги. Они выступают первой линией защиты организма при бактериальных, вирусных и других заболеваниях. Данная группа клеток обладает различными свойствами и проявляет функциональную пластичность в ответ на индукторы и другие сигналы окружения.

Выделяют три основных фенотипа макрофагов - M0 (наивные), M1 (провоспалительные), M2 (противовоспалительные).

Работы последних лет показывают, что в окружении опухоли макрофаги обладают M2 фенотипом и являются «проопухолевыми», поскольку они способствуют ангиогенезу, прогрессированию опухоли, ремоделированию матрикса и метастазированию. Также известно, что макрофаги M1 фенотипа подавляют развитие опухоли.

Цель исследования. Данная работа посвящена изучению методов стабильной поляризации макрофагов для активации их противоопухолевых функций.

Материалы и методы. Применялись методы проточной цитофлуориметрии, ПЦР в реальном времени, оценка секретируемых клетками цитокинов для исследования основных маркеров M1 поляризации. Также было проведено сравнение фагоцитарной активности CD14+ и CD16+ макрофагов.

Результаты и обсуждение. Смещение баланса состояний макрофагов в сторону M1 или M2 происходит под действием индукторов, таких как липополисахарид интерферон гамма, интерлейкин 4. В данной работе был отработан метод получения субпопуляций моноцитов с помощью магнитного сортирования, их дифференцировка в макрофаги, а также поляризация в состояния M1 и M2. Было проведено сравнение моноцитарных субпопуляций в крови – CD14 + и CD16 + к направленному программированию в сторону M1.

Нами было показано, что макрофаги, полученные из CD14⁺ моноцитов, демонстрируют более высокую экспрессию маркеров M1, что указывает на то, что данная группа более чувствительна к индукторам M1 поляризации. Для выявления основных генов, участвующих в активации M1 фенотипа у макрофагов нами были получены данные транскриптома и протеома CD14⁺ клеток, а также проведена биоинформатическая обработка данных. Для проведения модификации макрофагов, которая приведет к стабильной поляризации в сторону M1 фенотипа, нами планируется провести нокдаун\нокаут генов, которые могут препятствовать провоспалительной активации.

Заключение. Данное исследование впервые показало, что субпопуляция CD14⁺ макрофагов имеет высокую чувствительность к индукторам M1 поляризации в сравнении с CD16⁺ клетками. Также были получены данные об изменениях в профилях экспрессии генов и их белковых продуктов при M1 активации.

Данная работа может лечь в основу исследований иммунного ответа и создания новой клеточной терапии с помощью макрофагов.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИНДУЦИРОВАННЫМИ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МЕМБРАННЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ

Пономарев А.С.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

l.ponomarev2013@gmail.com

CHARACTERIZATION OF TUMOR SPHEROIDS OF HUMAN COLORECTAL CANCER MODIFIED BY CYTOCHALASIN B-INDUCED MEMBRANE VESICLES

Ponomarev A.S.

Kazan (Volga region) Federal University, l.ponomarev2013@gmail.com

Введение. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) привлекают все больший интерес как метод доставки противоопухолевых препаратов благодаря их таргетности и низкой иммуногенности. Но существует риск их использования из-за свойств МСК онкотрансформироваться. Одним из перспективных направлений в онкотерапии является использование внеклеточных везикул МСК. Внеклеточные везикулы представляют собой гетерогенную группу мембранных структур, синтезирующиеся и выделяющиеся клетками. Везикулы являются ключевыми посредниками между опухолевыми клетками и окружающей микросредой благодаря их способности транспортировать липиды, факторы транскрипции, мРНК, некодирующие регуляторные РНК и белки. Однако понимание процесса обмена

информацией между клетками с помощью везикул остается весьма ограниченным. Кроме того, изучение влияния внеклеточных везикул МСК на опухолевые клетки может позволить найти новые методы борьбы с онкологическими заболеваниями. Поэтому *целью данной работы* является исследования влияния мембранных везикул МСК на опухолевые сфероиды *in vitro*.

Материалы и методы. Модель опухолевых сфероидов имеет ряд преимуществ по сравнению с двумерными (2D) опухолевыми культурами, благодаря определенным свойствам, сближающим их с нативной опухолью. Для исследования опухолевых сфероидов был использован метод «висячая капля» (20 тыс. клеток колоректальной карциномы (HCT-15) на 30 мкл среды с добавлением факторов FGF, EGF, B27). Было сгенерировано 3 группы сфероидов: 1 - контроль, 2 - с добавлением 1 мкг везикул, 3 - с добавлением 2 мкг везикул. В качестве контроля использовалась 2D модель и сфероиды, которые культивировались без добавления мембранных везикул. Мембранные везикулы МСК жировой ткани человека были получены с помощью 10 мкг/мл цитохалазина В и серии последовательных центрифугирований. Добавление мембранных везикул к сфероидам производилось в концентрациях 1 мкг и 2 мкг. Везикулы были добавлены после 12 часов культивирования клеток. Измерения производили на 3 сутки. Влияние везикул анализировали с помощью конфокальной и трансмиссионной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

Результаты и обсуждение. Результаты конфокальной микроскопии подтвердили слияние везикул и клеток, образующих сфероид после 24-х часов культивирования. На 3 сутки культивирования трансмиссионная электронная микроскопия показала отсутствие отрицательного влияния везикул на опухолевые клетки, но при добавлении везикул было выявлено, что в цитоплазме клеток присутствуют структуры подобные мультивезикулярным тельцам, укомплектованные везикулами. Окрашивание аннексином V показало уменьшение количества жизнеспособных клеток после добавления везикул.

Заключение. Таким образом, по результатам данного исследования, мы предполагаем влияние везикул МСК на опухолевые сфероиды. Для обнаружения детальных механизмов данного влияния необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и при поддержке Российского научного фонда (грант №18-74-10044).

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК ИЗ СЕМЕННИКА МЫШИ, ОСНОВАННЫЙ НА ПРИМЕНЕНИИ ФЕРМЕНТА ПРОНАЗЫ E.

Пономаренко Е.А., Диатроптова М.А., Степанов А.А., Артемьева К.А.

ФГБНУ «Институт морфологии человека», Москва, *artemjeva_ksenia@mail.ru*

A METHOD FOR OBTAINING CELLS FROM THE MOUSE TESTIS, BASED ON THE USE OF THE ENZYME PRONASE E.

Ponomarenko E.A., Diatroptova M.A., Stepanov A.A., Artemieva K.A.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, artemjeva_ksenia@mail.ru

Введение. Получение клеток сперматогенного эпителия разных стадий дифференцировки необходимо для изучения биохимических и молекулярно-биологических процессов сперматогенеза в норме и при его нарушениях. Между этими клетками наблюдают плотные контакты, щелевые и десмосомные межклеточные соединения. Вследствие указанных особенностей строения сперматогенного эпителия выделение клеток из семенников имеет ряд сложностей. Так, при получении суспензии клеток не только нарушаются межклеточные соединения, но и происходит повреждение клеток со снижением их жизнеспособности. Протоколы ферментативного выделения половых клеток семенных канальцев многочисленны, но не стандартизованы, и жизнеспособность полученных клеток сперматогенного эпителия в суспензии различается. В связи с тем, что метод выделения с применением проназы E по T.G. Pretlow (1974) показывает лучшие результаты по уровню жизнеспособности выделенных клеток и низкому количеству образующихся симпластов, его применение является предпочтительным, что, в тоже время, не исключает некоторых доработок и внесения изменений в протокол.

Цель работы: установить оптимальную схему получения клеток из семенника мыши, основанную на использовании фермента, включая проназу E.

Материалы и методы. В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 массой тела 24-28 г (питомник «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Выполняли забор семенников, помещали их в культуральную среду 199 при температуре 4°C. Делали небольшой надрез белочной оболочки семенника и извлекали извитые семенные канальцы одним блоком. На первом этапе семенные канальцы помещали в раствор DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы, 0,16 мг/мл коллагеназы тип 4, 5% фетальной сыворотки – FCS и инкубировали 20 мин при 37°C в CO₂ инкубаторе. Раствор коллагеназы позволяет разобщить канальцы и удалить интерстициальные клетки. После инкубации с раствором коллагеназы семенные канальцы единым блоком переносили в раствор DPBS, без Ca²⁺, Mg²⁺, 0,5% FCS и бережно пипетировали. После оседания семенных канальцев супернатант, содержащий

интерстициальные клетки и клетки канальцев, удаляли. Процедуру повторяли 2-3 раза. На втором этапе семенные канальцы переносили в инкубационную среду следующего состава: DMEM с 25 mM HEPES, 4,5 г/л глюкозы, 0,05% проназы E, 20μг ДНКазы и инкубировали в течение 10 мин при 37°C. Суспензию клеток и остатки семенных канальцев пропускали через клеточное сито диаметром пор 100 мкм, затем переносили в пробирку и добавляли 10 мл DPBS с 0,1% глюкозы, 0,5% FCS и 5 mM DNA (2-naphthol-6,8-disulfonic acid, dipotassium salt) с целью уменьшения агрегации клеток. Центрифугировали при 320 g 10 мин при 4°C. Затем клетки помещали в среду DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы с 10% FCS, 20 мкг/мл гентамицина и 2 mM глутамина. После выделения клеток сперматогенного эпителия и через сутки после хранения суспензии определяли абсолютное количество половых клеток на 1 мг ткани семенника, их жизнеспособность и выраженность реагрегации.

Результаты и обсуждение. При использовании протокола выделения с проназой E количество выделенных клеток составило $1,3 (0,8; 1,4) \times 10^5$ на 1 мг ткани семенника, их жизнеспособность клеток сохранялась на высоком уровне (при выделении – 86-99%, через сутки – 74-92%).

При качественной оценке клеточного состава полученной суспензии определили, что клетки профазы I мейоза на различных стадиях включали в %: прелептотена 8 (5; 16), лептотена ранняя 3(0;3), лептотена поздняя 51 (46;62), зиготена 21(16;35), пахитена 115(106;130), диплотена 12,5(8;20), диакинез 6,5(3;7). Сперматогонии по типам составляли в %: A0-11,5 (5;16), A1-7,5(5;11), A2-3(0;12), A3-8(3;14), A4-18,5(11;23), промежуточный-13(7;17), B-21,5(13;29). Сперматиды на разных стадиях спермиогенеза включали в %: I-14(13;22), II-14(12;20), III-10(6;20), IV-11 (6;22), V-29,5(19;32), VI- 31,5(19;44), VII-37(30;42), VIII-61,5(36;72), IX-32,5(22;41), X-45,5(39;49), XI-66,5(57;91), XII - 252(187;266). Отмечали, отсутствие клеток на стадиях I и II мейотического деления, что может быть связано с небольшой продолжительностью этого периода и тем, что клетки в процессе деления наиболее подвержены разрушению ферментами.

В связи с образованием симпластов метод был изменен с использованием фермента проназы E, в концентрации 0,05%, рекомендованной для выделения клеток из других тканей. Симпласты клеток были единичными.

Заключение. Таким образом, модифицированный нами метод T.G. Pretlow (с проназой E) является оптимальным для выделения суспензии клеток сперматогенного эпителия.

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ ФИБРОБЛАСТОВ
КОЖИ КРЫС И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.**

Пономаренко Е.А., Диатроптова М.А., Степанов А.А., Артемьева К.А.

ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва, artemjeva_ksenia@mail.ru

**OPTIMIZATION OF THE PROTOCOL OF OBTAINING CULTURE OF RAT SKIN
FIBROBLASTS AND PRACTICAL ASPECTS OF ITS USE.**

Ponomarenko E.A., Diatroptova M.A., Stepanov A.A., Artemieva K.A.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, artemjeva_ksenia@mail.ru

Введение. Культура фибробластов является универсальной биологической моделью для изучения процессов, лежащих в основе роста и пролиферации клеток, их метаболизма и передачи внутри- и внеклеточных сигналов. Ее применение также позволяет изучать *in vitro* секреторную активность клеток не только в физиологических условиях, но и при воздействии различных факторов по уровню продукции специфичных белков, цитокинов, факторов роста, компонентов внеклеточного матрикса и др. Фибробласты входят в соединительнотканый каркас различных органов: сердца, желудочно-кишечного тракта, легких, мышц и др. Одним из источников их получения является кожа.

Материалы и методы. В работе использовали самцов крыс Вистар массой тела 60-65 г. в возрасте 5-6 нед, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Проведена серия экспериментов по получению культуры фибробластов из кожи с подбором типа коллагеназы, её концентрации, времени воздействия.

Результаты и обсуждение. Нами был проведен ряд экспериментов по подбору времени ферментативного воздействия. Использовали коллагеназу II типа в концентрации 0,5 – 1 мг/мл и время воздействия составляло 1-1,5-2-2,5-3-4-5 часа при этом фрагменты кожи крысы были размерами менее 1 мм. Через 1,5-2 часа ферментативного воздействия коллагеназы II типа, фрагменты кожи легко разрушались и проходили через стандартный наконечник пипетки объемом 1000 мкл. В результате было выявлено, что лимитирующим фактором для получения фибробластов оказался возраст животного. Так, у новорожденных и крыс в возрасте 5-6 нед (60-65 г массы тела) получали культуру клеток фибробластов с использованием как Liberase Blendzyme 3 (метод предложен A.Seluanov с соавт. (2010)), так и коллагеназы II. Оптимальные условия отразили в протоколе. Метод включает забор участка кожи из подмышечной области крысы размерами 1×1 см, после предварительного сбривания шерстного покрова и обработки кожи 70° этиловым спиртом. Участок кожи крысы помещали на 30-60 мин в предварительно прогретый до 37°C 0,25% раствор трипсина в CO₂ инкубатор. Затем с помощью скальпеля удаляли эпидермис и подкожную клетчатку.

Кожу измельчали и помещали в среду ДМЕМ с содержанием глюкозы 4,5 г/л, L-глутамин с коллагеназой II типа в концентрации 1 мг/мл на 90 мин в CO₂ инкубатор, встряхивая пробирку через каждые 15-20 минут. Раствор с неперевавшими кусочками кожи пипетировали и добавляли раствор ДМЕМ с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС), центрифугировали при 325 g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в среде ДМЕМ с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 2мМ L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина и 10% ЭТС и помещали в чашку Петри или матрас.

У крыс с увеличением возраста и по достижении массы тела 80 г и более не удалось получить культуру клеток фибробластов кожи с помощью вышеприведенного протокола. Поэтому в протокол для получения фибробластов у половозрелых крыс, массой 160-180 г были внесены изменения. Метод включает забор участка кожи со спины крысы размерами 1×1 см. Предпочтение выбора участка кожи было обусловлено большим количеством коллагеновых волокон, и фибробластов. Метод отличает применение коллагеназы II типа в большей концентрации (5 мг/мл в течение 2 часов) и более щадящим режимом центрифугирования (112g 7 мин). В этом случае в течение 10 дней формировался полный монослой фибробластов.

Заключение. При получении первичной культуры фибробластов кожи крыс следует учитывать ряд факторов: тип фермента, его концентрацию, время воздействия, возраст животных, зону забора кожного лоскута. Оптимальный результат получен при использовании кожного лоскута из подмышечной области у крыс в возрасте 5-6 недель массой тела 60-65г, применении коллагеназы II типа в концентрации 1 мг/мл, и времени воздействия 90 мин. Для взрослых животных с массой тела 160-180 г при обработке кожи, полученной из области спины, более подходящей была ферментативная дезагрегация коллагеназой II типа, в концентрации - 5 мг/мл, в течение 120 минут.

ОСОБЕННОСТИ ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИМПЛАНТАТОВ ИЗ ОКТАКАЛЬЦИЕВОГО ФОСФАТА ДЛЯ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ

Пресняков Е.В.,¹ Бозо И.Я.,^{2,3} Деев Р.В.^{1,4}

¹ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, uvpres@gmail.com

²ООО «Гистографт», Москва, bozo.ilya@gmail.com

²Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва,

bozo.ilya@gmail.com

⁴ПАО «Институт стволовых клеток человека», Москва, romdey@gmail.com

FEATURES OF OSTEOGENESIS USING IMPLANTS BASED ON OCTACALCIUM PHOSPHATE FOR BONE PLASTIC

Presnyakov E.V.,¹ Bozo I.Y.,^{2,3} Deev R.V.^{1,4}

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg,

uvpres@gmail.com

²Histograft, Moscow, bozo.ilya@gmail.com

³Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency,

bozo.ilya@gmail.com

⁴Human Stem Cells Institute, Moscow, romdey@gmail.com

Введение. Реконструкция костей сопряжена с применением остеопластических материалов, которые оптимизируют репаративный остеогенез и за счет постепенной биодеградации замещаются вновь образованной костной тканью. Восстановление целостности костей в условиях использования остеопластических материалов характеризуется рядом особенностей, которые должны быть детализированы и учтены как в ходе проведения оперативных вмешательств, так и в общих алгоритмах лечения.

Цель исследования: изучить особенности репаративного остеогенеза при имплантации в зону костного дефекта остеопластического материала из октакальциевого фосфата (ОКФ).

Материалы и методы. Исследование проводилось на кроликах (n=12) и свиньях (n=4). В каждой экспериментальной модели животным формировали дефекты костей скелета, а в качестве остеопластического материала использовали ОКФ. В модели краниальных костных дефектов у кроликов применяли ОКФ в виде гранул, в эксперименте на свиньях с дефектами большеберцовой кости и нижней челюсти – в виде блоков, изготовленных посредством трёхмерной печати (И.Я. Бозо, В.С.Комлев, 2020). Результаты оценивали при помощи компьютерной томографии и гистологического исследования.

Результаты и обсуждение. ОКФ является эффективным материалом для костной пластики, так как обладает прогнозируемой остеоиндукцией и соответствует минеральному

компоненту костного матрикса. По данным гистологического исследования, уже через 3 месяца после имплантации наблюдалась биорезорбция краевых отделов остеопластического материала. Окружающая костная ткань плотно прилегала к ОКФ без формирования соединительнотканной капсулы и признаков воспаления. Однако новообразованная кость характеризовалась отсутствием остеобластов на поверхности трабекул, а также сравнительно малым количеством остеоцитов, что наблюдалось только в зоне контакта с остеопластическим материалом. Подобное строение кости напоминает т.н. «бесклеточную кость», описанную, для некоторых классов лучепёрых рыб, в частности – для инфракласса костистых рыб (Teleostei).

Описано два принципиальных типа индивидуального развития костной ткани – интрамембранозный, прямой остеогенез (непосредственно из мезенхимы) и энхондральный, непрямой остеогенез (на месте ранее заложенного хряща). Вероятно, одним из частных видов последнего можно считать перихондральный остеогенез. В то же время, в филогенезе определены еще несколько типов остеогенеза, не характерные для млекопитающих, в частности, бесклеточный остеогенез. Следует предположить, что бесклеточная кость также является продуктом остеобластов. Однако, помимо отсутствия остеоцитов, имеются ещё несколько значимых различий между бесклеточной и клеточной костной тканью.

Основное вещество кости обоих типов состоит из коллагенового фибриллярного матрикса и минерализовано солями фосфатов кальция. По сравнению с клеточной костью, бесклеточная костная ткань содержит кристаллы минерального компонента меньших размеров и относительно большее количество органической массы. Помимо этого, значимым отличием является отсутствие кровеносных сосудов в структуре бесклеточной кости, что является причиной её тонкости и рыхлости (Третьяков и Хинкус (1927), Угаров (1931)).

Заключение. Таким образом, можно сделать вывод, что помимо известных типов костной ткани – ретикулофиброзной и пластинчатой, вероятно может формироваться бесклеточная костная ткань, характеризующаяся малым количеством или отсутствием остеоцитов и кровеносных сосудов, и встречающаяся у млекопитающих в условиях репаративной регенерации при использовании октакальциевого фосфата в качестве остеопластического материала. Однако для оценки регенерационного гистогенеза, необходимо более подробное изучение эволюционной гистологии.

МОДИФИКАЦИЯ ВОЛОКОН СПИДРОНА БИОАКТИВНЫМ МОТИВОМ E-КАДГЕРИНА ДЛЯ ИНЖИНИРИИ НЕЙРОТКАНЕЙ

Ревкова В. А.¹, Сидорук К. В.², Бозуш В. Г.², Баклашев В. П.¹

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

veronicarevkova@gmail.com

²НИЦ "Курчатовский институт" - ГосНИИгенетика

MODIFICATION OF SPIDROIN SILK FIBERS WITH BIOACTIVE E-CADHERINE MOTIFS OF FOR NEURAL TISSUE ENGINEERING

Revkova V. A.¹, Sidoruk K. V.², Bogush V. G.², Baklaushev V. P.¹

¹Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, veronicarevkova@gmail.com

²Scientific Center "Kurchatov Institute" - Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

Введение. Пленки, полученные методом электроспиннинга смеси рекомбинантных спидроинов и поликапролактона, являются биосовместимыми и биodeградируемыми материалами. Благодаря наличию GRGGL-последовательности своей и анизотропности волокна таких пленок способствуют высокой адгезии нейральных прогениторных клеток и их направленному росту. Добавление к рекомбинантному спидроину мотивов белков межклеточного матрикса в сочетании с факторами роста позволяет создавать нативные условия микроокружения клеток нервной ткани. *Цель исследования* – проанализировать спонтанную и индуцированную дифференцировку нейральных прогениторных клеток, полученных путем прямого репрограммирования, на спидроиновых пленках, сшитых с мотивом LFSHAVSSNG белка E-кадгерина .

