



материалы симпозиума

«Новейшие методы

клеточных технологий

в медицине»

2-6 сентября 2014 г.

Новосибирск, Академгородок

<http://celltech2014.niboch.nsc.ru/>

Организаторы:

- Министерство здравоохранения Российской Федерации;
- Национальное общество регенеративной медицины;
- Федеральное государственное бюджетное учреждение Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России;
- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Мероприятие проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований

Оргкомитет

Председатели:

Сухих Геннадий Тихонович, акад. РАН, д.м.н., проф.
Караськов Александр Михайлович, акад. РАН, д.м.н., проф.
Власов Валентин Викторович, акад. РАН, д.х.н., проф.
Козлов Владимир Александрович, акад. РАН, д.м.н., проф.
Афтанас Любомир Иванович, акад. РАН, д.м.н., проф.

Сопредседатели:

Закиян Сурен Минасович, д.б.н., проф.
Покушалов Евгений Анатольевич, д.м.н., проф.
Рихтер Владимир Александрович, к.б.н.

Члены оргкомитета:

Иванова Людмила Николаевна, акад. РАН, д.м.н., проф.
Дыгало Николай Николаевич, член-корр. РАН, д.б.н., проф.
Маркель Аркадий Львович, д.б.н., проф.
Рубцов Николай Борисович, д.б.н., проф.
Морозов Виталий Валерьевич, д.м.н., проф.
Кабилев Марсель Расимович, к.б.н.
Шевченко Александр Игоревич, к.б.н.
Медведев Сергей Петрович, к.б.н.
Шилов Александр Геннадьевич
Сандер Анастасия Сергеевна
Белеванцева Анна Владимировна
Шпак Оксана Анатольевна

Секретариат:

Захарова Ирина Сергеевна, к.б.н.
Васькова Евгения Андреевна, к.б.н.
Дементьева Елена Вячеславовна, к.б.н.
Малахова Анастасия Александровна, к.б.н.
Стеклова Анастасия Евгеньевна
Кузнецова Татьяна Александровна

Дорогие коллеги!

Добро пожаловать в Новосибирский Академгородок!

Мы рады приветствовать вас на Первом всероссийском симпозиуме «Новейшие методы клеточных технологий в медицине». В течение трех дней у вас будет возможность представить свои результаты и обсудить с коллегами перспективы совместных проектов и разработок. Важнейшая задача симпозиума — способствовать активному применению современных разработок в области биомедицинских исследований в нашей стране. Одним из ключевых шагов к ее реализации станет принятие меморандума о развитии клеточных технологий в Российской Федерации.

Надеемся, что симпозиум вам запомнится и доставит большую радость от общения с коллегами, а мы, со своей стороны, постараемся создать все необходимые условия для его успешного проведения.

Желаем вам интересных дискуссий, плодотворной работы и всего самого доброго.

Оргкомитет симпозиума

Содержание

Программа симпозиума	4
Тезисы пленарных докладов	10
Тезисы устных докладов	22
Тезисы постерных докладов	56
Тезисы заочных участников	87
Спонсорские страницы	95
Список участников	107
Авторский указатель	109

Программа симпозиума «Новейшие методы клеточных технологий в медицине»

2 сентября

День приезда и размещения

3 сентября

Конференц-зал ФГБУ ННИИПК им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава
России

9:00-17:00 Регистрация участников симпозиума

9:30-10:30 Открытие симпозиума

Приветственное слово: министр здравоохранения РФ, член-корр. РАН Скворцова В.И., зам. министра здравоохранения РФ, д.м.н. Краевой С.А., полномочный представитель Президента РФ в СФО, генерал Рогожкин Н.Е., ИО губернатора НСО Городецкий В.Ф., вице-президент РАН, председатель Сибирского отделения РАН, академик РАН Асеев А.Л., директор Департамента инновационного развития и научного проектирования Минздрава России, д.б.н., профессор Васильев А.В.