Материалы и методы. Пленки были изготовлены из смеси рекомбинантных спидроинов rSp1/9 (6 мас.%) и rSp2 /12 (1 мас.%) с добавлением мотива LFSHAVSSNG белка E-кадгерина в молярном соотношении 20:1 (в отношении rSp1/9:пептид), а также 1 мас.% ликапролактона. Нейральные прогениторные клетки (drNPC), полученные методом прямого репрограммирования с помощью Musashi-1 (Msi1), Neurogenin-2 (Ngn2), и methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2), были любезно предоставлены компанией New World Laboratories, Inc. (Laval, QC). Клетки культивировали на пленках в культуральной среде: NeuroCult-NS-A Proliferation medium (StemCell Technologies; Canada) с добавлением 1% B27 (Gibco, USA), 20 ng/ml EGF (Gibco, USA) и 40 ng/ml FGF2 (Gibco, USA) в условиях мультигазового инкубатора при 5% CO₂, 5% O₂, 37°C. Для индукции дифференцировки

пленки с клетками культивировали в дифференцировочной среде на основе NeuroCult-NS-A Proliferation medium (StemCell Technologies; Canada) с добавлением B27 (1X, Gibco, USA), CultureOne (1X, Gibco, USA), BDNF [40 ng/ml], GDNF [20 ng/ml] в условиях мультигазового инкубатора при 5% CO₂, 5% O₂, 37°C в течение 10 дней. Анализ дифференцировки проводили с помощью иммуноцитохимического анализа методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии.

Результаты и обсуждение. Длительное культивирование drNPC на пленках из рекомбинантного спидроина, модифицированного мотивом пептида кадгерина (LFSHAVSSNG) показало значительное уменьшение SOX2-позитивных клеток до $63,0 \pm 0,03\%$, в то время как в контроле этот же показатель был $99,3 \pm 0,02\%$. А процент клеток ко-экспрессирующих beta-III-tubulin и GFAP был примерно на 30% ниже, чем в контроле. Интересно, что при добавлении факторов пронеурональной и глиальной дифференцировки количество GFAP-позитивных клеток увеличилось почти на 30% по сравнению со спонтанной дифференцировкой от 65,9% до 85,3% соответственно. При этом количество beta-III-tubulin-позитивных клеток уменьшилось в 2 раза с 67,2% до 26,6%. Кроме того, при добавлении BDNF и GDNF среди общего пула клеток хорошо выделялись единичные клетки с длинными нитевидными отростками порядка $105,75 \pm 76,73$ мкм. Такие клетки также экспрессировали один из маркеров зрелых нейронов – NF200.

Заключение. Мы показали, что включение мотива E-кадгерина LFSHAVSSNG в состав волокон рекомбинантного спидроина может существенно влиять на спонтанную и индуцированную дифференцировку нейральных прогениторных клеток. Комбинация с факторами роста может усилить дифференцировку пряморепрограммированных нейральных прогениторных клеток до отдельных субпопуляций глиальных и нейрональных клеток. При этом мотивы фибронектина и E-кадгерина способствовали более тканеспецифичной дифференцировке drNPC с образованием большего количества глиальных клеток, локализованных вокруг единичных нейрональных. Дальнейшее сочетание таких бифункциональных скаффолдов с гидрогелями на основе белков межклеточного матрикса или синтетических полимеров позволит максимально повторить архитектуру нервной ткани, исследовать дифференцировку и миграцию нейральных прогениторных клеток, полученных методом прямого репрограммирования, в 3D структуре.

**МСК-ТПК: КЛЕТОЧНЫЕ И БЕСКЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ
ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Романов Ю.А.

ФГБУ НМИЦ Кардиологии, Москва

ООО «КриоЦентр», Москва, yromanov2010@yandex.ru

**UC-MSC: CELLULAR AND CELL-FREE PRODUCTS
FOR REGENERATIVE MEDICINE**

Romanov, Yu.A.

National Medical Research Center for Cardiology, Moscow

“CryoCenter, Ltd”, Moscow, yromanov2010@yandex.ru

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) можно по праву считать одним из наиболее интересных типов стволовых клеток человека. Они могут быть выделены практически из любой ткани человеческого организма: сосудистой стенки, фетальной печени, кожи, жировой ткани, пуповинной и менструальной крови, амниотической жидкости и даже из пульпы выпавших молочных зубов.

Непревзойденным источником МСК являются ткани перинатального происхождения, в частности, ткань пупочного канатика (ТПК). С помощью ферментативной обработки или с применением техники эксплантов МСК могут быть выделены из различных «компарментов» пуповины: субэндотелиального слоя сосудов, периваскулярного пространства, Вартонова геля и субамниотической зоны. В ходе культивирования МСК-ТПК приобретают фибробластоподобную морфологию, несут на своей поверхности обширный (помимо «обязательных» CD73, CD90 и CD105) набор рецепторов и молекул адгезии, демонстрируют высокую скорость пролиферации и способность к дифференцировке. МСК-ТПК могут быть успешно «превращены» в адипоциты, остеоциты и хондроциты. Имеются сообщения о способности дифференцировки МСК-ТПК в эндотелиальные клетки, миоциты, кардиомиоциты и клетки нейронального ряда, а также в гепатоциты и инсулин-продуцирующие клетки поджелудочной железы.

Способность к дифференцировке, противовоспалительные, ангиогенные и иммуномодулирующие свойства МСК-ТПК, выявленные *in vitro*, подтолкнули исследователей на изучение их терапевтического потенциала на лабораторных животных, а также в реальных клинических условиях. Согласно последним данным, начиная с 2008 г. число проводимых в мире клинических исследований с использованием МСК-ТПК неуклонно возрастает и исчисляется уже сотнями. Эффективность МСК-ТПК уже

продемонстрирована для таких заболеваний, как болезнь «трансплантат против хозяина» (РТПХ), болезнь Крона, ревматоидный артрит, ишемический инсульт, инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность, диабет 1 и 2 типа, травмы спинного мозга, цирроз печени, детский церебральный паралич, при поражениях, роговицы, кожи и т.д.

Изначально предполагалось, что в силу своих способностей дифференцироваться в клетки различных органов и тканей, МСК непосредственно участвуют в процессах репаративной регенерации, замещая собой поврежденные клетки и восполняя тканевые дефекты. Сегодня, большинство исследователей сходятся во мнении, что эффекты МСК достигаются благодаря иным механизмам, в том числе, паракринной регуляции. МСК-ТПК способны секретировать целую плеяду биологически активных соединений и структур: цитокинов, гормонов, факторов роста, микрочастиц (экзосом, микровезикул) и различных компонентов внеклеточного матрикса. И секретом в целом, и отдельные его компоненты рассматриваются сегодня как потенциальный терапевтический агент для регенеративной медицины. Уже достаточное количество публикаций свидетельствует о возможной применимости секрета МСК-ТПК как иммуномодулирующего, противовоспалительного, анти-апоптотического и нейропротективного агента. В наиболее типичном случае, секретом в виде среды, кондиционированной несколькими десятками-сотнями миллионов МСК, представляет собой практически готовый терапевтический продукт («продукт с полки»).

В ходе предшествующих исследований было установлено, что сыворотка пуповинной крови (СПК) человека обладает уникальным составом и способна даже в низких концентрациях поддерживать жизнеспособность и пролиферацию МСК, не нарушая фенотип и способность клеток к разнонаправленной дифференцировке, и представляет собой эффективную замену эмбриональной телячьей сыворотке. Использование СПК в составе среды культивирования позволяет решить сразу две из актуальных задач, связанных с изготовлением клеточных продуктов (БМКП) и бесклеточных терапевтических средств на их основе: избавиться от компонентов ксеногенного происхождения и существенно повысить продукцию клетками биологически активных молекул. В силу относительной простоты и низкой стоимости получения, хорошей сохранности составляющих компонентов при хранении, возможности строгого контроля качества при производстве, а также отсутствия потенциальных рисков, связанных с использованием целых клеток, применение бесклеточных терапевтических продуктов может оказаться даже более перспективным, чем самих МСК.

Дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение терапевтического потенциала секрета МСК-ТПК в моделях *in vitro* и *in vivo*, а также на поиск подходов к лечению социально значимых заболеваний и патологических состояний организма.

**ОЦЕНКА УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С
ПОЗВОНОЧНО-СПИННОМОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ
ТЯЖЕСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ**

Сабилов Д.Х.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,

davraniwe@gmail.com

**ASSESSMENT OF THE LEVEL OF CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF
PATIENTS WITH SPINAL CORD INJURY TO DETERMINE THE DEGREE OF
DAMAGE SEVERITY**

Сабилов Д.Х.

Kazan (Volga region) Federal University, davraniwe@gmail.com

Введение. В настоящее время стоит вопрос разработки панели диагностических биомаркеров, способных простым, высокоскоростным, точным и доступным методом определить тяжесть травмы в различные периоды повреждения спинного мозга. В связи с этим необходимо продолжить исследования фундаментальных процессов нейровоспалительных и аутоиммунных реакций при травме спинного мозга (ТСМ) с выявлением изменений в экспрессии различных цитокинов. Цель исследования – определить изменения в цитокиновом профиле сыворотки крови пациентов с травматической болезнью спинного мозга (ТБСМ) в подостром периоде ТСМ. *Материалы и методы.* В данном исследовании был проведен расширенный мультиплексный анализ цитокинового профиля (40 анализов) сыворотки крови пациентов в подострый период позвоночно-спинномозговой травмы (2 недели после повреждения) с использованием наборов: Bio-Plex Pro™ Human Chemokine Panel, 40-Plex #171ak99mr2 и Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 21-plex Assay #MF0005KMII (Bio-Rad) *Результаты и обсуждение.* Уровни 20 цитокинов в сыворотке крови существенно различались между подострым периодом ТСМ и контрольными (интактными) исследуемыми образцами. Уровни цитокинов CXCL5, CCL11, CXCL11, IL10, TNF α и MIF достоверно различались у пациентов с тяжестью ТСМ А или В (по шкале American Spinal Injury Association Impairment Scale). Уровни экспрессии цитокинов CXCL1, CXCL10, CXCL11, IL2, CCL11, MIP-3 α , MIG и CCL22 варьировались в зависимости от уровня травмы. *Заключение.* Данное исследование показало, что определение концентрации цитокинов в сыворотке крови может быть доступным и простым для использования инструментом для точной классификации степени тяжести ТСМ у пациентов.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-315-70028 и Программой повышения конкурентоспособности КФУ.

ПРЕОДОЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ МСКЧ В 3D-2D МОДЕЛИ

А.П. Савельева, П.Н. Федюкина, О.А. Быстрова, М.Г. Мартынова, Е.В. Байдюк,
И.Э. Неганова

ФГБОУН Институт цитологии, Санкт-Петербург, arina.saveleva2019@yandex.ru

OVERCOMING CELLULAR SCENESCENCE OF MSCs IN 3D-2D MODEL.

A.P. Saveleva, P.N. Fedyukina O.A. Bystrova, M.G. Martynova, E.V. Baidyuk,
I.E. Neganova.

Research Institute of Cytology, Saint Petersburg, arina.saveleva2019@yandex.ru

Введение. Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки человека (МСКч) – это клетки, которые способны к многолинейной дифференцировке в хондроциты, остециты и адипоциты, а также в кардиомиоциты, нейроны и астроциты как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, МСКч довольно просто выделяются из организма, обладают высокой пролиферативной активностью, пластичностью, способностью к направленной миграции и сильными иммуномодулирующими свойствами. Благодаря всем этим качествам МСКч стали перспективным объектом изучения для регенеративной и трансплантационной медицины. В настоящее время МСКч уже были успешно использованы для лечения различных заболеваний, включая болезнь «трансплантат против хозяина», болезнь Крона, сахарный диабет, рассеянный склероз, инфаркт миокарда, печеночная недостаточность, и некоторых других. Однако активное использование этих клеток в регенеративной медицине затруднено ввиду того, что в условиях *in vitro* в МСКч со временем активируется процесс клеточного старения, то есть происходит снижение функциональной активности и клеточной пролиферации по мере увеличения количества клеточных пассажей. Bartosh с соавторами (2010) показали, что МСКч поздних пассажей (характеризующиеся экспрессией маркеров клеточного старения) после прохождения фазы “3D-сфероидов”, восстанавливают способность к активной пролиферации и обладают типичным фенотипом клеток ранних пассажей. Однако, до этого момента основное внимание исследований 2D-3D-2D культивирования МСКч были направлены на изучение усиленного противовоспалительного эффекта этих клеток, изменений секретора и более высокой выживаемости, а не на понимание молекулярных процессов, происходящих в клетке при переходе из 3D-условий культивирования обратно в 2D-условия.

Цель исследования – определение сигнальных путей и клеточных механизмов, ответственных за преодоление клеточного старения МСКч в 3D-2D модели.

Материалы и методы. 3D-сфероиды МСКч были приготовлены с использованием клеток поздних пассажей методом “висячих капель”. Клеточный цикл и активацию процесса

аутофагии в 3D-сфероиде сравнивали с пролиферативной активностью 2D-культивируемых МСКч ранних и поздних пассажей, а также с этими же характеристиками у клеток после выхода из 3D-сфероида. Активацию аутофагии в клетках на раннем, позднем пассажах, а также в 3D-сфероиде и выходе обратно в 2D-условия культивирования проверяли с помощью электронно-микроскопических методов, а также иммунофлуоресцентным окрашиванием на основные маркеры различных этапов аутофагии (p230, p62, LC3b, m-TOR1). Эти данные также проверялись с помощью метода Western Blot. Кроме того, активацию процесса аутофагии по мере увеличения числа пассажей также выявляли специфическим окрашиванием лизосом коммерческим красителем LysoTracker Red DND-99, с дальнейшим анализом с помощью метода проточной цитометрии.

Результаты и обсуждение. Полученные нами данные согласуются с данными других групп и подтверждают преодоление клеточного старения МСКч в 3D-2D модели. Также, нами было отмечено, что после выхода из 3D в 2D-условия культивирования, МСКч сохраняли нормальный кариотип и высокий уровень экспрессии поверхностных маркеров. Мы предполагаем, что активация процесса аутофагии в 3D-сфероиде является одной из причин преодоления клеточного старения МСКч в 3D-2D модели. При окрашивании МСКч на аутофагоцитоз (реакция на кислую фосфатазу по Гомори) в цитоплазме клеток ранних пассажей и в клетках, вышедших из 3D-сфероидов, была выявлена низкая активность кислой фосфатазы (КФ), в то время, как клетки в 3D-сфероиде характеризовались высокой активностью КФ, характерной для активации этого процесса. Электронно-микроскопические методы исследования совместно с иммунофлуоресцентным окрашиванием и Western Blot на маркеры аутофагии p62, p230 и LC3b, подтвердили активацию процесса аутофагии в 3D-сфероиде МСКч по сравнению с 2D-культурой. Эти данные также были подтверждены при окрашивании клеток коммерческим красителем LysoTracker Red DND-99 и дальнейшим анализом с помощью метода проточной цитометрии, который показал, что происходит многократное увеличение количества лизосом с увеличением пассажа, а также в 3D-сфероиде.

Заключение. Наши предварительные данные предполагают активацию процесса аутофагии в 3D-сфероиде МСКч, как основного механизма преодоления клеточного старения этих клеток.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №20-015-00060 и при поддержке внутреннего гранта ИИЦ РАН.

**СОСТОЯНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОЧКЕ ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ ХОЛОДА НА ОРГАНИЗМ**

Сазонов С.В.

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский, Екатеринбург;

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,

Екатеринбург; prof-ssazonov@yandex.ru

**THE STATE OF PROLIFERATIVE PROCESSES IN THE KIDNEYS WHEN
EXPOSED TO COLD ON THE BODY**

Sazonov S.V.

FSBEI HE Ural State Medical University, Yekaterinburg;

GAUZ SO Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg. prof-ssazonov@yandex.ru

Введение. Выполнение специфических функций почкой требует их адекватного структурного обеспечения. При экстремальных воздействиях на организм, когда функциональные требования к этому органу существенно возрастают, состояние регенераторных процессов определяет развитие в ней компенсаторно-приспособительных реакций. Среди экстремальных воздействий особое внимание привлекает холодовой фактор в связи с перспективного активного освоения северных регионов страны. Однако, опубликованные работы по изучению состояния пролиферации в почке при холодовом воздействии на организм не позволяют дать полную характеристику особенностей течения регенераторных процессов в этом органе.

Цель исследования – оценить состояние пролиферативных процессов в почке в различные сроки холодового воздействия на организм.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 240 крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 170-180 граммов. Холодовое воздействие осуществляли в климатокамере TV-1000 (Германия) по 23 часа в сутки при температуре 0 °С. Состояние регенераторных процессов оценивали с помощью комплекса методов. После определения величин митотического (МИ) и статмокинетического (СКИ) индексов в эпителии почечных канальцев рассчитывали продолжительность митоза. Методом проточной ДНК-цитометрии с помощью проточного цитометра (ЛОМО-ГОИ, Россия) определяли количество ДНК в ядрах клеток почечного эпителия с одновременным распределением анализируемой клеточной популяции по плоидности и фазам клеточного цикла. Рассчитывались временные параметры клеточного цикла. Для изучения ДНК-синтезирующей способности клеток почечного эпителия проводили радиоавтографическое исследование с ³Н-тимидином. Приготовление радиоавтографов осуществляли по стандартной методике с последующим расчетом индекса

меченных ядер (ИМЯ). Интенсивность синтеза ДНК изучали по включению ^3H -тимидина в почечную ткань с помощью радиометрического анализа, проведенного методом жидкостной сцинтилляции на счетчике СБС-2 (Россия). Об истинности прироста почечной ткани судили после выявления увеличения сухой массы органа, степень увеличения почки вычисляли по способу Addis.

Результаты и обсуждение. Состояние пролиферативных процессов в проксимальных канальцах изменяется в зависимости от продолжительности холодового воздействия на организм. В ранние сроки (1-14 сутки) действия холода обнаружено снижение пролиферативной активности, что проявляется в уменьшении величины пролиферативного пула за счет ДНК-синтезирующих клеток и уменьшения числа делящихся клеток. При этом, число клеток, находящихся в постсинтетическом периоде клеточного цикла, постепенно увеличивается, что меняет структуру пролиферативного пула. Так, если доля клеток, находящихся в постсинтетическом периоде в почках интактных животных составляет $6,5 \pm 0,5\%$, то у животных при холодовом воздействии – $15,4 \pm 2,4\%$ в 1 сутки, $21,6 \pm 3,2\%$ к 3 суткам и $25,0 \pm 2,8\%$ к 14 суткам от начала эксперимента. Такое перераспределение связано с изменением временных параметров клеточного цикла. Установленное увеличение продолжительности нахождения клеток в постсинтетическом периоде рассматривается большинством исследователей как развитие G_2 -блока вследствие стрессорной активности функции надпочечников, гормоны которых подавляют деление клеток, задерживая вступление их в митоз. Второй механизм снижения активности пролиферативных процессов при действии на организм животных холодового фактора заключается в торможении выхода клеток в митотический цикл за счет удлинения времени их нахождения в периоде покоя. В более поздние сроки холодового воздействия (40 суток) величина МИ возвращается к их исходным значениям. К 65 суткам МИ на $63,3 \pm 5,6\%$ превышает контрольные значения, величина пролиферативного пула клеток на $43,5 \pm 5,2\%$ выше контрольной, а в структуре последнего обнаружено увеличение числа ДНК-синтезирующих клеток и уменьшение доли клеток, находящихся в постсинтетическом периоде. Увеличение пролиферативного пула клеток связано со снижением продолжительности G_0 и G_1 периодов клеточного цикла с одновременным сокращением времени нахождения клеток в G_2 периода.

Заключение. Обнаруженное в проведенных исследованиях торможение процессов клеточной пролиферации, по-видимому, направлено на предупреждение вступления клеток в митоз во время холодового воздействия, т.к. его влияние на организм в этот период клеточного цикла может приводить к необратимым повреждениям аппарата деления клеток.

**ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА ОКОВИДИТ В СОСТАВЕ
КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ТЯЖЕЛЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РОГОВИЦЫ**

Миронова Э.М., Саркизова М.Б., Шормаз И.Н., Балабина О.В.

ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», Москва,

marbor52@mail.ru

**THE EXPERIENCE WITH THE DRUG OKOVIDI IN THE COMPLEX
THERAPY OF SEVERE CORNEAL DISEASES**

Mironova E.M., Sarkizova M.B., Shormaz I.N., Balabina O.V.

S.N.Fedorov «NMRC «MNTK «Eye Microsurgery», Moscow, marbor52@mail.ru

Введение. Офтальмологический препарат Оковидит ранее успешно зарекомендовал себя в качестве средства, направленного на регенерацию тканей глаза. Он улучшает обмен веществ и кровообращение, обладает репаративным и рассасывающим действием, способствует рассасыванию помутнений и более быстрому заживлению поврежденных различного происхождения (Миронова Э.М., Линник Е.А., Саркизова М.Б., 2003).

Учитывая хорошие результаты применения Оковидита при различной офтальмопатологии, препарат был использован в составе комплексной терапии при таких тяжёлых заболеваниях роговицы как язвы, течение и развитие которых может быть весьма переменчивым.

Цель исследования – проанализировать результаты применения препарата Оковидит в составе комплексной терапии тяжёлых заболеваний роговицы.

Материалы и методы. 3 глаза 3-х пациентов с язвенным поражением роговой оболочки. Локализация зоны дефекта, площадь патологического процесса, динамика отёка роговицы в процессе лечения прослеживались и оценивались с помощью передней оптической когерентной томографии (ОСТ) – пахиметрической карты и сканов роговицы на её сагиттальных срезах.

Результаты и обсуждение. Оковидит у пациентов с тяжёлой глазной патологией был применён в следующих случаях. Пациенту Б., 53 лет, был проведён в 2007 году на правом глазу LASIK в частной клинике по поводу миопии 7,5 дптр. В 2018 году пациент снова обратился в эту же клинику с жалобами на ухудшение зрения и прогрессирование астигматизма. Диагностирован кератоконус, в связи с чем был имплантирован интрастромальный сегмент. Со слов пациента, сразу же началось воспаление, лечение которого оказалось малоэффективным. Трудоспособность пациента резко снизилась. Пациент обратился в МНТК «Микрохирургия глаза», где был установлен диагноз: Острый иридоциклит, язва роговицы, протрузия роговичного сегмента. Острота зрения правого глаза

резко снижена до счёта пальцев у лица. Выражен роговичный синдром. Осуществлялось консервативное лечение в течение 3-х дней, после чего произведено удаление роговичного сегмента. По данным Visante OCT через 2 суток после удаления роговичного сегмента толщина роговицы в области язвенного дефекта равнялась 321 мкм. Толщина роговой оболочки в центральной зоне - 793 мкм. Оптическая плотность роговицы была диффузно повышена, что свидетельствовало о наличии отёка роговицы.

При обследовании в динамике через 1 месяц отёк роговой оболочки стал менее выраженным. С этим связаны меньшие значения толщины роговицы как в области язвенного дефекта – 262 мкм, так и в центральной зоне – 515 мкм. Степень помутнения роговицы также уменьшилась. Острота зрения – 0,1.

Спустя 2 месяца после удаления роговичного сегмента острота зрения составила 0,2. Степень выраженности роговичного синдрома значительно снизилась. Пациент начал работать в полном объёме. OCT-исследование свидетельствовало об уменьшении отёка роговицы. Толщина центральной зоны роговой оболочки – 487 мкм. При этом прослеживались процессы регенерации язвенного дефекта. Толщина роговой оболочки в зоне дефекта увеличилась до 420 мкм. Прозрачность роговой оболочки по периферии восстановилась полностью и увеличилась в центральной и парацентральной зонах.

Интересен случай применения Оковидита и при поражении центральной зоны роговицы. Больная Т., 50 лет. Обратилась с диагнозом: Герпетическая язва роговицы, кератоувеит. За 3 недели комплексной терапии с применением Оковидита отмечалась положительная динамика. Толщина роговой оболочки в центральной зоне уменьшилась с 1350 мкм до 926 мкм. Переносимость препарата хорошая.

Имеется опыт использования Оковидита у пациентки Г., 58 лет с исходом герпетической язвы роговицы в десцеметоцеле. Оковидит в данном случае применялся как до сквозной пересадки роговой оболочки в составе противовоспалительной терапии, так и после трансплантации для улучшения регенерации и устранения воспаления, отёка в послеоперационном периоде.

У всех трех пациентов отмечали эффективность проводимого лечения. Оказывалось противовоспалительное действие, уменьшался отек роговой оболочки, улучшалась регенерация. Ускорялась ранее вялая эпителизация дефекта, отмечались увеличение прозрачности и уменьшение толщины роговой оболочки.

Переносимость препарата была хорошая.

Заключение. Опыт применения препарата Оковидит в составе комплексной терапии тяжелых заболеваний роговицы является положительным, что свидетельствует о возможности и целесообразности его использования при данной патологии.

**ВЛИЯНИЕ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СКЛЕРЫ ГЛАЗА БЫКА
НА 3D-НОСИТЕЛЕ НА СОСТОЯНИЕ ТКАНЕЙ ЗАДНЕГО ОТДЕЛА ГЛАЗА
ТРИТОНА *IN VITRO***

Сидорский Е.В.

*ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН,
Москва*

ООО Институт проблем биорегуляции, Москва, sneegr@gmail.com

**EFFECT OF THE BIOREGULATOR ON A 3D-CARRIER ON THE CONDITION OF
THE TISSUES IN THE BACK OF THE EYE NEWT *IN VITRO***

Sidorsky E.V.

*A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
Moscow,*

Institute for Bioregulation Problems, Moscow, sneegr@gmail.com

Введение. Склера обеспечивает внутриглазное давление и является защитным каркасом для тканей глаза. Прочность склеры определяют высокомолекулярные структуры коллагена, эластина, которые синтезируют фибробласты, часть которых является клеточными источниками регенерации, способными к пролиферации и дифференцировке. Именно за их счет происходит быстрая регенерация ткани склеры. Увеличению жизнеспособности фибробластов и сохранению пространственной организации ткани способствует биорегулятор, обнаруженный в склере глаза крупного рогатого скота (КРС). Его действие характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Основой данного биорегулятора является пептидно-белковый комплекс, в состав которого входят биологически активные пептиды (мол. масса 1300-5100 Да) и изоформа сывороточного альбумина под номером gi | 1351907 в базе данных Uniprot. Белковые криогели успешно использовались в качестве носителей биорегуляторов для индукции регенерации костной ткани. Целью исследования было изучение действия биорегулятора, выделенного из склеры глаза КРС и введенного в 3D-носитель, на состояние склеры и тканей заднего отдела глаза (сетчатка, пигментный эпителий, сосудистая оболочка) в условиях стационарного органотипического культивирования *in vitro*. В роли 3D-носителя исследовали криогель, синтезированный на основе белков сыворотки крови.

Материалы и методы. Изучали биологическое действие двух биорегуляторов, выделенных одинаковым способом из ткани склеры глаза и сыворотки крови быка (10^{-8} мг белка/мл), введенных в структуру криогелей, приготовленных на основе белков сыворотки крови быка. Исследование проводили на взрослых половозрелых тритонах *Pl. waltil* обоего

пола. Энуклеированные глаза помещали в чашки Петри с питательной средой для амфибий (среда 199–70%, вода дистиллированная – 30%) и приготавливали задние секторы глаз, которые культивировали в питательной среде: 350 мл 199 среды, 150 мл бидистиллированной воды, 0.15 мл 1.0 М буфера HEPES, 1 мл 1%-ного гентамицина, 0,5 мл антибиотик/антимикотик. Задние секторы использовали в шести экспериментальных группах: №1-питательная среда; №2-питательная среда, задние секторы глаз помещали на 3D-носитель; №3-питательная среда+100 мкл биорегулятора из сыворотки крови; №4-питательная среда+3D-носитель, пропитанный биорегулятором из сыворотки крови; №5-питательная среда+100 мкл биорегулятора из склеры; №6-питательная среда+3D-носитель, пропитанный биорегулятором из склеры. Культивирование проводили стационарно в темноте при температуре 20–22 °С в течение 72 ч, без смены культуральной среды. Изучение состояния эксплантатов, после культивирования проводили на сериях парафиновых срезов. Количество жизнеспособных фибробластов в ткани склеры относительно площади всего среза определяли в программе *ImageJ*. Для каждой экспериментальной точки было исследовано не менее 30 секций. Результаты обработаны по критерию Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение. Наилучшее состояние изучаемых тканей глаза наблюдалась в группе №6. В склере не было выраженных изменений деградации тканей, как это было обнаружено в других группах. Плотное расположение коллагеновых волокон с менее заметными расслоениями свидетельствует о регенерации соединительной ткани. Не наблюдалось отслоения сетчатки от пигментного эпителия, в котором пигмент был распределен равномерно и компактно. Сосудистая оболочка сохранилась, плотная, без признаков деградации. В группах №3 и №4 наблюдалась картина деградации тканей: образование полостей в коллагеновых волокнах, отслоение сетчатки от пигментного эпителия. Полученные данные указывают на тканеспецифический характер действия биорегулятора, выделенного из ткани склеры. Количество фибробластов в группах №5 и №6 достоверно выше по сравнению с остальными экспериментальными группами и вдвое больше, чем в контрольной. Также следует отметить, что использование криогеля усиливало протекторное действие биорегулятора: этот эффект проявляется в достоверном различии количества фибробластов между группами №1 и №2, №3 и №4, №5 и №6.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что биорегулятор, выделенный из ткани склеральной оболочки КРС и введенный в 3D-носитель, оказывал выраженное протекторное действие на состояние склеры, сосудистой оболочки, пигментного эпителия и сетчатки глаза в условиях органотипического культивирования *in vitro*.

**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, CAR-T ТЕРАПИЯ И АНТАГОНИСТЫ D₂
ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ: ВОЗМОЖНА ЛИ ПОЛИТЕРАПИЯ
МЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО С ИХ УЧАСТИЕМ?**

Скурихин Е.Г.¹, Дыгай А.М.^{1,2}

¹ *НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга «Томского
НИМЦ РАН»*

² *Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва*

**STEM CELLS, CAR-T THERAPY AND D₂ DOPAMINE RECEPTOR
ANTAGONISTS: IS SMALL CELL LUNG CANCER POLYTHERAPY POSSIBLE WITH
THEIR PARTICIPATION?**

Skurikhin E.G. ¹, Dygay A.M. ^{1,2}

¹ *Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg
"Tomsk NIMTs RAS"*

² *Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow*

Введение. Мелкоклеточный рак лёгкого (МКРЛ) составляет 10-15% всех известных случаев рака лёгкого и принадлежит к числу самых злокачественных опухолей. МКРЛ отличает короткий анамнез, скрытое и быстрое течение, раннее метастазирование. Наибольшая заболеваемость МКРЛ наблюдается в возрастной группе 40-60 лет. Все типы мелкоклеточного рака имеют неблагоприятный прогноз даже в тех случаях, когда диагноз был поставлен на ранней стадии. В подавляющем большинстве случаев МКРЛ развивается у курящих пациентов. Курение провоцирует развитие хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ). У пациентов с ХОБЛ рак лёгкого является серьезным осложнением и составляет примерно 15% случаев смертей. Используемые в клинике подходы лечения МКРЛ (хирургическое лечение, лучевая терапия и химиотерапия) не приводят к выздоровлению больного. До сих пор не нашла своего применения в лечении МКРЛ CAR-T терапия, которая эффективна при лечении других опухолей. Основной причиной прогрессии МКРЛ называют высокую мутационную нагрузку этой опухоли с интенсивным обновлением опухолевых антигенов. *Цель исследования.* Изучить возможность использования стволовых клеток, CAR-T-клеток и антагонистов D₂ дофаминовых рецепторов в лечении мелкоклеточного рака лёгкого у пациентов с ХОБЛ.

Материал и методы. В аналитическом разделе НИР использовались международные информационные базы данных (ESMO, National Cancer Institute, ClinicalTrials, Pubmed, Scopus) в целях поиска потенциальных молекулярных маркеров для идентификации стволовых опухолевых клеток (СОК), перспективных Т-клеток для создания на их основе

CAR платформы, подходов усиления эффектов CAR-T терапии при МКРЛ. В экспериментальном разделе НИР использовались мыши линии C57BL/6 (отдел биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга «Томского НИМЦ РАН»). ЛПС (США) и экстрактом сигаретного дыма (лаб. регенеративной фармакологии НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга «Томского НИМЦ РАН») моделировали эмфизему лёгких. Объектом исследования выступали стволовые клетки (СК) различного происхождения и локализации, и блокатор D₂-дофаминовых рецепторов спиперон (США). Использовались гистологические и иммуногистохимические методы исследования препаратов органов и тканей, ИФА биологических проб, методы проточной цитофлуометрии для оценки антигенов, культуральные методы получения и оценки первичных культур стволовых клеток.

Результаты и обсуждение. В своём сообщении мы обратили своё внимание на МКРЛ у пациентов с ХОБЛ. Анализ данных литературы и собственных результатов позволил выдвинуть гипотезу, что более целесообразным и эффективным представляется предотвращать МКРЛ на этапе опухолевой трансформации здоровых клеток, чем лечить МКРЛ, при этом клеточным маркером трансформации могут выступать циркулирующие СОК. Для идентификации СОК у пациентов с ХОБЛ при precancerous condition предлагаются CD133, CD87, CD44, CD117, ALDH, Sox2, CRYPTO-1. Появление одного или группы диагностических маркеров СОК в крови выступает сигналом для проведения CAR-T терапии. Хорошо зарекомендовавшие себя в других исследованиях CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-клетки крови пациентов предлагаются в качестве основы CAR. Не все опухолевые антигены экспрессируются или экспрессируются с одинаковой активностью. При выборе мишени-СОК следует обращать внимание на значительно экспрессирующиеся антигены, которые как правило совпадают с антигенами, прогрессирующей опухоли лёгких. Соблюдение этого требования ставит нас на платформу персонализации профилактики и лечения МКРЛ с начала обнаружения СОК в крови пациента с ХОБЛ. Усиление эффекта CAR-T терапии мы видим в дополнительном «смещении» соотношения СОК / СК в сторону «здоровых» стволовых клеток. Это может быть достигнуто ускорением регенерации эндотелия лёгких. Использование хемокинов и ростовых факторов в этих целях может спровоцировать неоангиогенез опухоли и её прогрессию. В этой связи для ускорения регенерации эндотелия предлагается новый подход, основанный на использовании антагонистов дофаминовых D₂ рецепторов. По нашим данным, антагонист дофаминовых D₂ рецепторов спиперон ускоряет рекрутирование СК ангиогенеза в лёгкие с эмфиземой. Закономерным результатом такой терапии выступает регенерация микрососудистой сети лёгких.

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭПИФИЗАРНОЙ И ТКАНЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ В
ФОРМИРОВАНИИ РИТМОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ**

Слесарев С.М., Слесарева Е.В.

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Sergey.SI@mail.ru

**RELATIONSHIP BETWEEN EPIPHYSEAL AND TISSUE REGULATION IN THE
FORMATION OF PROLIFERATION RHYTHMS**

Slesarev S.M., Slesareva E.V.

Ulyanovsk State University, Sergey.SI@mail.ru

Введение. Одним из актуальных вопросов современной биологии является выяснение механизмов регуляции пролиферации. Изучение данной проблемы имеет большое значение для понимания процессов онтогенетического развития, физиологической и репаративной регенерации, поддержания структурного гомеостаза тканей, а также развития злокачественных новообразований. Выяснение механизмов контроля деления клеток может позволить в будущем приблизиться к осуществлению их направленной регуляции, что является, несомненно, важным для практической медицины и биологии.

Регуляцию пролиферации на уровне организма осуществляют эндокринная, нервная и иммунная системы. Основным внутрисистемным регулятором митотической активности тканей является кейлон-антикейлонная система. Изучение взаимосвязи организменного и тканевого уровней регуляции биоритмов пролиферации имеет несомненный теоретический и практический интерес.

Цель исследования – изучить взаимосвязь эпифизарной и тканевой регуляции в формировании ритмов пролиферации.

Материалы и методы. Опыты выполнены на 420 самцах беспородных белых крыс, которых содержали при фиксированном режиме освещения. Для достижения поставленной цели животных разделили на три группы: 1) интактные контрольные; 2) эпифизэктомированные; 3) эпифизэктомированные с последующим введением эпиталамина – укусноокислого экстракта эпифизов крупного рогатого скота, содержащего его биологически активные пептиды. Эпиталамин вводили подкожно ежедневно с 26-го по 41-й день после эпифизэктомии в 18 часов в дозе 2,5 мг/кг. Декапитацию животных производили на 40 – 41-й день после эпифизэктомии через каждые три часа в течение двух суток.

В качестве моделей для изучения роли эпифиза в формировании циркадианного ритма пролиферации были выбраны эпителий пищевода, герминативный центр лимфатического фолликула трахеобронхиальных лимфатических узлов и сперматогонии типа б. Для изучения роли эпифиза в формировании циркадианного ритма продукции тканевых регуляторов

пролиферации исследовали антирадикальную активность кейлон-антикейлонных экстрактов печени белых крыс

Результаты и обсуждение. У интактных животных динамика митотического индекса (МИ) всех изученных нами тканей и антирадикальной активности кейлон-антикейлонной системы имеет характер монофазного суточного ритма. Эпифизэктомия привела к исчезновению циркадианного ритма МИ всех изучавшихся видов тканей, а также исчезновению циркадианного ритма антирадикальной активности кейлон-антикейлонной системы. Введение пептидов эпифиза эпифизэктомированным животным привело к восстановлению циркадианного ритма пролиферации всех изученных тканей и циркадианного ритма антирадикальной активности кейлон-антикейлонной системы.

Заключение. Между ритмами митотической активности и ритмами продукции тканевых регуляторов пролиферации существует определенная взаимосвязь. Активная фаза ритма антирадикальной активности кейлон-антикейлонной системы предшествует повышению митотической активности тканей. Пассивная фаза ритма наблюдается на фоне снижения митотической активности. Так как продукция тканевых регуляторов имеет циркадианный характер, с активной фазой продукции кейлонов в дневные часы, а антикейлонов в ночные, то и биоритм пролиферации приобретает соответствующую характеристику.

Исчезновение циркадианного биоритма антирадикальной активности кейлон-антикейлонной системы в результате эпифизэктомии и его восстановление после введения пептидов эпифиза указывает на возможность формирования эпифизом циркадианного ритма митотической активности тканей путем модуляции циркадианного ритма продукции тканевых регуляторов размножения клеток.

РЕГЕНЕРАЦИЯ В ТКАНЯХ ЛЕГКИХ ПРИ COVID-19

*Деев Р. В., Студеникина Е. Д., Винничук С.А., Асауленко З. П., Мавликеев М. О.,
Кабоев Ф. Т., Шидловская Е. И., Абдрахманов А. В.*

*ФГБОУ ВО "Северо-Западный государственный медицинский университет им.И.И.
Мечникова", Санкт-Петербург*

REGENERATION IN LUNG TISSUES IN COVID-19

*Deev R. V., Studenikina E. D., Vinnichuk S.A., Asaulenko Z. P., Mavlikeev M. O., Kaboev
F. T., Shydlovskaya E. I., Abdrakhmanov A. V.*

I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint-Petersburg

Введение. У пациентов с тяжелыми формами новой коронавирусной инфекции, возбудителем которой является вирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2), умерших после госпитализации в отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и находящихся там более двух недель, при патогистологическом исследовании легких закономерно обнаруживаются признаки повреждения тканевых структур, вероятно, за счет прямого вирусного воздействия, влияния цитокинов и иммунных реакций. Однако параллельно с явлениями повреждения детектируются явления регенерации. Исследование закономерностей репарации легких позволит прогнозировать исходы диффузного альвеолярного повреждения, вырабатывать меры лечебного воздействия для улучшения прогноза и профилактики отдаленных легочных осложнений у таких пациентов.

Цель исследования. Изучить на выборке секционных наблюдений особенности регенерации тканей легких у пациентов с тяжелыми формами новой коронавирусной инфекции.

Материалы и методы. Исследование включило материал 111 аутопсий с лабораторно подтвержденным вирусом SARS-CoV-2, среди которых было отобрано: 98 случаев со сроком госпитализации до 10 дней; 7 – от 11 до 20 дней; 4 случая – больше 20 дней. Изучение медицинской документации, данных прижизненных инструментальных исследований, тканевого материала, полученного в ходе аутопсии.