Президентская сессия: выступления академиков РАН Караськова А.М., Сухих Г.Т., Власова В.В., Афтанаса Л.И., Козлова В.А., Асеева А.Л.

Пленарные доклады. Утреннее заседание

Председатели: академики РАН Караськов А.М., Сухих Г.Т., Власов В.В.

10:30-11:00 Ткачук Всеволод Арсеньевич, академик РАН
Физиологические механизмы участия стволовых клеток в регенерации тканей

11:00-11:30 Готье Сергей Владимирович, академик РАН
Биоинженерные и клеточные технологии в создании биоискусственной печени

11:30-12:00 Кофе-брейк. Презентация второго издания книги «Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки» Медведев С.П., Шевченко А.И., Сухих Г.Т., Закиан С.М. под редакцией Власова В.В.

Пленарные доклады. Утреннее заседание. Продолжение.

Председатели: академики РАН Сухих Г.Т., Ткачук В.А.

12:00-12:30 Карпова Галина Георгиевна, д.х.н., профессор
Рибосомный профайлинг как новая технология для определения генной активности клеток

12:30-13:00 Медведев Сергей Петрович, к.б.н.
Использование новейших методов геномной инженерии для

создания моделей наследственных заболеваний на основе плюрипотентных клеток человека

13:00-14:00

Обед

Пленарные доклады. Вечернее заседание

Председатели: профессора Закиян С.М., Покушалов Е.А.

- 15:00-15:30 Козлов Владимир Александрович, академик РАН
Клеточные технологии — новый этап развития медицины
- 15:30-16:00 Чернявский Александр Михайлович, д.м.н., профессор
Клеточные технологии при хирургическом лечении ишемической болезни сердца
- 16:00-16:30 Аверьянов Александр Вячеславович, д.м.н.
Перспективы регенеративной медицины в лечении органов дыхания
- 16:30-17:00 Муслимов Сагит Асхатович, д.м.н., профессор
Концепция регенеративной медицины аллоплант
- 17:00-17:15 Кофе-брейк
- 17:15-18:30 **Круглый стол №1 «Федеральный закон и перспективы развития клеточных технологий в России»**
Супермодератор: Закиян Сурен Минасович, д.б.н., профессор
Выступления: Макаров Сергей Владимирович, к.м.н. «К вопросу о перспективах развития регенеративной медицины в регионах. Опыт Самарской области»
- 19:00-23:00 Фушет по случаю открытия симпозиума. Ресторан Дома Учёных СО РАН

4 сентября

Малый зал Дома Учёных СО РАН

- 9:00-17:00 Регистрация участников симпозиума

Пленарные доклады. Утреннее заседание

Председатели: академик РАН Козлов В.А., профессор Чайлахян Р.К.

- 9:30-10:00 Свердлов Евгений Давидович, академик РАН
Перспективы невирусной генной терапии рака
- 10:00-10:30 Александрова Мария Анатольевна, д.б.н., профессор
Роль нейральных стволовых клеток в регенерации нервной ткани
- 10:30-11:00 Деев Роман Вадимович, к.м.н.
Диагностические и лечебные возможности современных биотехнологий для пациентов с наследственными миопатиями
- 11:00-11:30 Колесников Николай Николаевич, д.б.н., профессор
Регуляторный потенциал микроРНК в геноме раковой клетки.
Причины и следствия
- 11:30-11:45 Кофе-брейк

Пленарные доклады. Утреннее заседание. Продолжение.

Председатели: профессор Закиян С.М., к.б.н. В.А. Рихтер, к.м.н. Деев Р.В.

- 11:45-12:15 Салахутдинов Нариман Фаридович, д.х.н., профессор
Природные соединения в дизайне препаратов нового поколения
- 12:15-12:45 Колосова Наталия Гориславовна, д.б.н., профессор
Адресованные в митохондрии производные пластохинона —
новый класс геропротекторов
- 12:45-13:15 Дементьева Елена Вячеславовна, к.б.н.
Моделирование сердечно-сосудистых заболеваний с
использованием индуцированных плюрипотентных стволовых
клеток человека
- 13:15-13:45 Захарова Ирина Сергеевна, к.б.н.
Разработка подхода получения клеточно-наполненного
сосудистого трансплантата
- 13:45-14:45 Обед
- 14:45-15:30 **Постерная сессия №1**
Модераторы: член-корр. РАН Дыгало Н.Н., д.б.н., профессор
Рубцов Н.Б., к.б.н. Шевченко А.И.

Доклады участников. Вечернее заседание

Председатели: д.б.н. Лебедев И.Н., к.м.н. Повещенко О.В.

- 15:30-15:45 Лебедев Игорь Николаевич, д.б.н.
Патогенетика хромосомных болезней: новые ожидания от
клеточных технологий
- 15:45-16:00 Глазко Татьяна Теодоровна, д. с.-х. наук, профессор
Генетическая компонента геномной нестабильности в
клеточных популяциях
- 16:00-16:15 Уфимцева Елена Геннадьевна, к.б.н.
Модель *ex vivo* для исследования взаимоотношений клеток-
хозяев с микобактериями в гранулематозных воспалительных
образованиях мышей с латентной туберкулезной инфекцией
- 16:15-16:30 Романов Юрий Аскольдович, д.б.н., к.м.н., профессор
Опыт применения клеток пуповинной крови в лечении
спастических форм ДЦП
- 16:30-16:45 Рябов Сергей Иванович, к.м.н.
Внутривенное введение клеток плацентарно/пуповинной крови
улучшает восстановление двигательной функции после травмы
спинного мозга
- 16:45-17:00 Савилова Анастасия Михайловна, к.б.н.
Опыт клинического применения мезенхимных стромальных
клеток для терапии привычного невынашивания и возможный
механизм действия
- 17:00-17:15 Сергеевичев Давид Сергеевич, к.б.н.
Культивирование мезенхимных стромальных клеток костного

- 17:15-17:30 мозга для клинического применения
Кофе-брейк
- 17:30-19:00 **Круглый стол №2**
Супермодератор: Закиян Сурен Минасович, д.б.н., профессор
Сидоренко Ольга Евгеньевна «Современное оборудование для
клеточных технологий», ООО «БиоВитрум»
Понкратов Кирилл Владимирович «Применение рамановской
спектроскопии для изучения стволовых клеток, переходов
клеток в различные состояния, отслеживания стволовых клеток
после трансплантации *in vivo* и *in vitro*, а также целевой
доставки лекарственных препаратов в опухоли с помощью
наночастиц», ООО «Ренишоу»
Струкова Лидия Александровна «IncuCyte Zoom — независимая
Time-lapse визуализация 2D и 3D клеточных культур. Любые
клетки, любой пластик, любые исследования», ООО «Квадрос-
Био»
Дементьева Елена Вячеславовна, к.б.н. «Обзор докладов 12-го
Ежегодного съезда Международного общества по исследованию
стволовых клеток, г. Ванкувер, 18-21 июня 2014 г.»

5 сентября

Малый зал Дома Учёных СО РАН

- 9:00-17:00 Регистрация участников симпозиума
- Доклады участников. Утреннее заседание**
Председатели: к.б.н. Павлова С.В., к.б.н. Шевченко А.И.
- 9:30-9:45 Пономарёв Игорь Владимирович, к.б.н.
Перспективы применения в регенеративной медицине
трехмерных клеточных конструкций, изготовленных без
использования матриц-носителей
- 9:45-10:00 Зайдман Алла Михайловна, д.м.н., профессор
Трехмерный хондротрансплантат — пластический материал
для коррекции ортопедической патологии
- 10:00-10:15 Чепелева Елена Васильевна
Разработка методов терапии инфаркта миокарда у крыс линии
WAG, основанных на трансплантации клеток кардиальной
культуры
- 10:15-10:30 Родина Алла Валерьевна, к.б.н.
Разработка препаратов мезенхимальных стволовых клеток на
биосовместимых полимерных матриксах для стимуляции
процессов регенерации
- 10:30-10:45 Степанова Алёна Олеговна
Влияние полимерной композиции на механические и
биологические свойства 3D матриксов, изготовленных методом