Гистологическое исследование: срезы препаратов легких окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, орсеином. Иммуногистохимическое исследование включало реакции с антителами к ACE2, TMPRSS2, Ki-67, цитокератинами (СК) 5/6, 7, 19, CD68.

Результаты и обсуждения. Потенциальное рецепторное поле для внутриклеточного проникновения вируса выявлено в большом числе клеток легких: альвеолах, гистоцитах (легочных макрофагах), эндотелиоцитах кровеносных сосудов. На ранних сроках

пребывания пациента в ОРИТ в тканях легких прогрессирует повреждение клеточных и тканевых структур с привлечением в активированных клеток гистиоцитарного ряда, а также лимфоцитов, участвующих в альтерации. Вместе с тем, в строме органа детектируются единичные Ki67-положительные клетки, сохранные альвеолоциты и эпителий бронхов относительно равномерно окрашиваются СК 7 и 19.

После 10 дня госпитализации пациентов с тяжелой формой COVID-инфекции в легких обнаружены патогистологические признаки пролиферативной фазы диффузного альвеолярного повреждения, с более интенсивным индексом пролиферации (по Ki-67) стромальных клеточных компонентов, а также эпителия, который частично характеризовался наличием СК 5/6 в составе цитоскелета. Детектируются участки полиморфноклеточного строения, с накоплением межклеточного матрикса и большим числом микрососудов, данные участки расценены как очаги развития грануляционной ткани.

После 21 суток выявлено массивное фиброзирование легочной ткани с развитием пневмосклероза и карнификации легких с гиперплазией эпителиальной выстилки бронхов и альвеол, в ряде случаев с формированием многослойных тяжей эпителия - плоскоклеточной метаплазией, а также образованием эпителиальных структур железистого строения (аденоматоз) со своеобразным иммуноморфологическим профилем. Следует отметить, что на всех сроках отмечено большое число CD68-положительных гистиоцитов. Эластический каркас органа существенно изменен по сравнению с нормой.

Выводы. Таким образом, регенерационные процессы в тканях легких у пациентов с тяжелыми формами новой коронавирусной инфекцией в случае неблагоприятного исхода развиваются по пути, который может быть расценен как патологическая репаративная регенерация; ее исходом становится организация фибринозного экссудата с развитием элементов грануляционной ткани и последующим пневмофиброзом и карнификацией. Регенерация альвеолярного эпителия в ряде случаев к моменту смерти приводит к образованию метапластических структур – пластов многослойного эпителия или участков аденоматоза легкого. Требуется дальнейшего изучения роль различных функциональных типов макрофагов (M1/M2) в регуляции этих процессов.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
КЛЕТОК, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИПСК ЧЕЛОВЕКА В
МЕЗОДЕРМАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ, ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ**

Суздальцева Ю.Г.

ФГБУН ИОГен РАН, г. Москва, iogen(at)vigg.ru

**CHARACTERIZATION OF iPSCs- BASED MESODERMAL CELL FUNCTIONAL
ACTIVITY FOR STUDYING MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING TISSUE
REGENERATION**

Suzdaltseva Y. G

Vavilov Institute of General Genetics (VIGG) RAS, Moscow, iogen(at)vigg.ru

Введение. Показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) активно участвуют во всех фазах восстановления поврежденной ткани, благодаря своей способности динамично менять свой экспрессионно-секреторный профиль в зависимости от микроокружения и выполнять в очаге воспаления регуляторную функцию. Известно, что до третьего триместра беременности заживление ран фетальной кожи происходит в отсутствие воспалительного процесса с полным восстановлением архитектуры, организации и функциональных свойств. Однако регенеративный потенциал снижается с возрастом и во взрослом организме заживление повреждений происходит, как правило, с образованием рубца. Изучение фундаментальных механизмов заживления фетальных тканей позволило бы выявить терапевтические мишени, способные минимизировать не только образование рубцов, но также стимулировать регенеративные процессы в очагах хронического воспаления. Новые технологии, основанные на использовании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), позволяют создать клеточные модели для изучения молекулярных механизмов регенерации на различных стадиях развития организма. Целью настоящей работы явилось исследование изменения фенотипа и функциональной активности клеток в процессе дифференциации из ИПСК в мезодермальном направлении.

Материалы и методы. В работе были использованы методы выделения и культивирования клеток, выделенных из различных тканей человека, метод проточной цитофлуориметрии, ПЦР с обратной транскрипцией, гистохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание клеток.

Результаты и обсуждение. В данной работе культивируемые фибробласты кожи были репрограммированы факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc с использованием

рекомбинантных вирусов Сендая в плюрипотентное состояние. Полученные ИПСК были охарактеризованы по морфологии, поверхностным антигенам (SSEA4, TRA-1-60/81), экспрессии транскрипционных факторов (ОСТ4, NANOG, SOX2) и способности в процессе дифференцировки *in vitro* экспрессировать маркеры эктодермы (PAX6, SOX1), эндодермы (CXCR4 и SOX17) и мезодермы (RUNX1, BRY). Затем ИПСК с использованием комбинации специфических ингибиторов, факторов роста, биологически активных и «маленьких» молекул были дифференцированы в предшественники мезенхимальных клеток, охарактеризованные по экспрессии маркеров ранней мезодермы BRY, Snail, TBX6, MIXL1 и отсутствию маркеров плюрипотентности ОСТ4, NANOG, SOX2. Дифференцировка ИПСК в среде с содержанием фетальной бычьей сыворотки приводила к генерации ММСК с высоким уровнем экспрессии специфических поверхностных маркеров (CD90, CD73, CD105) и высокой активностью в отношении адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировки. Таким образом, установлены фенотипические и функциональные особенности между ИПСК, клетками ранней мезодермы и зрелыми ММСК, полученными из одного источника в результате дифференцировки в мезодермальном направлении.

Заключение. Разработанные модели клеточные модели позволят изучать молекулярные механизмы регенерации тканей, присущие разным стадиям развития организма, и сформировать основу для создания инновационных лекарственных средств.

.СТАБИЛЬНОСТЬ ЦИТОКИНОВ В БЕССЫВОРОТОЧНОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ, КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ ДЕРМАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРАНЕНИЯ

Супильникова О.В.^{1,2}, Енукашвили Н.И.^{1,3} Юркевич Ю.В.¹, Приходько Е.М.^{1,2}

¹ *Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург*

² *ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург*

³ *ФГБУН Институт цитологии, Санкт-Петербург, supilnikova@pokrovcell.ru*

CYTOKINES STABILITY DURING STORAGE OF SERUM-FREE, XENO-FREE CELL CULTURE MEDIUM CONDITIONED BY HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

Supilnikova O.V.^{1,2}, Enukashvily, N. I. ^{1,3}, Yurkevich Yu. V.¹, Prikhodko E.M.^{1,2}

¹ *Pokrovsky stem cell bank, Saint Petersburg*

² *North-West State Medical University named after I. I. Mechnikoff, Saint Petersburg*

³ *Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, supilnikova@pokrovcell.ru*

Введение. Признанным направлением использования клеточных технологий в комбустиологии является трансплантация культивируемых in vitro аллогенных фибробластов. В основе ранозаживляющего действия лежит продукция аллофибробластами экстрацеллюлярного матрикса, факторов роста, цитокинов, направленная на восстановление как эпидермального, так и дермального компонентов кожи. Тем не менее, существенным лимитирующим фактором широкого практического внедрения препаратов, содержащих жизнеспособные культивированные клетки, остается их ограниченный срок годности, не превышающий 24-48 ч. Данная ситуация значительно нарушает общепринятые принципы оформления заказа и доставки, «привязывает» ЛПУ к биотехнологическим центрам, число которых весьма ограничено даже в крупных административных центрах. Решение проблемы может заключаться в разработке биомедицинских препаратов на основе секрета культивируемых клеток, что позволит значительно увеличить сроки их хранения. Применительно к рассматриваемой задаче создания раневых покрытий с высоким регенеративным потенциалом данное направление может быть реализовано получением продуктов, секретлируемых дермальными фибробластами в ростовую среду в процессе культивирования.

Цель работы - оценка содержания ангиогенных (VEGF), провоспалительных (INF-g, ИЛ-2, ИЛ-4) и противовоспалительных (ИЛ-10, ИЛ-6) цитокинов в кондиционированной среде, полученной в результате культивирования в ней аллофибробластов человека, при различных сроках и условиях хранения.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись кондиционированные

среды: бессывороточная StemPro™ MSC SFM XenoFree и DMEM Low Glucose+10% FBS, полученные после культивирования в них фибробластов человека в течение 3 суток. Культуральную среду собирали с соблюдением условий стерильности. Часть собранной среды использовали для оценки качества препаратов (отсутствие бактериальной и грибковой контаминации, контаминации микоплазмами, отсутствие возбудителей ВИЧ 1/2, ВГВ, ВГС). Для определения цитокинов использовали диагностические тест-системы ЗАО «Вектор-Бест». Принцип анализа - «sandwich»-вариант твердофазного трехстадийного иммуноферментного анализа на 96-луночных планшетах. Учёт результатов проводился спектрофотометрически на длине волны 450 нм и 620 нм. Экспонирование кондиционированных сред проводили в течение 7 и 45 суток при температурах +22°C, +4°C, -20°C, а также до и после лиофилизации.

Результаты и обсуждение. Хранение кондиционированной среды в течение 7 суток в условиях комнатной температуры (+18 - +22°C) и морозильной камеры (-20°C) сопровождается снижением (на 25%, $p < 0,05$) концентрации отдельных цитокинов (IL-2, IL-10). Продолжительное хранение кондиционированной среды в морозильной камере (при -20°C на протяжении 45 суток) приводит к снижению содержания в образцах всех исследуемых цитокинов в пределах 30% исходных значений. Активность цитокинов в условиях хранения при температуре +4°C отличается наименьшими изменениями, что указывает на возможность температурной стабилизации секретируемых клеточных продуктов при хранении в условиях бытового холодильника и необходимости соблюдения правил «холодовой цепи» в диапазоне температур +4°C. Содержание цитокинов в кондиционированных средах после лиофилизации отличается наиболее высокой сохранностью, что обуславливает целесообразность проведения исследований по разработке лиофилизированных форм раневых покрытий на основе секретируемых клеточных продуктов.

**УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕЛОЦИТОВ ПРИ АРИТМОГЕННОМ РЕМОДЕЛИРОВАНИИ
ИНТЕРСТИЦИЯ МИОКАРДА ПРЕДСЕРДИЙ ЧЕЛОВЕКА**

Сухачева Т.В.¹, Низяева Н.В.², Щеголев А.И.², Серов Р.А.¹

¹ФГБУ НМИЦ ССХ имени А.Н. Бакулева, Москва, sukhachevat@gmail.com

²ФГБУ НМИЦ Акушерства, Гинекологии и Перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва

**ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS
OF TELOCYTES IN ARRHYTHMOGENIC REMODELING OF HUMAN ATRIAL
MYOCARDIAL INTERSTITIUM**

Sukhacheva T.V.¹, Nizyaeva N.V.², Shchegolev A.I.², Serov R.A.¹

¹A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery, Moscow

sukhachevat@gmail.com

²V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and
Perinatology, Moscow

Введение. Телоциты (ТЦ) – уникальный тип мезенхимальных стволовых клеток, содержащих длинные тонкие отростки, которые окружают все компоненты стромы и обеспечивают связь между ними. ТЦ координируют информацию, полученную от клеток сосудистой, нервной и иммунной систем, соединительно-тканых клеток интерстициального пространства и рабочих кардиомиоцитов. Предполагается, что эти клетки участвуют в ангиогенезе, являются одним из компонентов ниши стволовых клеток и определяют локализацию и дифференцировку стволовых клеток в процессах роста и регенерации сердечной мышечной ткани. У пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП) ремоделирование миокарда предсердий приводит к увеличению площади интерстициального и периваскулярного фиброза, развитию изолированного амилоидоза предсердий, вызванного накоплением в интерстиции фибриллярной формы предсердного натрийуретического пептида (ANP). Отложение амилоида в миокарде предсердий пациентов с ФП препятствует осуществлению контактов между клетками и проведению электрического импульса. Цель исследования: определить роль ТЦ в аритмогенном ремоделировании миокарда предсердий пациентов с ФП.

Материалы и методы. Проведено исследование биоптатов миокарда ушек левого (УЛП) и правого (УПП) предсердий 55 взрослых пациентов с ФП (продолжительность ФП 6 мес.–27 лет), в возрасте 24-71 года, полученных во время операции радиочастотной абляции. На световом уровне определена доля фиброза, измерен диаметр кардиомиоцитов, на ультраструктурном уровне ($\times 4800$) по 4-балльной шкале определено содержание ТЦ.

Проведено иммуногистохимическое исследование с использованием маркеров CD117, виментин, CD34, CD44, CD105, S100, CD16, CD68, ANP. Полученные результаты сопоставлены с данными клиники пациентов с использованием методов непараметрической статистики.

Результаты и обсуждение. Миокард пациентов с ФП характеризуется значительными склеротическими изменениями, доля фиброза достигает 46,7-47,1% в миокарде УЛП и 46,9-47,7% в миокарде УПП. Кроме того, в миокарде 18,6% (УЛП) и 30,5% (УПП) пациентов старшего возраста с ФП обнаружены признаки ANP⁺ изолированного амилоидоза предсердий. Кардиомиоциты умеренно гипертрофированы, их средний диаметр составляет 15,5-16,6 мкм (УЛП) и 15,3-16,5 мкм (УПП). На ультраструктурном уровне в миокарде предсердий идентифицированы ТЦ веретеновидной/звездчатой формы, диаметр которых составляет 0,8-3,4 мкм, с длинными отростками, толщиной 0,03-1,92 мкм, которыми они контактируют друг с другом. Отростки ТЦ имеют зоны локальных расширений, содержащих митохондрии, цистерны гладкого и гранулярного эндоплазматического ретикулума, везикулы. В миокарде 39,3% (УЛП) и 52% (УПП) пациентов с ФП в цитоплазме ТЦ зарегистрировано накопление липидных включений. Содержание ТЦ в миокарде УЛП достоверно ниже, чем в миокарде УПП ($p < 0,05$) и коррелирует с продолжительностью ФП ($r = 0,50$; $p = 0,0035$) и наличием изолированного амилоидоза предсердий у пациентов с ФП ($p < 0,05$). ТЦ миокарда ушка предсердий пациентов с ФП экспрессируют маркеры стволовых клеток (CD117⁺), фибробластоподобных клеток (виментин⁺), гемопоэтических стволовых клеток (CD34⁺) и белка клеточной адгезии (CD44⁺) и не экспрессируют маркеры эндотелиальных (CD105⁻) и нервных клеток (S100⁻). Кроме того, в интерстиции миокарда предсердий выявлены маркеры гистиоцитов CD16⁺ и CD68⁺. Они экспрессируются как в макрофагах округлой формы, так и в веретенообразных ТЦ, расположенных в интерстиции. Макрофагальная активность ТЦ миокарда предсердий отмечена преимущественно у пациентов с амилоидозом и ФП, чем у пациентов с ФП без амилоидоза ($p < 0,05$).

Заключение. Интерстициальная ткань миокарда предсердий пациентов с ФП подвергается значительным морфологическим изменениям – нарушается её тканевая архитектура, увеличивается площадь интерстициального фиброза, развивается изолированный амилоидоз предсердий. Аритмогенное ремоделирование интерстициальной ткани миокарда сопряжено с трансформацией ТЦ и появлением их «переходных форм», сочетающих морфологические и иммуногистохимические характеристики стволовых клеток с признаками эндотелиоцитов, фибробластоподобных и гистиоцитоподобных клеток.

**КЛЕТКИ ФЕТАЛЬНОГО НЕОКОРТЕКСА МЫШИ ФОРМИРУЮТ
ОРГАНОИДЫ IN VIVO**

Сухинич К.К.¹, Шакирова К.М.², Дашинимаев Э.Б.^{1,2}, Александрова М.А.¹

*¹ФГБУН Институт Биологии Развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва,
sukhinich@idbras.ru*

²ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

MOUSE FETAL NEOCORTEX CELLS FORM THE ORGANOIDS IN VIVO

Sukhinich K.K.¹, Shakirova K.M.², Dashinimaev E.B.^{1,2}, Aleksandrova M.A.¹

*¹Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, sukhinich@idbras.ru*

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Введение. Регенерация поддерживается механизмами, которые определяются в процессах развития организма. Для выявления ранних этапов формирования мозга человека предложена модель церебральных органоидов. Церебральные органоиды — это трехмерные культуры, состоящие из специфичных для мозга типов клеток, полученных из эмбриональных или плюрипотентных стволовых клеток. Органоиды дают возможность изучения ранних этапов развития мозга и заболеваний центральной нервной системы. Однако моделирование органоидов связано с рядом пока не решенных методических и тканеспецифических задач. Среди них, сложный и дорогостоящий процесс культивирования клеток, и отсутствие в органоидах васкуляризации и некоторых типов клеток, специфичных для мозга. В связи с чем, *целью исследования* было получение и изучение самоорганизации органоидов, развивающихся в ликворе желудочков мозга взрослой мыши из трансплантированных клеток фетального неокортекса.

Материалы и методы. Неокортекс эмбрионов мыши Э14.5 линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J, охарактеризовали методами ОТ-ПЦР и иммуногистохимии. Затем приготовили суспензию клеток и 1.5 мкл стереотаксически трансплантировали в боковой желудочек мозга взрослых мышей (n = 9) в концентрации 200 тыс. клеток в 1 мкл в растворе Хенкса. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование органоидов проводили через 5, 30 и 90 дней после операции.

Результаты и обсуждение. Неокортекс эмбрионов мышей на стадии Э14,5 представлен нейральными стволовыми/прогениторными клетками, а также незрелыми нейронами. Его клетки экспрессируют нейрональные маркеры TUBB3, DCX, маркеры нейральных предшественников Sox2, Pax6, Nestin, экспрессия маркера зрелых нейронов NeuN крайне низка, а маркер астроцитов GFAP не выявляется. Морфологическое

исследование через 5 суток после операции показало присутствие объемного клеточного агрегата в желудочке мозга, в котором клетки имели положительную реакцию к DCX, что указывает на процессы их миграции. На 30 сутки в центре органоида были выявлены зрелые нейроны положительные к NeuN. По периферии была определена маргинальная зона без NeuN⁺ нейронов по краю которой выявлялся слой астроцитов (GFAP⁺), напоминающий пограничную глиальную мембрану (glia limitans). Помимо плотного пограничного слоя астроциты были равномерно распределены по органоиду. На 90 сутки органоид был хорошо структурирован и развит, его центральную область занимали NeuN⁺ нейроны, которые располагались менее плотно в центре и более плотно на периферии центральной области. DCX⁺ нейронов в органоиде не было выявлено, хотя выявлялись Sox2⁺ клетки. Крайне важным наблюдением является наличие положительной иммуногистохимической реакции к синаптофизину во всем органоиде, причем без выраженной границы между реципиентом и трансплантатом. Распределение астроцитов (GFAP⁺) имело характерный паттерн: равномерное по органоиду и скопление в зоне glia limitans между органоидом и желудочком мозга реципиента. Глиальный рубец между трансплантатом и реципиентом не выявлялся. Особый интерес представляет васкуляризация органоида со стороны ткани мозга реципиента, детектированная с помощью лектина, конъюгированного с флуорохромом. Таким образом, доказана возможность развития васкуляризованных органоидов из клеток фетального неокортекса мышей в желудочках мозга *in vivo*.

Заключение. Исследование церебральных органоидов имеет большое значение для фундаментальной науки и медицины. В настоящей работе представлен альтернативный подход по созданию церебральных органоидов: культивирование органоидов в полостях желудочка мозга экспериментальных животных *in vivo*. В этом случае можно использовать уже коммитированные типы клеток без специальных питательных сред, которые заменяются спинномозговой жидкостью. Формирование органоида с выраженной citoархитектоникой происходит в течение 90 дней. Таким образом, желудочки мозга мыши могут служить инкубатором для развития васкуляризованных трехмерных органоидов. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН, а также частично была выполнена на оборудовании Центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-74-00117.

НАНОВОЛОКНИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И ЖЕЛАТИНА: ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ

*Тенчурин Т.Х., Сытина Е.В., Крашенинников С.В., Соловьева Е.В., Пантелеев А.А.,
Чвалун С.Н.*

ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

COLLAGEN- AND GELATIN-BASED NANOFIBROUS MATERIALS: FABRICATION METHODOLOGY AND COMPARATIVE CHARACTERIZATION

*Tenchurin T.Kh., Sytina E.V., Krashennnikov S.V., Solovieva E.V., Panteleyev A.A.,
Chvalun S.N.*

*Kurchatov complex of NBICS technologies, National Research Centre «Kurchatov Institute»,
Moscow*

Введение. Электроформование коллагена сопряжено с рядом методических трудностей, связанных, прежде всего, с высокой вязкостью его растворов. Для решения этой проблемы традиционно используется гексафторизопропанол. Как показывает целый ряд исследований, коллаген в растворах фторспиртов полностью денатурирует, превращаясь в желатин. Желатин сохраняет определённые ценные свойства коллагена, однако сравнительные данные эффективности применения нетканого желатина и коллагена для тканевой инженерии кожи остаются недостаточными. *Цель исследования* - получение и сравнение на моделях *in vitro* и *in vivo* нетканых матриц с различной степенью денатурации коллагена.

Материалы и методы. Коллаген I типа выделяли по авторской методике из дермы крупного рогатого скота и растворяли в уксусной кислоте. Степень денатурации коллагена в растворах задавали с помощью температурного режима и оценивали методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Для повышения волокнообразующих свойств в состав прядильных растворов вводили полиэтиленоксид (M_w 2000 кДа). Сшивание материалов генипином проводили в среде изопропанола и фосфатного буфера. Морфологию образцов исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа. Механические характеристики исследовали на разрывной машине Instron5965. Подкожная имплантация образцов материалов проводилась мышам линии BalbC в соответствии с ранее опубликованным протоколом. Гистологические срезы имплантированных образцов и окружающих тканей окрашивали гематоксилином и эозином, ализариновым красным в соответствии с протоколами производителя.

Результаты и обсуждение. Были подобраны условия формования, обеспечивающие получение материалов с бездефектной структурой волокон. Изготовлены материалы, отличающиеся только степенью денатурации молекул коллагена, со средним диаметром волокна от 250 до 500 нм. Найдены оптимальные условия для стабилизации материалов

генипином. Прочность и модуль упругости полученных материалов возрастают с уменьшением степени денатурации коллагена от 0,108 до 0,658 Мпа и от 0,078 до 0,510 Мпа соответственно, а деформация разрушения при этом закономерно снижается. Несмотря на отличия между механическими характеристиками сшитых образцов и нативной ткани, их кривые растяжения имеют одинаковый J-вид. Было показано, что на материале из коллагена дермальные фибробласты пролиферируют активнее, чем на материале коллаген-желатин, а на последнем активнее, чем на желатиновом. Через три месяца после подкожной имплантации оба материала были хорошо различимы на гистологических препаратах, при этом коллагеновый материал подвергся выраженной кальцификации. Окрашивание ализариновым красным подтвердило наличие кальцификата на всем протяжении коллагенового образца, не выявив ничего подобного в желатиновом. Последний сохранял гибкость и структуру, оставаясь непроницаемым для клеток. Резорбции он подвергся лишь частично и сосудами не пророс. Интересно, что по прошествии полугода описанная гистологическая картина сохранилась практически без изменений.

Заключение. Оптимизация условий формирования позволила получить нановолокнистый материал с неденатурированной структурой волокон коллагена и удовлетворительными механическими характеристиками, а также его аналоги с различной степенью денатурации коллагена. Кратковременные исследования *in vitro* не выявили значительной разницы между образцами, но лишь небольшие преимущества коллагенового образца. Долговременные наблюдения показали, что длительная имплантация коллагенового материала, в отличие от желатинового, может привести к таким отрицательным последствиям, как кальцификация. Полученные результаты подчёркивают важность длительных наблюдений при оценке биосовместимости новых матриксов.

Исследования поддержаны внутренним грантом Курчатовского института.

**ДИНАМИКА МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ
РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ МАТОЧНОЙ СТЕНКИ КРЫС В
ЭСТРАЛЬНОМ ЦИКЛЕ**

***Тихонова Н.Б., Алексанкина В.В., Фокина Т.В., Алексанкин А.П., Болтовская М.Н.,
Милованов А.П.***

ФГБНУ НИИМЧ, г. Москва, reprod_pathol@morfolhum.ru

**MORPHOMETRIC PARAMETERS OF PHYSIOLOGICAL REGENERATION
PROCESSES OF THE UTERINE WALL OF RATS IN THE ESTROUS CYCLE**

***Tikhonova N. B., Aleksankina V. V., Fokina T. V., Aleksankin A. P., Boltovskaya M. N.,
Milovanov A. P.***

Research Institute of Human Morphology, Moscow, reprod_pathol@morfolhum.ru

Введение. Крысы линии Sprague-Dawley (SD) широко применяются в экспериментальных исследованиях патологических состояний женской репродуктивной системы. Однако в связи со значительными отличиями репродуктивного цикла грызунов проблема интерпретации экспериментальных данных и экстраполяции результатов на клинические исследования остается актуальной. Морфологические параметры маточной стенки крысы меняются кардинально в зависимости от фазы эстрального цикла, продолжительность которого у SD, как правило, 5 суток, что значительно короче женского менструального цикла. Одной из ключевых особенностей клеточного состава маточной стенки грызунов является наличие значительного количества лейкоцитов гранулоцитарного ряда и их динамическое распределение в различных слоях стенки в зависимости от фазы цикла, что может осложнять интерпретацию роли клеток воспаления в экспериментальных работах. В литературных источниках нам не удалось найти данные по уровню распределения лейкоцитов и макрофагов в стенке матки SD в разные фазы эстрального цикла, который характеризуется физиологической циклической регенерацией компонентов эндометрия. *Цель исследования.* Морфометрическая характеристика уровня лейкоцитов гранулоцитарного ряда и макрофагов в эндометрии и миометрии стенки матки крыс SD в различные фазы эстрального цикла.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 20 самках крыс Sprague-Dawley (n=20; возраст 14-16 недель, вес 220-280 г), по пять животных на каждую исследуемую фазу – проэструс, эструс, метэструс и диэструс. Фазу эструса устанавливали при цитологическом исследовании вагинального мазка, окрашенного с помощью набора реагентов «Диахим-Диф-Квик» (НПФ «Абрис+», кат. №451) и иммуноферментном исследовании содержания эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови (НВО «Иммунотех», кат. № ИФ-02-07 и ИФ-02-

08). Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином (ООО «БиоВитрум», артикул: 07-006) для выявления гранулоцитов. Морфометрические показатели распределения клеток определяли в слое эндометрия, прилегающего к маточному эпителию (МЭнд), в слое эндометрия, прилегающего к миометрию (Энд), во внутреннем слое миометрия (ВнуМ) и в сосудистом слое совместно с внешним слоем миометрия (ВнеМ). Макрофаги выявляли моноклональными антителами (мкАт) к CD68 (#ab31630, Abcam). Микроскопию проводили с помощью микроскопической системы Leica. Клетки подсчитывали в трех полях зрения микроскопа при 1000-кратном увеличении в каждом из трех препаратов от одного животного. Статистическую обработку проводили методами описательной статистики (среднее, ошибка среднего) и непараметрической статистики для оценки различий (критерий Манна-Уитни).

Результаты и обсуждение. При гистологическом исследовании фаза проэструса у крыс SD характеризовалась расширенной маточной полостью, заполненной секретом маточных желез, цилиндрическим маточным эпителием без признаков вакуолизации и дегенерации, как и в железистом эпителии, с незначительным количеством фигур митоза. Фаза эструса характеризовалась сужением маточной полости, значительной складчатостью цилиндрического маточного эпителия с выраженными признаками дегенерации и отсутствием фигур митоза. Фаза метэструса характеризовалась узкой маточной полостью, выстланной преимущественно кубическим маточным эпителием с остаточными признаками дегенерации и появлением редких митотических фигур. Фаза метэструса характеризовалась узкой маточной полостью, выстланной преимущественно кубическим маточным эпителием с остаточными признаками дегенерации и появлением редких митотических фигур. Эти наблюдения согласовывались с литературными данными (Westwood, 2008). Среднее значение и стандартное отклонение (среднее±станд.откл.) содержания нейтрофилов в МЭнд составило в проэструсе $3,0 \pm 0,7$; эструсе $10,2 \pm 1,3$; метэструсе $8,6 \pm 0,5$; диэструсе $33,6 \pm 3,0$; Энд – $3,4 \pm 0,9$; $0,4 \pm 0,5$; $1,6 \pm 0,5$; $1,0 \pm 1,0$; ВнуМ – $0,4 \pm 0,5$; $0,4 \pm 0,5$; $0,4 \pm 0,5$; $0,2 \pm 0,4$; ВнеМ – $0,2 \pm 0,4$; $2,2 \pm 0,8$; $0,2 \pm 0,4$; $1,2 \pm 0,8$; эозинофилов в МЭнд – $4,6 \pm 0,9$; $0,8 \pm 0,4$; $0,6 \pm 0,5$; $33,6 \pm 0,3$; Энд – $21,8 \pm 1,5$; $51,4 \pm 3,4$; $24,6 \pm 4,3$; $78,4 \pm 8,0$; ВнуМ – $3,8 \pm 0,8$; $30,8 \pm 2,9$; $3,6 \pm 0,5$; $7,2 \pm 0,8$; ВнеМ – $0,4 \pm 0,5$; $16,4 \pm 1,7$; $0,4 \pm 0,5$; $16,2 \pm 1,5$; макрофагов в МЭнд – $13,4 \pm 0,9$; $32,8 \pm 1,9$; $11,8 \pm 1,5$; $25,8 \pm 1,5$; Энд – $11,6 \pm 2,1$; $10,8 \pm 1,6$; $7,4 \pm 1,1$; $20,2 \pm 1,8$; ВнуМ – $5,8 \pm 0,8$; $2,6 \pm 0,5$; $0,6 \pm 0,5$; $10,0 \pm 1,0$; ВнеМ – $0,4 \pm 0,5$; $10,0 \pm 1,6$; $5,0 \pm 0,7$; $8,0 \pm 0,7$. Достоверное различия распределения клеток в различных слоях маточной стенки в зависимости от фазы цикла установлено по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Заключение. Эстральный цикл у крыс характеризуется достоверно изменяющимися показателями распределения гранулоцитов и макрофагов в слоях маточной стенки, что указывает на важную роль этих клеток в физиологических регенерационных процессах полового цикла и их соотношение в каждом слое маточной стенки может однозначно указывать на фазу эстрального цикла крысы и служить индикатором тех или иных воздействий в эксперименте.

ЖИРОВАЯ ТКАНЬ В РАНЕВОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ СТЕНКИ МАТКИ КРЫСЫ

Тихонова Н.Б., Алексанкина В.В., Фокина Т.В., Алексанкин А.П., Болтовская М.Н.,

Милованов А.П.

ФГБНУ НИИМЧ, Москва, reprod_pathol@morfolhum.ru

ADIPOSE TISSUE IN THE RAT UTERINE WOUND REGENERATION

Tikhonova N. B., Aleksankina V. V., Fokina T. V., Aleksankin A. P., Boltovskaya M. N.,

Milovanov A. P.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, reprod_pathol@morfolhum.ru

Введение. О положительном влиянии на репарационные процессы в поврежденной маточной стенке препаратов на основе клеточных культур, полученных из жировой ткани, заявляет ряд авторов экспериментальных исследований на лабораторных грызунах (Shao et al., 2019; Yotsumoto et al., 2020). В то же время вопрос о роли эндогенной жировой ткани в заживлении стенки матки остается открытым.

Цель исследования. Морфологическая характеристика компонентов жировой ткани при заживлении маточной стенки крыс в первые две недели после сквозного повреждения.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 40 самках крыс Sprague-Dawley (n=40; возраст 14-16 недель, вес 220-280 г). Выполняли под общим наркозом продольный сквозной разрез стенки длиной 10 мм на антимезометриальной стороне правого рога матки в фазе эструса. Разрез ушивали нитью «Ультрасорб USP 6/0». Для морфологического, гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования образцы тканей забирали ежедневно в течение недели и на 15 сутки после операции. Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином (ООО «БиоВитрум», артикул: 07-006) и трихромным красителем по Пикро Маллори (артикул: 21-036). Клетки адипоцитарного ряда выявляли моноклональными антителами (мкАт) к FABP4 — транспортному протеину липидов в адипоцитах (#ab219595, Abscam), клетки моноцитарного ряда мкАт к CD68 (#ab31630, Abscam). Микроскопию проводили с помощью микроскопической системы Leica.

Результаты и обсуждение. В **первые сутки** после хирургической операции присутствовал явный сквозной дефект стенки матки. На **вторые сутки** в отдельных участках

раневого канала наблюдались признаки стягивания краев раны и частичное закрытие дефекта, а также фрагментарное прикрепление брыжейки к раневой поверхности. Однако плотность сращения тканей брыжейки с поврежденной стенкой матки была незначительная и брыжейка легко отделялась от матки при растяжении. На **третьи сутки** у всех исследованных животных на внешней поверхности повреждения маточной стенки обнаружили фиксацию жировой ткани брыжейки, прикрывающей дефект. Края раны были сомкнуты. На **4-ые сутки** отмечено полное исчезновение раневого канала в результате выполнения зоны повреждения эндометрием со стороны маточной полости и прикрепления жировой ткани брыжейки к месту повреждения со стороны брюшной полости. На **4-5 сутки** отмечено прорастание маточных желез в зону повреждения миометрия, со стороны брюшной полости в зоне бывшего разреза отмечено разрастание жировая ткань с умеренной клеточной инфильтрацией. На **5-е сутки** эндометрий, с разрастающимися маточными железами, заполняет всю поврежденную зону, даже незначительно вырастая за пределы периметрия, вплоть до сращения с жировой тканью брыжейки, покрывающей раневую область со стороны брюшной полости. При ИГХ окрашивании на адипоциты в зоне повреждения обнаружены гнезда клеток с фенотипом FABP4+. Отмечено, что локализация FABP4+ клеток всегда совпадала с частичной локализацией макрофагов CD68+, но не наоборот. Кроме того, выявлен приток клеток фенотипа CD68+ в область, прилегающую к шовному материалу. На **6-7 сутки** выявлено в отдельных случаях полное, а в остальных не менее 80%, окутывание оперированного участка рога матки жировой тканью при компактном строении стенки. На 15-е сутки при макроскопическом исследовании отмечена муфта из жировой ткани, полностью или частично окутывающая рог с оперированным участком, а при микроскопии выявлен эндометрий, заполняющий раневую область и сросшийся с жировой тканью, покрывающей зону разреза со стороны брюшной полости, причем участки жировой ткани проникают между слоями маточной стенки. При ИГХ исследовании гнезда FABP4+ клеток в зоне репарации не отмечены, но в отдельных случаях встречаются в отдаленных от места разреза участках периметрия при обязательном наличии прикрепленной жировой ткани. Опубликованной информации о роли жировой ткани в раневом процессе в матке нам найти не удалось. Между тем стволовые клетки, полученные из жировой ткани (ADSC) считаются наиболее перспективным типом клеток в регенеративной медицине (Sun H. et al., 2018). Механизмы взаимодействия между компонентами поврежденной стенки и жировой тканью брыжейки, а также роль эндогенной жировой ткани в репаративной регенерации стенки матки безусловно заслуживают внимания для более тщательного исследования. Данных о роли жировой ткани в репаративной регенерации стенки матки у человека в литературных источниках нами не обнаружено.

Заключение. Жировая ткань брюжейки несомненно принимает участие в заживлении сквозного повреждения маточной стенки крыс линии Sprague-Dawley. Однако происхождение и роль клеток FABP4+ в зоне повреждения ещё предстоит установить.

**ВЛИЯНИЕ КИСЛОТОМОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ НА
СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ В РАННИЕ СРОКИ
ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН**

Ульянов И.А.¹, Торгун П.М.², Глухов, А.А.¹, Андреев А.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.

Бурденко»

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени

императора Петра I», ilyanov.ignat@yandex.ru

***THE EFFECT OF ACID-MODIFIED SOLUTIONS ON THE SECRETORY ACTIVITY
OF FIBROBLASTS IN THE EARLY STAGES OF WOUND HEALING***

Ulyanov I. A.¹, Torgun P. M.², Glukhov A. A.¹, Andreev A. A.¹

¹ *N. N. Burdenko Voronezh state medical University*

² *Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I, ilyanov.ignat@yandex.ru*

Введение. Регенерация раны - это многофакторный процесс, и одну из ключевых ролей в нём выполняют фибробласты. Эти клетки с самых ранних этапов заживления начинают образовывать грануляционную ткань, синтезируя большое количество белков внеклеточного матрикса, гликозаминогликанов и факторов клеточного роста. Повлиять на активность фибробластов и на общую скорость регенерации возможно с помощью изменения кислотно-основного показателя среды, значение которого варьируется в зависимости от стадии раневого процесса.

Цель исследования – сравнить секреторную активность фибробластов при использовании различных кислотомодифицированных растворов в ранние сроки заживления ран мягких тканей у крыс.

Материалы и методы. Исследование проводилось на 75 крысах-самцах линии Wistar. Были выделены контрольная (интактная) группа и 4 опытные. Крысам опытных групп наносились раны в форме эллипса размером 1x1.5 см. Раны особей 1-ой группы на протяжении всего эксперимента обрабатывали 0.9% раствором NaCl с pH 5.0; 2-ой группы- 0.9% раствором NaCl с pH 7.0; 3-ей группы- 0.9% раствором NaCl с pH 7.5. В 4-ой группе растворы применяли в два этапа: в первую фазу раневого процесса (до 3-х суток

включительно) использовался 0,9% раствор NaCl с pH 5.0, а во вторую фазу (до 5-х суток включительно) – 0.9% раствор NaCl с pH 7.5.

На 1-е, 3-и и 5-е сутки из области раны иссекались кусочки 1x1.5 см. Проводилась фиксация материала в жидкости Штиве, 10% растворе нейтрального формалина, образцы обезживали в спиртах возрастающей крепости и заливали в парафин. Готовились парафиновые срезы, толщиной 4-5 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином. Объективным критерием секреторной активности фибробластов является величина их ядер. Поэтому для кариометрических исследований использовали планиметр, определяли площадь ядер (по 100 измерений для каждого животного). Статистический анализ проводили при помощи параметрического *t*-критерия Стьюдента, так как выборки имели нормальное распределение и одинаковые дисперсии в сравниваемых группах. Для определения нормальности распределения выборок использовали тест Колмогорова–Смирнова. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.001$.

Результаты и обсуждение. В первые сутки после нанесения раны у животных 1-й, 2-й и 4-й опытных групп выявлено статистически значимое увеличение площади ядер фибробластов на 8-9.2% по сравнению с контролем. В 3-й группе этот показатель оставался без изменений. На третьи сутки в 1-й и 4-й группе площадь ядер увеличилась статистически значимо более чем на 22% по сравнению с контролем. Во второй группе увеличение площади ядер по сравнению с контролем составило 15.5%. В 3-й группе площадь ядер фибробластов оставалась без изменений. На пятые сутки у крыс всех опытных групп выявлено увеличение численности фибробластов. Площадь ядер у крыс 1-й и 4-й группы статистически значимо больше по сравнению с контролем на 24- 26.5% соответственно. У крыс 2-й группы площадь ядер фибробластов по сравнению с контролем увеличилась на 13.0%, а у животных 3-й группы увеличение площади ядер составило всего 6.5%, при этом статистически значимых изменений по сравнению с контролем не выявлено.

Заключение. Применение 0.9% раствора NaCl с pH 5.0 в первую фазу заживления раны визуально снижает процессы воспаления, при этом повышается секреторная активность фибробластов. 0.9% раствор NaCl с pH 7.5 во вторую фазу вызывает увеличение численности фибробластов и площади ядер этих клеток. Лучшим результатом, наиболее стимулирующим активность фибробластов, можно считать двухфазное лечение с изменением водородного показателя среды от кислого до щелочного.

**МЕСТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ
В КОМБИНАЦИИ С ГИДРОИМПУЛЬСНОЙ САНАЦИЕЙ СТИМУЛИРУЕТ
ВОССТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
НЕЙРОНОВ СПИННОМОЗГОВЫХ УЗЛОВ ИННЕРВИРУЮЩИХ КОЖНУЮ РАНУ**

Фетисов С.О.¹, Алексеева Н.Т.¹, Клочкова С.В.²

¹ФГБОУ ВПО Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.