- электроспиннинга и предназначенные для изготовления протезов сосудов
- 10:45-11:00 Попова Ирина Владимировна
Экспериментальное изучение сосудистого протеза, изготовленного методом электроспиннинга
- 11:00-11:15 Розанова Ирина Аркадьевна
Создание заселенного аутологичными мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками синтетического сосудистого протеза
- 11:15-11:30 Свиридова Ирина Константиновна, к.б.н.
Некоторые физико-химические и биологические характеристики образцов скелета аквакультур склерактиниевых кораллов, предназначенных для реконструкции/инженерии костной ткани
- 11:30-11:45 Кофе-брейк

Доклады участников. Утреннее заседание. Продолжение
Председатели: член-корр. РАН Черных Е.Р., д.б.н. Богачев С.С.

- 11:45-12:00 Черных Елена Рэмовна, член-корр. РАН
Клеточные технологии на основе макрофагов для стимуляции нейрорегенерации
- 12:00-12:15 Сенников Сергей Витальевич, д.м.н., профессор
Клеточные технологии на основе дендритных клеток для онкологии
- 12:15-12:30 Шевела Екатерина Яковлевна, д.м.н., профессор
Ко-трансплантация стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток в онкогематологии
- 12:30-12:45 Нуштаева Анна Андреевна
Первичные клеточные культуры рака молочной железы человека для прогнозирования эффективности антираковых препаратов с различными молекулярными механизмами действия
- 12:45-13:00 Богачев Сергей Станиславович, д.б.н.
Идентификация стволовых иницирующих раковых клеток и стратегия их элиминации
- 13:00-13:15 Назаркина Жанна Константиновна, к.х.н.
Индукция цитотоксического иммунного ответа против клеток MCF-7 под действием дендритных клеток, активированных полиэпитопной ДНК-вакциной
- 13:15-14:15 Обед
- 14:15-15:00 **Постерная сессия №2**
Модераторы: член-корр. РАН Дыгало Н.Н., д.б.н., профессор Рубцов Н.Б., к.б.н. Шевченко А.И.

Доклады участников. Вечернее заседание
Председатели: академик РАН Иванова Л.Н., к.б.н. Медведев С.П.

- 15:00-15:15 Сундер Рмасуббу, к.т.н., профессор
Приложение механического воздействия в задачах развития клеточной структуры и ткани и исследования их свойств
- 15:15-15:30 Никитин Владимир Афанасьевич, к.б.н.
Когда мы научимся работать с единичной клеткой? Проблемы и перспективы микрохирургии ранних эмбрионов млекопитающих
- 15:30-15:45 Надточенко Виктор Андреевич, д.х.н., профессор
Фемтосекундные лазерные технологии в микрохирургии клеток и эмбрионов
- 15:45-16:00 Ведунова Мария Валерьевна, к.б.н.
Использование методов прижизненной детекции мРНК для изучения молекулярных механизмов нейропротективного действия нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) *in vitro*
- 16:00-16:15 Плакса Игорь Леонидович
Терапевтическая плазмида с геном *vegfl65*: результаты клинического применения и направления развития исследований
- 16:15-16:30 Дашинимаев Эрдэм Баирович, к.б.н.
Накопление бета-амилоида в культурах нейральных клеток доноров с синдромом Дауна как клеточная модель болезни Альцгеймера *in vitro*
- 16:30-16:45 Кофе-брейк
- 16:45-17:45 **Круглый стол №3. Принятие меморандума о развитии клеточных технологий в Российской Федерации**
Супермодератор: Закиян Сурен Минасович, д.б.н., профессор
Выступления: Садовой Михаил Анатольевич, д.м.н., профессор
«Формирование системы управления инновационной деятельностью в сфере регенеративной медицины»
- 17:45-18:30 Закрытие симпозиума. Подведение итогов
- 18:30-19:30 Заключительный фуршет