Бурденко, fetisovbiol@yandex.ru

²ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», ГАУЗ «Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины ДЗМ» Москва,

**LOCAL APPLICATION OF PLATELET-RICH PLASMA IN COMBINATION WITH
HYDROIMPULSE SANITATION STIMULATES THE RESTORATION OF
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF DORSAL ROOT GANGLION NEURONS
INNERVATING THE SKIN WOUND**

Fetisov S.O.¹, Alexeeva N.T.¹, Klochkova S.V.²

¹N.N. Burdenko Voronezh state medical university fetisovbiol@yandex.ru

²Medical institute of RUDN University, Moscow; Moscow scientific and practical center of medical rehabilitation, rehabilitation and sports medicine, Moscow

Введение. Наличие прямой связи между морфофункциональным состоянием нейронов спинномозговых узлов (СМУ) и динамикой реиннервации тканей в зоне их иннервации представляет значительный интерес в контексте маркера для оценки процесса регенерации ранений малого объема. *Цель исследования* –изучить изменения в нейронах спинномозговых узлов крыс на протяжении заживления кожной раны в области их иннервации, при асептическом и при гнойном течении раневого процесса после внесения культуры *Staphylococcus aureus*, а также при использовании гидроимпульсной санации раны мелкодисперсным потоком NaCl (ГИС) и внесения обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови (ОТПК), в качестве тканевого ускорителя регенерации.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 300 беспородных крысах самцах. Животные выводились из эксперимента на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е, 28-е сутки равными группами с соответствующим контролем и с соблюдением основополагающих биоэтических правил. Иссекали сегментарно соответствующие зоне раны спинномозговые ганглии L_{III}-L_V. На серийных срезах окрашенных крезилковым фиолетовым по методу Ниссля проводили качественную оценку состояния нейронов, выделяя две размерные группы крупные А- и малые В-нейроны и субпопуляции интактных клеток, нейроны с реактивными

компенсаторными реакциями и клетки в процессе деструкции. Количественно оценивали размерные характеристики клеток и их ядер, ядрышковый компонент, количество сателлитной глии для каждой субпопуляции нервных клеток. Производили цитофотометрию содержания РНК и общего белка. Статобработку проводили с использованием программы Statistica 10.0, использовали одно- и многомерный регрессионный анализ с вычислением коэффициента корреляции.

Результаты и обсуждение. Выявлена специфическая динамика соотношения субпопуляций нейронов в зависимости от типа течения раневого процесса. Так, септическое течение демонстрировало значительное количество деструктивно измененных клеточных форм (9,2 против 5,4% при асептическом течении) и увеличение доли реактивных нейронов А и В типа (14,5 и 31,8% против 10,2 и 26,6%). Раздельное применение ГИС и ОТПК не демонстрировало значительного изменения соотношения клеточных форм, при этом комбинация ГИС и ОТПК характеризовалась достоверным снижением доли реактивно измененных нейронов (А – до 6,8% и В до 16,8%) по сравнению с естественным течением.

На этом фоне отмечена положительная корреляционная зависимость между долями субпопуляций нейронов, их тинкториальными свойствами, числом глиальных клеток, типами течения раневого процесса и видами регионального воздействия, с максимумом при применении ОТПК при асептическом раневом процессе и после комплексного воздействия ГИС и ОТПК на инфицированные раны – диапазон коэффициента детерминации R^2_{adj} 0,817 – 0,926.

Заключение. Комбинированное использование ГИС и ОТПК оказывало наиболее гармоничное воздействие, при котором диапазоны показателей большей части характеристик для незначительной части нервных клеток соответствовали крайним формам дистрофии, но для большей части – оптимальным изменениям, направленным на успешную регенерацию.

**ВКЛАД ТРОМБОГЕННОСТИ И РАДИАЛЬНОЙ ЭЛАСТИЧНОСТИ В
ПРОЦЕСС ИНТЕГРАЦИИ НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО СОСУДИСТОГО
ПРОТЕЗА В АРТЕРИАЛЬНОЕ РУСЛО**

*Городков А.Ю., Шепелев А.Д., Тенчуриин Т.Х., Сергеев А.А., Цыганков Ю.М.,
Агафонов А.В.*

ФГБУ НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева, г. Москва, tsigankov_yura@mail.ru

**THE VALUE OF THROMBOGENICITY AND RADIAL ELASTICITY IN THE
PROCESS OF INTEGRATION OF NEW SYNTHETIC ARTERIAL VASCULAR
PROSTHESIS**

*Gorodkov A. Yu., Shepelev A.D., Tenchurin T.Kh., Sergeev A.A., Tsygankov Yu.M.,
Agafonov A.V.*

*A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery, Moscow,
tsigankov_yura@mail.ru*

Введение. Существующие протезы кровеносных сосудов характеризуются высокой тромбогенностью и недостаточной биомеханической совместимостью с протезируемым сосудом, поэтому поиск новых материалов и конструкций протезов остаётся актуальным. Появление новых технологий – электроформования синтетического нетканого образца протеза методом электроспиннинга – позволяет создавать конструкции с заданными упруго-эластичными свойствами. *Цель исследования* – исследовать значение тромбогенности и радиальной эластичности нового синтетического сосудистого протеза при имплантации в брюшной отдел аорты свиньи.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование проведено на 12 свиньях. Животным имплантировали в инфраренальный отдел аорты синтетические протезы, изготовленные по технологии электроспиннинга, а в качестве контроля стандартный протез из политетрафторэтилена (ПТФЭ). Предварительно изучаемые материалы: поликапролактон (ПКЛ), полиуретан (ПУ), фторсодержащий синтетический каучук с фторопластом СКФ-26 в смеси с фторопластом Ф26 (СКФ-26+Ф-26) и фторопласт (Ф-4) исследовали на тромбогенность. Тромбогенность оценивали по адгезии тромбоцитов на поверхности образца при перфузии нативной кровью в условиях «ex vivo». Радиальную податливость образцов протезов исследовали на разрывной машине в физиологическом диапазоне нагрузок. Контроль проходимости протезов проверяли через 1 месяц по данным аортографии, а особенности прорастания протеза оценивали по данным гистологического исследования.

Результаты и обсуждение. По степени тромбогенности исследованные материалы расположены в следующем порядке: ПКЛ (0,065), ПУ (0,102), фторопласт Ф-4 (1,0) и СКФ-26+Ф-26 (1,748). При имплантации образцов сосудистых протезов из перечисленных материалов по данным гистологического исследования показано, что через 1 месяц клеточная капсула протезов СКФ-26+Ф-26 была самой тонкой с признаками клеточной дифференциации, капсула протеза из ПУ и из ПТФЭ имела признаки умеренного воспаления с хаотическим расположением клеток, а капсула протезов из ПКЛ имела признаки хронического воспаления. Протезы из СКФ-26+Ф-26 сохраняли пульсацию в течение всего срока наблюдения, протезы из ПУ сохраняли пульсацию в течение первых дней после имплантации, а протезы из ПКЛ и из ПТФЭ были ригидны.

Заключение. Радиальная эластичность является более существенным фактором интеграции синтетического протеза при его имплантации в артериальное сосудистое русло, чем степень тромбогенности материала, из которого изготовлен протез.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-00109П.

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ПОСТИНФАРКТНЫЙ ПЕРИОД: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Чаулин А.М.^{1,3}, Григорьева Ю.В.³, Деев А.А.², Свечков Н.А.^{1,3}, Дупляков Д.В.^{1,3}

¹ГБУЗ «Самарский областной клинический кардиологический диспансер», Самара

²ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия», Самара

³ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава

России, Самара, alekseymichailovich22976@gmail.com

DYNAMICS OF THYROID HORMONE LEVELS IN THE POST-INFARCTION PERIOD: EXPERIMENTAL STUDY

Chaulin, A.M.^{1,3}, Grigorieva, Yu.V.³, Deev, A.A.², Svechkov, N.A.^{1,3}, Duplyakov, D.V.^{1,3}

¹Samara Regional Cardiology Dispensary

²Samara Regional Medical Center "Dynasty"

³Samara State Medical University Ministry of Health of Russia,

alekseymichailovich22976@gmail.com

Введение. Инфаркт миокарда является одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения. По современным представлениям инфаркт миокарда следует считать системным состоянием, вовлекающих в патогенез ряд органов и тканей. Весьма интересным направлением современных исследований является изучение адаптационно-компенсаторных реакций со стороны других органов и тканей в ответ на ишемическое

повреждение миокарда. *Цель исследования*– изучить изменения функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы в условиях ишемического повреждения миокарда.

Материалы и методы. У кроликов породы Шиншилла воспроизводили модель инфаркта миокарда хирургическим способом – лигирование передней нисходящей коронарной артерии. Ишемическое повреждение миокарда подтверждено при помощи функциональной диагностики (электрокардиография) и лабораторной диагностики (определение уровней сердечных тропонинов Т и I иммуноферментным анализом). Уровни тиреоидных гормонов (Т3, Т4) и тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ) определяли посредством иммуноферментного анализа до воспроизведения экспериментального инфаркта и в постинфарктный период.

Результаты и обсуждение. В результате ишемического повреждения сердечной мышцы обнаружено весьма значимое изменение активности гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы, заключающееся в достоверном повышении уровней тиреоидных гормонов (Т3, Т4) в крови и снижении сывороточных концентраций ТТГ, которое достигается максимума на 3-5 сутки от момента ишемического некроза миокарда. Через 1-1,5 недели наблюдалось восстановление данных показателей.

Заключение. Таким образом, согласно проведенному экспериментальному исследованию, инфаркт миокарда сопровождается значимыми изменениями функционального статуса гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы в течение 1-1,5 недели. Подобные адаптационно-компенсаторные изменения могут играть важную роль в течение постинфарктного периода, в частности, в репарации поврежденного участка миокарда.

**ПОЗДНИЕ РЕЦИДИВЫ ВЕНТРАЛЬНЫХ ГРЫЖ С ПОЗИЦИИ МОРФОЛОГИИ
РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ**

Чекмарева И.А., Аляутдинов Р.Р., Гогия Б.Ш., Паклина О.В., Тинькова И.О.

ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва,

chia236@mail.ru

**LATE RECURRENCIES OF VENTRAL HERNIAS FROM THE POSITION OF
REGENERATIVE MORPHOLOGY**

Chekmareva I.A., Alyautdinov R.R., Gogia B.Sh., Paklina O.V., Tinkova I.O.

A.V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Ministry of Health of the

Russian Federation, Moscow, chia236@mail.ru

Введение. Рецидивные грыжи рассматриваются как постоянно прогрессирующий локальный воспалительный процесс передней брюшной стенки с выраженными нарушениями морфофункционального состояния клеток. Одной из причин развития рецидивов у больных с послеоперационными вентральными грыжами является недостаточно надежная фиксация имплантатов, ведущая к их смещению, что может влиять на частоту и степень выраженности воспалительных реакций. Данное положение явилось предпосылкой для более детального исследования взаимодействия тканей организма и имплантатов. *Цель исследования* – изучить особенности тканевой реакции у больных с поздними (от 1 года до 13 лет) рецидивами вентральных грыж после имплантации сетчатых полипропиленовых эндопротезов (ППЭ).

Материал и методы. Выполнен гистологический и электронно-микроскопический анализ операционного материала от 60 пациентов с поздними рецидивами вентральных грыж, находящихся на лечении в НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского в период с 2015 по 2020 гг. Средний возраст больных составил 59,5 лет (от 37 до 75 лет), с преобладанием женщин (1,5:1). Срок операции после предыдущего грыжесечения – от 1 до 13 лет (в среднем 5 лет). Фрагменты ткани с имплантированными эндопротезами, взятые непосредственно из зоны рецидива грыжи, исследовали с помощью гистологического и электронно-микроскопического методов, проводимых по общепринятой методике. Ультратонкие срезы окрашивали ацетатом уранила и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM 100-CX (JEOL, Япония) в трансмиссионном режиме при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждение. Через 1-2 года после имплантации ППЭ ячейки эндопротезов прорастали соединительной тканью с сохранением хронического асептического воспаления. Воспалительные инфильтраты состояли из функционально

активных лимфоцитов, макрофагов и гигантских многоядерных клеток и располагались вокруг нитей ППЭ. В капиллярах грануляционной ткани обнаружены сладж и стаз эритроцитов с периваскулярными лимфоцитарными инфильтратами. Дистрофические изменения в эндотелиальных клетках проявлялись в вакуолизации цитоплазмы, просветлении матрикса и нарушении ориентации крист митохондрий. В цитоплазме фибробластов гранулярная цитоплазматическая сеть хорошо развита и образовывала расширения, заполненные хлопьевидным материалом, что указывало на активность белоксинтетических процессов (синтез коллагена).

Через 3 года после имплантации ППЭ сохранялись признаки хронического воспаления, выраженные в разной степени. В зоне, обращенной в сторону ПП нити, отмечали умеренно выраженную клеточную реакцию – лимфоциты, фибробласты, макрофаги, нередко, гигантские клетки инородных тел окружали ПП нити. Соединительная ткань, окружающая структуры сетки, была хорошо васкуляризирована, что указывало на продолжающиеся репаративные процессы. Были увеличены пространства между ПП нитью и тканью, при этом, возможно, происходило смещение нитей ПП сетки по типу люфта, что могло травмировать окружающие ткани и вызывать персистирующую воспалительную реакцию. Вокруг большинства фрагментов ПП нитей отмечали фиброзные капсулы из концентрических малоклеточных слоев коллагеновых волокон, которые переходили в окружающую соединительную ткань.

Через 6–13 лет после имплантации ПП сетчатых эндопротезов в месте рецидива сохранялась клеточная реакция на инородное тело, развивался имплантат-индуцированный фиброз. Грубоволокнистая фиброзная ткань с очагами лимфоцитарной инфильтрации, полнокровием мелких сосудов, очагами кровоизлияния, с участками гиалиноза окружала фрагменты эндопротеза. В результате прогрессирующей контракции фиброзной ткани могло происходить сморщивание эндопротеза, что также способствовало развитию рецидива грыжи. При исследовании биоптатов в сканирующем электронном микроскопе обращает на себя внимание не плотное прилегание (люфт) окружающих тканей к нитям ППЭ и частичная деградация фрагментов сетки, что могло привести к повышению ее хрупкости, потере механических свойств и, как следствие, развитию рецидива грыжи.

Заключение. Наличие люфта, персистирующая воспалительная реакция в области имплантации, грубоволокнистая фиброзная ткань, наличие многочисленных пространств между коллагеновыми волокнами заполненных рыхлой неоформленной соединительной тканью с различным количеством деструктивно измененных клеток, и возможная деструкция нитей эндопротеза – общие черты местной реакции на ППЭ при поздних рецидивах.

УЧАСТИЕ ТЕЛОЦИТОВ В РЕПАРАЦИИ КОЖНЫХ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Чекмарева И.А.

ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва

chia236@mail.ru

PARTICIPATION OF TELOCYTS IN THE REPAIR OF SKIN WOUNDS IN EXPERIMENT

Chekmareva I.A.

A.V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Ministry of Health of Russia,

Moscow, chia236@mail.ru

Введение: Телоциты (Тц) представляют собой особую популяцию интерстициальных (стромальных) клеток, которые недавно были обнаружены в самых разных тканях и органах, включая кожу, идентифицируются при электронно-микроскопическом исследовании как клетки с небольшим клеточным телом и чрезвычайно длинным (до сотен мкм) тонким отростками(телоподиями) с расширенными, цистерноподобными областями (подомами), в которых размещаются митохондрии, элементы эндоплазматического ретикула и кавеолы. Функционально Тц образуют трехмерную (3D) интерстициальную сеть путем гомо- и гетероклеточной коммуникации и участвуют в поддержании тканевого гомеостаза. *Цель исследования:* определить Тци их значений репарации асептических кожных ран в эксперименте.

Материалы и методы: Исследования проведены на 40 самцах белых беспородных крыс весом 150-200 граммов. У животных моделировали раны с негнойным (асептическим) воспалением. На спинках животных после депиляции под эфирным наркозом иссекали полнослойный участок кожи диаметром 3 см до подлежащей фасции. Для определения структурно-функционального состояния клеток грануляционной ткани на 1, 2, 3, 4 и 7 сутки заживления ран было проведено электронно-микроскопическое исследование биоптатов. 1 и 2 сутки заживления ран соответствовали фазе воспаления, 3, 4 и 7 сутки - фазе образования и созревания грануляционной ткани. Раны заживали под ватно-марлевой повязкой. Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM 100-CX (JEOL, Япония) в трансмиссионном режиме при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждение: На 1–2 сутки на поверхности раны отмечали разрозненные массы фибринозного экссудата с примесью нейтрофильных лейкоцитов и клеточного детрита. В области дна раны находили единичные Тц с характерными длинными телоподиями, с помощью которых клетки контактировали друг с другом, а также с

эозинофильными лейкоцитами, фибробластами, макрофагами и мезенхимальными стволовыми клетками (МСК).

На 3 – 4 сутки при переходе процесса заживления в стадию развития грануляционной ткани увеличилось количество Тц в области дна раны среди новообразованных капилляров, фибробластов. Телоподии имели тесные межклеточные соединения с эндотелиоцитами и перицитами, миофибробластами, макрофагами и недифференцированными клетками, подтверждая представление о сложном регулирующем механизме сигнальных путей, сходящихся в Тц в процессе регенерации.

На 7 сутки раневые дефекты были заполнены созревающей грануляционной тканью с большим количеством фибробластов, сосудов, макрофагов. Сосуды капиллярного типа были расположены перпендикулярно к поверхности раны. Фибробласты имели горизонтальную ориентацию к поверхности раны. Подобное строение указывало на зрелость грануляционной ткани. Тц выступали в качестве поддерживающих клетки располагались между волокнами коллагена, вокруг капилляров, среди функционально активных фибробластов, МСК, адипоцитов образуя трехмерную интерстициальную сеть посредством множественных гетеро- и гомоклеточных контактов. Изучение взаимосвязи между Тц и МСК будут полезны для уточнения биологических функций Тц в восстановлении и регенерации кожи, а также для получения нового представления о потенциальной терапевтической роли Тц в регенеративной медицине.

Заключение: проведенное исследование показало наличие Тц в асептической ране на ранних сроках заживления и увеличение их количества в грануляционной ткани в процессе заживления. Увеличивается количество гетеро- и гомоклеточных контактов Тц, что позволяет предположить их активную роль в процессе репаративной регенерации. Расположение Тц в нишах стволовых клеток, возможно, создает хорошо организованную микросреду, которая обеспечивает выживание, распределение и регенеративный потенциал стволовых клеток. Таким образом, Тц, образуя сложные интерстициальные сети с резидентными стволовыми клетками, кровеносными сосудами и другими интерстициальными компонентами, могут быть вовлечены в регенерацию и восстановление кожи.

**ПРИЗНАКИ ПОВРЕЖДЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ
СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ ВLA/J:
УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АСПЕКТ**

Чернова О.Н.^{1,2}, Чекмарева И.А.³, Мавликеев М.О.¹, Киясов А.П.⁴, Деев Р.В.^{1,5}

¹ *ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург*

² *ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, olgachernova92@yandex.ru*

³ *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва*

⁴ *ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань*

⁵ *ПАО «Институт стволовых клеток человека», Москва*

**DEGENERATIVE AND REGENERATIVE FEATURES OF STRIATED SKELETAL
MUSCLE TISSUE IN BLA/J MICE: ULTRASTRUCTURAL ISSUE**

Chernova, O.N.^{1,2}, Chekmareva, I.A.³, Mavlikeev, M.O.¹, Kiyasov, A.P.⁴, Deev, R.V.^{1,5}

¹ *North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg,*

² *Saint-Petersburg Medico-Social Institute, Saint-Petersburg, olgachernova92@yandex.ru*

³ *The National Medical Research Center of Surgery named after A. Vishnevsky, Moscow*

⁴ *Kazan (Volga region) Federal University, Kazan*

⁵ *Human Stem Cells Institute, Moscow*

Введение. Дисферлин – трансмембранный белок и белок т-трубочек мышечных волокон (МВ). При мутациях в гене, кодирующем синтез дисферлина, развивается прогрессирующая мышечная дистрофия с преимущественным поражением мышц нижних конечностей. Важным и малоизученным аспектом в понимании патогенеза дисферлинопатий являются нарушения в ультраструктуре МВ. *Цель исследования* – изучить ультраструктурные изменения в скелетных мышцах мышей с мутацией в гене *DYSF* на разных этапах онтогенеза.

Материал и методы. Скелетные мышцы туловища и задних конечностей самцов мышей линии Vla/J (с мутацией в гене *DYSF*) в возрасте от 1 сут. до 12 мес. фиксировали в 2,5% р-ре глутарового альдегида с последующей стандартной для электронной микроскопии пробоподготовкой и изготовлением полутонких и ультратонких срезов. На полученных электронограммах оценивали состояние МВ (сарколеммы, саркоплазмы и органелл).

Результаты и обсуждение. Изменения в ультраструктуре скелетных мышц были обнаружены с 20 сут. постнатального онтогенеза мышей линии Vla/J и проявлялись

преимущественным поражением сократительного аппарата МВ, сарколеммы и митохондрий. Выявлено прогрессирующее истончение миофибрилл с расширением пространств между ними, расширение сети т-трубочек, в 12 мес. – дезорганизация Z-линий. В сарколемме обнаружены участки разрывов со скоплением множества мелких везикул и электроноплотных митохондрий под плазмолеммой. Базальная мембрана с инвагинациями и участками разрывов обнаружена с 20 сут. На электронограммах мышц в 3 и 12 мес. выявлены разволокнение саркомеров, прерывистость мезофрагм, уплотнение крист, отек и вакуолизация митохондрий, отек саркоплазмы, расширение комплекса Гольджи и появление электроноплотных включений в ядре. В образцах мышц (икроножной и медиальной широкой мышцы бедра) мышцы 12 мес. жизни выявлены участки скопления коллагеновых волокон и фагоцитирующих лейкоцитов.

Заключение. Ключевым механизмом, запускающим поражение МВ, является избыточное поступление ионов кальция в саркоплазму при повреждении сарколеммы. Выявлено, что основные повреждения при дисферлинопатиях приходятся на сократительный аппарат МВ, что может быть связано, во-первых, с участием дисферлина в развитии т-трубочек, во-вторых, с накоплением избытка ионов кальция в миофибриллах. Так как митохондрии являются буфером для ионов кальция, они также повреждаются в отсутствие дисферлина. Таким образом, нарушение целостности сарколеммы при дисферлинопатиях приводит к прогрессирующему поражению важнейших компонентов МВ и – в дальнейшем – к их гибели. В эндомизии скелетных мышц выявлено большое количество фибробластов, синтезирующих компоненты межклеточного матрикса, следовательно, регенерация скелетных мышц в условиях дисферлинопатии протекает путем субституции.

ЗАВИСИМОСТЬ КОЛЛАГЕНОГЕНЕЗА ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС

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

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет, michail1911@mail.ru

DEPENDENCE OF COLLAGENOGENESIS ON THE CONDITIONS OF CULTURING OF MESENCHYME CELLS OF RAT ADIPOSE TISSUE

***Chernorutskiy M.V., Belyakova M.B., Kostiuk N.V., Miniaev M.V., Leshchenko D.V.,
Petrova M.B.***

Tver State Medical University, michail1911@mail.ru

Введение. Формирование и ориентирование волокон коллагена при сборке коллагеновых фибрилл в пучок во многом определяется их взаимодействием с поверхностью фибробластов, которые задают геометрию матрикса, отвечая на контактные взаимодействия и растворимые факторы (Kadler K., 2017). Условия культуры *in vitro* позволяют отчасти контролировать факторы, направляющие морфогенез матрикса, и наблюдать эффекты, которые невозможно увидеть в ткани. *Цель работы:* выявить связь между особенностями формирования коллагенового волокна и условиями культивирования клеток мезенхимного стромального происхождения.

Материалы и методы. Первичные культуры получали миграцией клеток из эксплантов жировой ткани крыс. Клетки выращивали в среде DMEM с добавлением FBS, BS или BS+аскорбат. Культуры поддерживали без пересева в течение 12 недель. За динамикой формирования коллагеновых волокон следили микроскопированием живых и фиксированных культур. Коллаген окрашивали по Ван-Гизону и Маллори.

Результаты и обсуждение. При нестимулированной пролиферации (изначальное содержание на бычьей сыворотке или пересев после отчетливого торможения пролиферации), в средах с высокой или половинной глюкозой, в присутствии аскорбата в неконфлюэнтной культуре образуются распростертые клетки, которые ориентируют фибриллы коллагена на своей поверхности и затем уплотняют их в волокно в направлении вдоль основной части своего цитоскелета, часто образуя вытянутые клеточные агрегаты. Клетки с дегенерировавшим ядром могут продолжать работу по стабилизации волокна. Отмечалось, что в оформлении длинного волокна часто участвуют длинные, около 400 мкм, отростки. При культивировании клеток в течение 6-12 недель без пересева популяция переживает частичный апоптоз, поддерживая пролиферацией конфлюэнтность застила и сохраняя архитектуру ранее созданных волокон.

При стимулированной пролиферации (фетальная сыворотка первые 2-7 дней жизни культуры), а также при загущенном посеве, в средах с высокой глюкозой клетки образуют типичную плотную фибробластоподобную культуру, крупные волокна образуются редко, и в этом случае формирование тонких волокон хорошо видно на 2-4 неделе культивирования. Довольно обычно очаговое или пространное «отсутствие контактного торможения», при котором образуется два различимых слоя, в каждом из которых клетки упорядочены в общем для слоя направлении. Характерно положительное окрашивание на коллаген в зонах загущения без выделения оптически отчетливых волокон. Такие культуры на 4-5 неделе обычно отделяются от подложки из-за самообусловленных механических деформаций.

Заключение. На наш взгляд, процесс формирования коллагена, образующего волокна в неплотной и мало пролиферирующей культуре, дает ключ к объяснению типичного вида активно пролиферирующей культуры фибробластов. В ней, из-за небольшой поверхности фибробласта, сборка фибрилл в устойчивое к деформации волокно не происходит и они не визуализируются. При этом кооперативное удлинение и начало параллельной сборки приводит к образованию множества рядов изогнувшихся волокон, что в свою очередь, определяет геометрию размещения на них вновь образующихся клеток. При длительном, более 2-х месяцев, культивировании клеток стромального происхождения на BS архитектура застила показывает сходство с рыхлой соединительной тканью – крупные коллагеновые волокна, апоптоз и замена фибробластов.

АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОКОЛОУШНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ЧЕРЕПА

Чернявский В.И.

*ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова», chernyavskiy1994@gmail.com*

ANATOMICAL FEATURES OF THE HUMAN PAROTID SALIVARY GLAND IN VARIOUS SKULL SHAPES

Chernyavskiy V. I.

*A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
chernyavskiy1994@gmail.com*

Введение. Анатомия околоушной слюнной железы обладает большой вариабельностью. Широкие границы ее анатомической и топографической нормы могут быть уточнены при помощи ее исследования в контексте различных форм черепа.

Цель исследования - изучить особенности анатомии околоушной слюнной железы при различных формах черепа.

Материал и методы. Работа выполнена на аутопсийном материале 30 тел, умерших в возрасте от 32 до 87 лет, среди них 18 тел мужского и 12 женского полов. Морфологический материал был разделен на 3 группы препаратов в зависимости от черепного указателя: с длинной и узкой формой черепа (долихокраны) – индекс менее 75 (10 препаратов); с промежуточной формой черепа (мезокраны) – индекс от 75 до 79,9 (10 препаратов); с короткой и широкой формой черепа (брахикраны) – индекс равен 80 и более (10 препаратов). С помощью анатомического препарирования выделялись околоушные слюнные железы и их протоки с обеих сторон, измерялись их линейные параметры, а также оценивались особенности расположения дополнительной доли.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования были выявлены три формы околоушной слюнной железы: овальная, четырехугольная, треугольная (основание треугольника обращено к скуловой дуге). При долихокранной форме черепа наиболее часто встречается овальная форма железы (6 из 10), а при брахикранной – четырехугольная (5 из 10). При мезокранном значении индекса не выявлено преобладающей формы околоушной слюнной железы: на овальную форму пришлось 3 из 10, на четырехугольную также 3 из 10 и на треугольную - 4 из 10 препаратов.

Добавочная доля железы встретилась в 6 (20%) исследованных препаратах, при этом 4 из них были выявлены при мезокранной форме черепа и по 1 в препаратах с брахи- и долихокранной формам.

Длина выводного протока на всех препаратах варьировала от 4,2 до 7,0 см. Наиболее длинные выводные протоки обнаружены на препаратах с брахикранной формой черепа ($6,1 \pm 0,4$ см). При мезокранной форме длина составила $5,5 \pm 0,3$ см, а при долихокранной - $5,3 \pm 0,27$ см.

В ходе исследования выявлено три варианта направления выводного протока околоушной слюнной железы: горизонтальное, восходящее и нисходящее. Горизонтальное направление выводного протока превалировало во всех исследованных препаратах и не зависело от формы черепа (21 из 30 исследованных желез). Зависимость направления протока железы от её формы нами также не была выявлена.

Устье выводного протока околоушной слюнной железы располагалось на слизистой щеки в диапазоне от второго до первого моляра верхней челюсти. Локализация в области второго моляра была характерна преимущественно для долихокранной и мезокранной форм черепа (14 из 20 препаратов). Смещение протока в сторону угла рта было отмечено в 12 из всех 30 исследованных препаратов, 6 из которых относились к брахикранной форме черепа.

Выводы. Таким образом, наше исследование показало, что анатомические особенности околоушной слюнной железы, в частности ее геометрическая форма, длина выводного протока и локализация его устья, зависят от формы черепа человека. Полученные данные могут учитываться при диагностике и хирургическом лечении заболеваний околоушной слюнной железы.

**РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ *HEXA*
И *HEXB* ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ТЕЯ-САКСА**

Шаймарданова А.А.

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет",

aliceshaimardanova@mail.ru

**DEVELOPMENT AND ANALYSIS OF GENETICALLY MODIFIED
MESENCHYMAL STEM CELLS WITH OVEREXPRESSION OF *HEXA* AND *HEXB*
GENES FOR THERAPY OF TAY-SACHS DISEASE**

Shaimardanova A.A.

Kazan (Volga region) Federal University, aliceshaimardanova@mail.ru

Введение. Болезнь Тея-Сакса (БТС) является лизосомной болезнью накопления, которая вызвана различными мутациями в гене *HEXA*, кодирующим α -субъединицу фермента β гексозаминидазы А (HexA). Данный фермент осуществляет специфическое расщепление GM2 ганглиозидов (GM2), входящих в состав цитоплазматической мембраны клеток. Нарушение работы фермента HexA приводит к накоплению GM2 в различных клетках и тканях организма. В основном поражается нервная ткань, вследствие высокого распространения GM2 в нейронах. Накопление GM2 приводит к инвалидизации и смерти пациентов. БТС характеризуется тяжелой нейродегенерацией, возникновением воспалительного ответа, задержкой психического и физического развития. На сегодняшний день заболевание остается неизлечимым. Цель исследования — разработка метода генно-клеточной терапии болезни Тея-Сакса с применением аллогенных мезенхимных стволовых клеток, генетически модифицированных рекомбинантными адено-ассоциированными вирусами, кодирующими кДНК генов *HEXA* и *HEXB* человека.

Материалы и методы. В работе использовали плазмидные конструкции на основе аденоассоциированного вируса, кодирующие гены *HEXA* и *HEXB*, рAAV-HEXA и рAAV-HEXB, соответственно. В качестве контроля была использована плазмидная конструкция рAAV-hrGFP, экспрессирующая репортерный зеленый флуоресцентный белок.

Вышеописанными плазмидными конструкциями проводили трансфекцию клеток НЕК293Т. Через 48 часов после трансфекции в кондиционированной среде генетически модифицированных клеток НЕК293Т анализировали ферментативную активность НехА с использованием флуоресцентного субстрата MUGS. Наличие α и β субъединиц НехА в генетически модифицированных клетках определяли с помощью вестерн-блот анализа. Аденоассоциированные вирусы AAV-HEXA и AAV-HEXB получали с помощью набора AAV helper-free system (Кат. №240071, Agilent technologies).

Путем ко-трансдукции AAV-HEXA и AAV-HEXB получали генетически модифицированные мезенхимные стволовые клетки (МСК). Стабильную экспрессию трансгенов в МСК-HEXA-HEXB подтверждали с помощью вестерн-блот анализа и количественной ПЦР. Крысам линии Вистар внутривенно вводили МСК-HEXA-HEXB в количестве 4 млн. в 1 мл физраствора ($n = 5$), в качестве контрольных групп использовали крыс, которым внутривенно вводили нативные МСК ($n = 5$) или физраствор ($n = 5$). До введения и каждые 7 дней забирали кровь для анализа ферментативной активности НехА. Через 4 недели после введения, забирали органы для исследования клеточности (процента живых клеток) в иммунных органах, определяли цитокиновый профиль в сыворотке крови и лейкоформулу.

Результаты и обсуждение. В образцах кондиционированной среды НЕК293Т, трансфицированных плазмидами rAAV-HEXA или rAAV-HEXB, активность НехА выше более чем в 20 раз. В кондиционированной среде МСК-HEXA-HEXB активность НехА выше в 5 раз, сравнительно с контрольными образцами. Вестерн-блот анализ показал наличие выраженных полос, соответствующих ожидаемым молекулярным массам α и β субъединиц фермента НехА в генетически модифицированных НЕК293Т и МСК-HEXA-HEXB. Показано, что после введения МСК-HEXA-HEXB, в плазме крови крыс на 21 сутки активность НехА увеличивается примерно в 1,5 раза. Введение МСК-HEXA-HEXB не влияло на клеточность (процент живых клеток) в иммунных органах крыс, лейкоформулу и цитокиновый профиль сыворотки крови крыс, сравнительно с контрольными группами.

Заключение. Таким образом, на клеточных культурах и на лабораторных животных мы показали, что МСК-HEXA-HEXB экспрессируют функционально активный фермент НехА, их внутривенное введение не вызывает иммунный ответ у животных. Эти данные дают основание предполагать, что данный генно-клеточный препарат является функциональным и безопасным, а также может рассматриваться в качестве кандидата для лечения БТС, однако для подтверждения терапевтического потенциала необходимы исследования на модельных животных.

ПАРАКРИННЫЙ ЭФФЕКТ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД РЕГЕНЕРАТОВ СЕТЧАТКИ ТРИТОНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

***Шафеев Е.В., Ржанова Л. А., Новикова Ю. П., Куринов А. М., Григорян Э. Н.,
Александрова М. А., Кузнецова А. В.***

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, elenashafei@gmail.com

PARACRINE EFFECT OF NEWT RETINA REGENERATES CONDITIONED MEDIA ON HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS DIFFERENTIATION

***Shafei E.V., Rzhanova L.A., Novikova Y.P., Kurinov A.M., Grigoryan E.N.,
Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V.***

Koltzov Institute of Developmental Biology of RAS, Moscow, elenashafei@gmail.com

Введение. Клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ) сетчатки имеют эндогенную способность к трансдифференцировке. У хвостатых амфибий РПЭ при повреждениях сетчатки дедифференцируется, входя в мультипотентное состояние, и затем дифференцируется в направлении утраченных нейронов сетчатки. У человека при травмах сетчатки клетки РПЭ также проявляют признаки дедифференцировки, но дифференцируются в основном в фибробластоподобные клетки, не проявляя регенеративных способностей. Таким образом, в клетках РПЭ человека присутствует способность к трансдифференцировке. Важной задачей является добиться управляемой трансдифференцировки человеческого РПЭ для восстановления сетчатки. Мы предполагаем, что одним из условий успешной регенерации сетчатки тритона является набор паракриновых факторов, выделяемых повреждённой сетчаткой.

Целью данной работы было исследовать паракриновый эффект кондиционированных сред (КС) регенератов сетчатки тритона на клетки РПЭ человека.

Материалы и методы: В работе использовали культуру клеток РПЭ взрослого человека ARPE-19. КС регенератов сетчатки тритонов получали путём роллерного культивирования, а затем добавляли в соотношении 1:1 к культуральной среде для ARPE-19. Эффект КС на клетки РПЭ человека оценивали с помощью методов морфометрии, иммуноцитохимического (ИЦХ) окрашивания и ПЦР в реальном времени в течение 120 часов.

Результаты и обсуждение: КС регенератов сетчатки тритона вызывали изменения в морфологии отдельных клеток ARPE-19 и форме колоний. По результатам морфометрического анализа клетки становились более крупными, распластанными и удлинёнными по сравнению с контролем. В группе с КС формировались рыхлые колонии с

хаотичным распределением клеток, которые отличались от плотных эпителиальных колоний в контроле. Методами ИЦХ анализа выявлено снижение окрашивания на характерный для РПЭ белок межклеточных контактов Сх43. Также наблюдалось перераспределение β -катенина с цитоплазматической мембраны на внутриклеточную локализацию. β -катенин является белком адгезионных контактов и центральным медиатором канонического Wnt-сигнального пути. Под действием КС происходило увеличение уровня экспрессии мРНК коллагена I типа без усиления синтеза белка. Также клетки в экспериментальной группе давали положительное окрашивание на фибронектин, являющийся белком внеклеточного матрикса. Рассматриваемые вместе эти изменения указывают на возможный эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток РПЭ и активацию канонического Wnt-сигнального пути. Связь между ЭМП и активацией Wnt/ β -катенинового пути показана при эмбриональном развитии и регенерации.

Одновременно с событиями ЭМП в культуре наблюдали признаки, характерные для нейральной дифференцировки. В пользу попытки клеток выйти в нейральную дифференцировку свидетельствуют повышение уровня экспрессии гена *TUBB3*, усиление иммуноокрашивания на белок β III-тубулин на фоне понижения уровня экспрессии *BMP2* и *BMP4*. Таким образом, наличие признаков нейральной дифференцировки под действием КС означает, что факторы, присутствующие в КС регенератов сетчаток тритонов способны выступать в качестве триггера трансдифференцировки клеток РПЭ человека. Мы предполагаем, что одним из ключевых факторов КС, влияющих на дифференцировку РПЭ человека, является bFGF. Однако, следует понимать, что КС – это коктейль различных факторов, который требует тщательного изучения.

Заключение: Данная работа является первой в попытке стимулировать трансдифференцировку клеток РПЭ человека КС, полученными из регенерирующих сетчаток тритона. Получены первые свидетельства о возможности с помощью КС уже в первые сутки культивирования индуцировать экспрессию пронеуральных маркерных молекул по сравнению с контролем. Необходимо дальнейшее исследование КС тритона и определение активных компонентов «секретомы» амфибий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 21-15-00387.

**СИСТЕМА ОТВЕТА НА ГИПОКСИЮ (HIF1) В КОНТЕКСТЕ ФИЗИОЛОГИИ
ЭПИДЕРМИСА И ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА*****Шинин В.В., Пантелеев А.А.****НИЦ Курчатовский Институт, Москва, vshinin@gmail.com***HYPOXIA-INDUCED MOLECULAR PATHWAY (HIF1) IN THE CONTEXT OF
EPIDERMAL AND
HAIR FOLLICLE PHYSIOLOGY*****Shinin V.V., Panteleyev A.A.****National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, vshinin@gmail.com*

Введение. Система ответа на гипоксию, контролируемая транскрипционным фактором HIF, является центральным механизмом адаптивного ответа на метаболический стресс. Кроме того, сигнальный путь HIF играет важную регуляторную роль в ходе эмбрионального и постнатального развития, участвуя в контроле ростовых процессов, регенерации, функциональной специализации клеток и гомеостаза различных тканей. Задача данного исследования – исследование экспрессии компонентов HIF-1 транскрипционного комплекса (HIF1 α и HIF1 β) в эпителиальных клетках кожи: эпидермиса и волосяного фолликула на стадиях анагена, катагена и телогена.

Материалы и методы. Исследование экспрессии белков HIF1 α и HIF1 β /ARNT проводилось методом иммунофлуоресценции на криостатных срезах нормальной кожи взрослого человека (n=8, 6♀ и 2♂, 29-68 лет). Предварительно, было проведено контрольное тестирование антител к HIF1 α (ab2185, Abcam) на культуре клеток 293T, путем их транзientной трансфекции плазмидой pcDNA3mHIF1 α MYC (Adgene #44028) с последующим иммунофлуоресцентным анализом, а также при помощи метода иммуноблоттинга белков лизатов клеток человека и мыши в присутствии агентов стабилизирующих HIF1 α . Лоты GR198419-6 и GR310634-1 были отобраны для настоящего исследования, поскольку удовлетворяли критериям специфичности и чувствительности в отношении как эндогенного, так и гиперэкспрессированного белка HIF1 α . Паттерн экспрессии HIF1 α , выявленный в эпителиальных производных кожи, был подтверждён с использованием высокоспецифичного моноклонального антитела к HIF-1 α человека, клон D1S7W, #36169 (Cell Signalling). Антитело HIF1 β (ARNT), клон 2b10 (ab2771), подробно охарактеризовано многочисленными исследованиями и является общепринятым инструментом детекции HIF1 β в тканях и клетках человека.