6 сентября

День отъезда

Тезисы пленарных докладов

КОНЦЕПЦИЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ АЛЛОПЛАНТ

Мулдашев Э.Р., Нигматуллин Р.Т., Галимова В.У., Муслимов С.А.*

ФГБУ Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава России

*e-mail: msagit@mail.ru

Результаты исследований, проведенных в последнее десятилетие, привели к формированию нового направления - регенеративной медицины. В настоящее время обозначились две концепции в развитии регенеративной медицины: первая основана на клеточной трансплантации, вторая – на имплантации аллогенных биоматериалов для стимуляции репаративной регенерации. Согласно современным представлениям репаративная регенерация тканей осуществляется за счет пролиферации и дифференциации мезенхимальных стволовых клеток, как местного, так и костномозгового происхождения, которые, в дальнейшем могут дифференцироваться в другие клеточные линии. Проведенные нами экспериментальные исследования с использованием морфологических и иммуногистохимических методов показали, что в месте имплантации аллогенного биоматериала Аллоплант происходит концентрация моноклеарных клеток-предшественников, среди которых преобладают гематопозитические стволовые клетки костномозгового происхождения. Можно считать, что аллогенный биоматериал и продукты его распада, являются аттрактантами гематопозитических стволовых клеток, а также создают условия для проявления ими относительно высокой пролиферативной активности и дифференциации. Ключевым фактором, влияющим на характер межклеточных взаимодействий, а также на процесс синтеза коллагена фибробластами и формирования коллагеновых волокон регенерата, является фенотипическая зрелость и активность макрофагов. Нам удалось проследить все стадии созревания макрофагов из моноцитов, мигрирующих из кровеносного русла и концентрирующихся вокруг частиц имплантированного биоматериала. Этот процесс, по-видимому, обусловлен полноценным микроокружением, формирующимся вначале из продуктов водной экстракции биоматериала, а в последующем - из продуктов его деградации (протеогликаны, гликопротеины, коллаген). Отсюда вытекает важный теоретический и практический вывод: подбирая биоматериалы с различной структурой и содержанием протеогликанов можно добиться формирования регенератов с различной структурой и преимущественным развитием тех или иных тканевых компонентов, т.е. управляемой тканевой регенерации. Результаты экспериментальных и клинических исследований по регенерации различных видов тканей подтвердили вышеописанную концепцию.

РИБОСОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ КАК НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕННОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК

Карпова Г.Г.

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: karпова@niboch.nsc.ru

Генная активность клеток проявляется в транскрипции — копировании генетической информации с ДНК на мРНК и трансляции — синтезе белка на мРНК, который во всех организмах осуществляют сложные надмолекулярные структуры — рибосомы. Современные методы, хотя и позволяют выделить все полностью синтезированные мРНК или исследовать протеом клеток определенного типа, не дают возможности определить набор мРНК, транскрибуемых в любой определенный промежуток времени. Такую возможность открывает стратегия рибосомного профайлинга (ribosomal profiling или Ribo-seq), разработанная для мониторинга трансляции *in vivo* с использованием метода глубокого секвенирования (Ingolia et al., 2009). В частности, эта стратегия позволяет устанавливать качественный состав мРНК, транскрибуемых рибосомами на определенных стадиях роста клеток, и определять активность трансляции конкретных мРНК на этих стадиях, что, в конечном итоге, позволяет определить профиль экспрессии генов в клетках в зависимости от их состояния. В общем, суть метода заключается в обработке клеток антибиотиками, блокирующими трансляцию мРНК на рибосомах, с последующим лизисом клеток и расщеплением клеточных РНК нуклеазой. В момент остановки трансляции с рибосомой оказываются связанными участки мРНК длиной до 30 нуклеотидов, которые рибосома защищает от расщепления. Именно эти фрагменты мРНК, очищенные от рибосом, используют для создания библиотеки кДНК с её последующим секвенированием. Достоинство метода рибосомного профайлинга состоит в том, что он дает полную картину генной активности клеток в короткий промежуток времени, что делает его одним из наиболее перспективных методов для исследования воздействия на клетки лекарственных препаратов или вирусной инфекции.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЕЙШИХ МЕТОДОВ ГЕНОМНОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛЕЙ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Медведев С.П.^{1,2,3,*}, Закиян С.М.^{1,2,3}