Результаты и обсуждение. Представлены результаты оценки локализации экспрессии компонентов транскрипционного комплекса HIF1 (гетеродимера HIF1 α и ARNT) в

эпидермисе и в различных клеточных популяциях волосяного фолликула в ходе циклической смены стадий его роста (регенерации). Ко-экспрессия HIF1a и ARNT выявлена в ядрах клеток зачатка волосяного фолликула на ранней стадии инициации цикла, но не в клетках волосяной сумки - предшественниках наружного волосяного чехла (ORS). На стадии продуктивного анагена ко-экспрессия этих двух белков (определяющая активность фактора HIF) была выявлена в ORS и в герминативном слое матрикса волоса. Фазы катагена/телогена сопровождаются снижением экспрессии HIF1a во всех отделах фолликула, что указывает на инактивацию HIF1. В отличие от волосяного фолликула, экспрессия белка HIF1a в ядрах клеток эпидермиса интактной кожи минимальна, однако она усиливается при воспалении, в том числе, связанном с процессом ранозаживления. Экспрессия ARNT в ядрах обнаружена в субпопуляции клеток базального и гранулярного слоев эпидермиса. Таким образом, активность HIF-1 комплекса в условиях физиологического тканевого гомеостаза в эпидермисе характеризуется очень низким уровнем.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об специфической взаимосвязи между физиологическими (гомеостаз) процессами роста/пролиферации эпителиальных производных кожи и активностью транскрипционного комплекса HIF1. Выявление характера этой взаимосвязи позволило разработать модель механизма контроля активности и детерминации эпителиальных клеток кожи как в гомеостазе, так и при регенерации её придатков.

Исследования поддержаны грантом РФФ № 19-015-00306А и внутренним грантом Курчатовского института.

МЕТА-ИССЛЕДОВАНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВАХ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Атякишин Д.А.¹, Аралова М.В.², Шишкина В.В.³.

ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Mashaaralova@mail.ru

1 - лаборатория патоморфологии и лекарственной токсикологии, Центр коллективного пользования (научно-образовательный центр), ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования России

2 – зав.отделением амбулаторно-поликлиническим стационаром БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница №1», с.н.с. НИИ экспериментальной биологии и медицины

3 – директор НИИ экспериментальной биологии и медицины, доцент кафедры гистологии ФГБОУ ВО ВГМУ им.Н.Н. Бурденко Минздрава России

META-STUDY OF MAST CELLS IN TROPHIC ULCERS OF DIFFERENT ETIOLOGY

Atiakshin D.A., Aralova M.V., Shishkina V.V.

Voronezh N.N. Burdenko State Medical University, Voronezh, Mashaaralova@mail.ru

Введение. Прогресс в лечении трофических язв невозможен без выявления закономерностей цито- и гистогенеза, дивергенции, гетероморфии, гетерокинеза и гетерохронии, лежащих в основе формирования как адаптивных изменений, так и патологических состояний тканей. *Цель исследования* - изучение особенностей секретома тучных клеток (ТК) кожи нижних конечностей при формировании трофических язв различной этиологии.

Материалы и методы. Исследовался биоматериал, полученный у пациентов с венозными, артериальными и нейротрофическими язвами, а также здоровая кожа. Производилась стандартная процедура пробоподготовки, окрашивание толуидиновым синим или по Романовскому-Гимзе, иммуногистохимическое окрашивание на выявление триптазы и химазы, а также двойное иммуномаркирование. Оценивались пути секреции триптазы и химазы, с учетом выведения отдельных гранул, смешанного экзоцитоза, пейсмекерной дегрануляции и формирования макровезикул.

Результаты и их обсуждение. В здоровой коже популяция тучных клеток была распределена неравномерно: в сосочковом слое дермы - характеризовалась меньшими размерами и небольшим содержанием секреторных гранул в цитоплазме; клетки, расположенные около сосудов и придатков кожи, обладали большими размерами,

количеством секреторного материала, преобладали клетки с одновременной экспрессией обеих протеаз и недегранулированные формы.

У пациентов с хронической артериальной недостаточностью не происходило достоверных изменений численности метакромагических тучных клеток, при этом триптаза-позитивных ТК в популяции кожи возрастало более чем в три раза, формировались группы клеток в определенных локусах, частота контактирования ТК друг с другом снижалась, свидетельствуя о формировании тенденции к разобщению их внутривнутрипопуляционных взаимодействий. Отмечалась активизация всех секреторных путей.

При хронической венозной недостаточности достоверно увеличивалось содержание тучных клеток как при окрашивании толуидиновым синим, так и после иммуногистохимической идентификации протеаз, по сравнению с нормальной кожей и картиной при хронической артериальной недостаточности.

Материал, полученный из участка нейротрофических язв, характеризовался наиболее выраженным возрастанием объема популяции ТК, наиболее крупными их размерами, выраженным полиморфизмом. Тучные клетки обильно инфильтрировали соединительную ткань дермы, обнаруживались в эпидермальном пласте, локализуясь в межклеточном пространстве. Активная дегрануляция триптазы и химазы приводила к разобщению клеток шиповатого слоя, тучные клетки локализовались между недифференцированными клетками базального слоя эпидермиса, часто прилежали к базальной мембране.

Заключение. Данные о клеточных и биохимических особенностях тучных клеток открывают новые возможности в диагностике трофических язв и свидетельствуют о перспективности регуляторного влияния на специфические протеазы тучных клеток в качестве мишени для фармакологических препаратов.

НАРУШЕНИЯ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООКРУЖЕНИЯ И КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КАК ОСНОВА ПАТОЛОГИИ

Юшков Б.Г.

ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Институт естественных наук и математики, Екатеринбург, ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, b.yushkov@iip.uran.ru

FAILURE OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE MICROENVIRONMENT AND PROGENITOR CELLS AS THE BASIS OF PATHOLOGY

Yushkov B. G.

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, The Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Institute of Natural Sciences and Mathematics, Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, b.yushkov@iip.uran.ru

Вопрос о роли взаимоотношения микроокружения и клеток-предшественников возник уже на начальных этапах исследования стволовых гемопоэтических клеток, когда McCuskey R.S., Meineke H.A. (1973) на примере страдающих анемией мышей линий Sl/Sl^d и W/W^v показали, что патология может быть связана не только с поражением клеток предшественников (W/W^v), но и гемопоэз индуцирующего микроокружения (Sl/Sl^d)-«стальная анемия» у мышей. При этом гемопоэтическая ткань последних характеризуется повышенным количеством синусоидов и повышенной концентрацией сульфатированных кислых гликозаминогликанов. Гемопоэтические клетки, как собственные, так и трансплантированные, не способны дифференцироваться в эритроидном направлении. Аналогичные поражения могут быть обнаружены у человека, например, гипопластические анемии, при которых нет эффекта от подсадов костного мозга. При таких экстремальных воздействиях на организм, как облучение, бензолная интоксикация, кровопотеря, воспаление и при миелолейкозе, инфаркте миокарда в кроветворной ткани содержание кислых гликозаминогликанов возрастает, и клетки-предшественники дифференцируются преимущественно в гранулоцитарном направлении, а при острой гипоксии растет содержание нейтральных гликозаминогликанов и дифференцировка смещается в сторону эритроидного ряда.

Трансплантация стволовых клеток имеет потенциал для терапевтического эффекта ряда сердечных заболеваний, включая инфаркт миокарда и прогрессирующую сердечную недостаточность. В настоящее время ведутся исследования по разработке биологических кардиостимуляторов, основанные на способности различных типов стволовых клеток дифференцироваться в пейсмейкерные клетки. Однако, уже в сообщении Zhang et al. [2002] отмечены аритмогенные свойства мышечных кардиомиоцитов, полученных из мультипотентных эмбриональных стволовых клеток. С чисто теоретической точки, аутологичные стволовые клетки могут вызвать аритмии с помощью трех различных механизмов: в процессе дифференцировки к конечному зрелому фенотипу стволовые клетки могут эволюционировать через промежуточные стадии, на которых внутренние электрофизиологические свойства клеточных мембран нестабильны, что, возможно, и способствует нарушению ритма, приживление стволовых клеток может быть связано с повышенной и гетерогенной адренергической иннервацией сердца, что может усилить пространственную неоднородность электрофизиологических свойств и инициацию желудочковой аритмии, местная травма или отек, вызванные внутримиекардиальной инъекцией, могут непосредственно способствовать развитию аритмий.

Миокард представляет собой синцитий электрически связанных клеток. Неспособность трансплантированных клеток структурно и функционально интегрироваться в миокард хозяина может представлять аритмогенный риск для пациентов. В качестве механизма развития аритмий может выступать ослабление межклеточных контактов в результате сниженной экспрессии коннексинов. Стволовые клетки способствуют замедлению проводимости между кардиомиоцитами.

Клетки микроокружения, в частности, фибробласты и их предшественники могут выступать в качестве поглотителей тока, тормозящих распространения потенциала действия. В экспериментах на животных показано, что введение фибробластов в атриовентрикулярный узел снижает скорость проводимости.

Полученные из костного мозга эмбриональные стволовые клетки человека при удачной трансплантации в ишемическую область сердца взрослого человека располагаются в кластерах внутри рубца инфаркта или пограничной зоне, но у них отсутствуют внутриклеточные переходные процессы кальция в ответ на деполяризацию мембраны *in situ*.

Таким образом, данные, полученные в исследованиях системы крови и патологии миокарда, дают основания предполагать, что нарушения структурного гомеостаза ткани, приводящие к дисбалансу между клетками-предшественниками и их микроокружением, может служить основой патологии. Этот механизм может лежать и в основе развития опухоли при трансплантации клеток-предшественников.

**МЕМБРАНОТРОПНЫЕ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИЕ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ
БИОРЕГУЛЯТОРЫ: СОСТАВ, СТРУКТУРА, УЧАСТИЕ В ПРОЦЕССАХ
РЕГЕНЕРАЦИИ**

Ямскова В.П.

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

ООО Институт проблем биорегуляции, Москва, yamskova-vp@yandex.ru

**MEMBRANOTROPIC HOMEOSTATIC TISSUE-SPECIFIC BIOREGULATORS:
COMPOSITION, STRUCTURE, PARTICIPATION IN THE PROCESSES OF
REGENERATION**

Yamskova V. P.

N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology RAS

Institute of Bioregulation Problems, Moscow, yamskova-vp@yandex.ru

Введение. Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) были обнаружены в различных тканях животных. Эти биологически активные вещества выделены в отдельную группу на основании общности проявляемых физико-химических свойств и характера биологического действия. Было установлено, что МГТБ локализованы в межклеточном пространстве тканей. Они влияют на основные биологические процессы (адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток), стимулируют восстановление и регенерацию в патологически изменённых тканях. Активность МГТБ характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности.

Материалы и методы. Исследование МГТБ проводили с помощью нового экспериментального подхода, сочетающего в себе методы выделения белков и пептидов из тканей. Белково-пептидные комплексы (БПК), входящие в состав МГТБ, очищали с применением ВЭЖХ, электрофореза в ПААГ, изоэлектрофокусирования в градиенте рН. Для исследования их состава и структуры применяли методы аминокислотного, углеводного, липидного анализ, масс-спектропии (MALDI TOF, Electrospray), ЯМР, методы протеомного анализа, включающие леддерное секвенирование карбоксипептидазой Y и метод RMF-peptide mass fingerprinting. Физико-химические свойства МГТБ изучали с применением методов УФ-спектрометрии, кругового дихроизма, лазерного светового светорассеяния. Исследование локализации МГТБ осуществляли методами иммуногистохимии. Биотестирование фракций, содержащих МГТБ, в процессе очистки идентифицировали с помощью оригинальных адгезиометрических методов. Исследование влияния МГТБ на процессы восстановления и репарации в тканях проводили на

экспериментальных моделях патологий *in vivo*, а также при роллерном органотипическом культивировании тканей млекопитающих и хвостатых амфибий *in vitro*.

Результаты и их обсуждение. МГТБ имеют сложный состав. Их основу составляют белково-пептидные комплексы (БПК), содержащие биологически активные пептиды с молекулярной массой от 1000 до 10000 Да и белок-модулятор, который оказывает влияние на их активность. Кроме ионов кальция, участвующих в поддержании структуры и активности БПК, в состав МГТБ входят углеводы и липиды. Все пептиды, входящие в состав МГТБ, являются продуктами протеолиза различных белков поверхности клетки, плазматической мембраны–ферментов, молекул адгезии, G α -белков, и характеризуется постоянством своего состава в БПК. Была установлена 100%-ная гомология белков-модуляторов МГТБ с сывороточными альбуминами (СА), которые соответствуют трем изоформам СА *Bos taurus* (по базе данных NCBI) - gi|1351907, gi|36746020, gi|74267962, различающимися составом аминокислот в четырех положениях полипептидной цепи – 116, 214, 429 и 579; и трем изоформам СА крысы - gi|124028612, gi|158138568, gi|55628 с заменой в положениях 262, 317 и 431. Установленные замены аминокислот расположены во втором и третьем домене молекулы СА. Биологическое действие МГТБ изучали на различных экспериментальных моделях в условиях *in vivo* и *in vitro*. Оптимальными для изучения биологического действия МГТБ оказались модели органотипического культивирования различных тканей, в основном амфибий, в условиях роллерного вращения, при котором происходила дополнительная активация клеточных источников регенерации. МГТБ оказывают выраженное протекторное действие, которое выражается в поддержании адгезионных межклеточных взаимодействий, работы основных ферментных систем, увеличении жизнеспособности клеток, а также в стимуляции процессов регенерации. В ряде экспериментов была продемонстрирована эпиморфная регенерация ткани при воздействии МГТБ *in vivo*, исключая образование соединительно-тканного рубца.

Заключение. Полученные результаты показывают, что МГТБ, способные дополнительно активировать клеточные источники регенерации, по сути, представляют собой мало изученные «тканевые формы» СА, которые образовались в результате его проникновения через гистогематические барьеры организма в межклеточные пространства тканей и взаимодействия по кальций-зависимому механизму с определенными пептидами.

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЯДЕР ЛИМФОЦИТОВ ЛИЦ С
ДЕФИЦИТОМ ХРОМОСОМНОГО МАТЕРИАЛА**

Ясакова Н.Т., Машак С.В., Лисиченко О.В.

ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет

**MORPHOLOGICAL FEATURES OF LYMPHOCYTE NUCLEI OF
CHROMOSOME-DEFICIENT INDIVIDUALS**

N.T.Yasakova, S.V.Mashak, O.V. Lisichenko

Novosibirsk State Medical University, jasakova@inbox.ru

Введение. В настоящее время актуальным представляется цитологическое исследование форменных элементов крови как способ раннего распознавания физиологических сдвигов или патологических процессов в организме, так как изменения на органном уровне, как правило, предшествуют изменениям на тканевом. Особое внимание привлечено к лимфоциту как к иммунокомпетентной клетке и как к элементу единой информационной системы, точно отражающей состояние макроорганизма. Морфологические характеристики ядра лимфоцита, в первую очередь, его хроматиновых структур, являются определяющим признаком, так как состояние интерфазного ядра со свойственным ему распределением хроматиновых субстанций свидетельствует о функциональном состоянии генома непосредственно в период его репликативной и транскрипционной активности. *Цель исследования* – изучить морфологические особенности лимфоцитов лиц с дефицитом хромосомного материала

Материал и методы. Методом оптико-структурного машинного анализа изучены окрашенные по методу Фельгена ядра лимфоцитов периферической крови (ЛПК) здоровых доноров и лиц с кариотипом 45,X. В сравнительном аспекте проанализированы морфометрические параметры более 2000 ЛПК.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты показывают, что при хромосомной патологии в ядрах достоверно возрастает количество конденсированного, генетически неактивного хроматина ($8,56 \pm 0,12$ и $10,19 \pm 0,18$ усл.ед.), а также – занимаемая им площадь ($15,72 \pm 0,36$ и $19,38 \pm 0,61$ мкм²) соответственно. Средняя оптическая плотность конденсированного хроматина практически не меняется ($0,55 \pm 0,01$ и $0,54 \pm 0,01$ усл.ед.). Гетерохроматиновые структуры в ядрах лимфоцитов при хромосомной патологии более мелкозернистые, что подтверждается возрастанием показателя их суммарного периметра ($16,78 \pm 0,27$ и $17,95 \pm 0,41$ мкм соответственно). Доля генетически активного деконденсированного хроматина снижается с $14,12 \pm 0,21\%$ до $13,23 \pm 0,27\%$. Коэффициент деформации гетерохроматиновых структур, отражающий адаптивный потенциал клетки, по сравнению со здоровыми донорами также снижен $1,19 \pm 0,01$ и $1,15 \pm 0,01$ соответственно.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о существенных изменениях в работе генетического аппарата лиц с дефицитом хромосомного материала. В ядрах их иммунокомпетентных клеток понижен уровень транскрипционной активности, что свидетельствует о возможных проблемах в работе иммунной системы. Имеются морфологические признаки снижения адаптивного потенциала, что также позволяет отнести этих лиц к группе риска в отношении продолжительности жизни.

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| Chulpanova D.S. 3 | Гаверова Ю.Г. 72 |
| Filin I.Y. 4 | Геворкян Н.М. 74 |
| Garipova V.A. 5 | Гилазиева З.Е. 76 |
| Kondrashov A.V. 7 | Гильмутдинова И.Р. 77 |
| Neganova I. 8 | Головичева В.В. 79 |
| Petrova E.S. 10 | Гореликов П.Л. 81 |
| Tarunina M. 12 | Гребнев Д.Ю. 82 |
| Абдусидов Х.А. 14, 16 | Григорян Э.Н. 85 |
| Абызова М.С. 18 | Губаева Д.Н. 87 |
| Авдеев Д.Б. 20 | Дариенко К.А. 89 |
| Алатраш Р. 21 | Деев Р.В. 91 |
| Александрова М.А. 23 | Диндяев С.В. 92 |
| Александрова С.А. 25 | Долматов И.Ю. 95 |
| Алексанкин А.П. 27 | Ельчанинов А.В. 97 |
| Аминова Г.Г. 29 | Емелин А.М. 99 |
| Андреева Е.Р. 31 | Ерофеева Л.М. 101 |
| Андрианова Е.В. 33 | Зайцев А.Е. 103 |
| Андрианова Н.В. 35 | Илизарова Т.Э. 105 |
| Арешидзе Д.А. 37, 39 | Кабдеш И.М. 107 |
| Артемова Д.А. 41 | Кананыхина Е.Ю. 108 |
| Артемьева К.А. 42 | Ковалев А.В. 110 |
| Асламов А.П. 44 | Козин В.В. 113 |
| Афанасьев Е.В. 46 | Кондашевская М.В. 115 |
| Бабаева А.Г. 47, 49 | Коротких А.Г. 117 |
| Бабенко В.А. 51 | Костенников А.А. 118 |
| Бобылёва П.И. 53 | Котова А.В. 120 |
| Боднар Н.О. 55 | Краснов М.С. 123 |
| Божокин М.С. 56 | Кривопапов С.А. 125 |
| Борхунова Е.Н. 58, 60 | Крохичева П.А. 127 |
| Булатенко Н.В. 62 | Курилов И.В. 129 |
| Бутов К.Р. 64 | Кутукова К.А. 130 |
| Варпетян А.М. 66 | Кушнерев К.С. 132 |
| Васильев А.В. 68 | Лохонина А.В. 134 |
| Власова А.А. 70 | Лысков Н.Б. 136 |

Мавликеев М.О. 138	Сидорский Е.В. 190
Маклакова И.Ю. 140	Скурихин Е.Г. 192
Матвеева Д.К. 142	Слесарев С.М. 194
Мещанинов В.Н. 144	Студеникина Е. Д. 196
Михайлова М.М. 146, 148	Суздальцева Ю.Г. 198
Могиленских А.С. 150	Супильникова О.В. 200
Могильная Г.М. 152	Сухачева Т.В. 202
Мойсенович М.М. 154	Сухинич К.К. 204
Надеждин С.В. 156	Сытина Е.В. 206
Недурובה И.А. 157	Тихонова Н.Б. 208, 210
Неустроев Г.В. 159	Ульянов И.А. 212
Панова А.В. 161	Фетисов С.О. 214
Пантелеев А.А. 152	Цыганков Ю.М. 216
Пахомова Е.А. 164	Чаулин А.М. 217
Пешкова К.Ю. 166	Чекмарева И.А. 219, 221
Плотников Е.Ю. 168	Чернова О.Н. 223
Полтавец А.С. 170	Черноруцкий М.В. 225
Пономарев А.С. 171	Чернявский В.И. 226
Пономаренко Е.А. 173,175	Шаймарданова А.А. 228
Пресняков Е.В. 177	Шафеи Е.В. 229
Ревкова В. А 179	Шинин В.В. 232
Романов Ю.А. 181	Шишкина В.В. 234
Сабиров Д.Х. 183	Юшков Б.Г. 236
Савельева А.П. 184	Ямскова В.П. 238
Сазонов С.В. 186	Ясакова Н.Т. 240
Саркизова М.Б. 188	



117418 Москва, ул. Цюрупы, 3



+7 (499) 120-80-65



morfolhum.ru



morfolhum@mail.ru