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ³ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия
*e-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Поиск новых лекарственных соединений и других способов терапии наследственных заболеваний требует наличия модельных систем для оценки их эффективности и безопасности. Одним из наиболее перспективных типов клеток, которые могут быть использованы для моделирования болезней, являются плюрипотентные клетки человека (эмбриональные стволовые (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)). Благодаря своему уникальному свойству — плюрипотентности, эти клетки способны давать в результате дифференцировки практически все типы клеток, из которых состоит тело взрослого человека. ИПСК также имеют существенное преимущество, которое заключается в том, что они могут быть получены в любой период жизни пациента. В докладе речь пойдет о возможностях, которые предоставляет совместное использование технологий, основанных на плюрипотентных клетках, и инструментов геномной инженерии: искусственных нуклеаз TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и системы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9. Совокупность данных технологий дает широчайшие возможности по созданию более совершенных изогенных клеточных моделей наследственных болезней, в том числе таких тяжелых нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и боковой амиотрофический склероз. Модели, полученные при помощи редактирования геномов плюрипотентных клеток, могут быть использованы для поиска новых мишеней для лекарственной и генной терапии, скрининга обширных библиотек потенциальных лекарственных соединений и токсикологических исследований уже существующих лекарств.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ — НОВЫЙ ЭТАП РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНЫ

Козлов В.А.

ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия
e-mail: vakoz40@yandex.ru

Более века назад было проведено первое, научно обоснованное переливание крови с учетом существования групп крови. Можно считать, что это было началом применения в медицине клеточных технологий. Цель здесь была одна – замещение, восполнение потерянной крови. Через более чем полвека в клинике стали использоваться клетки костного мозга, тоже с целью, формально, замещения и восполнения клеток костного мозга у больных с опустошенным костным мозгом после воздействия в летальных дозах облучения или химиопрепаратов. К методам клеточных технологий следует отнести также переливание лейкоцитарной и тромбоцитарной массы. Исходя из целей данных воздействий, последние, по-видимому, следует относить к разделу регенеративной медицины. К последней, по своим целям и задачам, принадлежит использование в терапии различных заболеваний стволовых клеток самого различного генеза: полипотентные кроветворные клетки, мезенхимальные стромальные клетки и др. Существует и другое направление в клеточных технологиях, где цели принципиально отличаются от таковых в чисто регенеративном направлении. Речь идет о методах клеточной иммунотерапии для лечения самых различных заболеваний, включая рак, атеросклероз, аутоиммунные и аллергические заболевания. Учитывая тот факт, что при всех патологических состояниях, где показано использование стволовых клеточных элементов, регистрируются те или иные нарушения функций иммунной системы, представляется целесообразным разрабатывать методы совместного применения стволовых клеток и иммунокомпетентных клеток с учетом их функционального предназначения. Несомненно, успешное развитие фундаментальных и клинических аспектов клеточных технологий невозможно в отсутствии специалистов в данной отрасли медицины. В этом отношении следует думать о новой врачебной специальности – врач клеточный биотехнолог.

РОЛЬ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Александрова М.А.

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
e-mail: mariaaleks@inbox.ru

Поиск путей стимуляции регенерации в нервной системе человека — одно из ведущих направлений нейробиологической науки и важная социальная проблема. В связи с увеличением продолжительности жизни по прогнозам ВОЗ заболевания, связанные с повреждениями мозга, к 2020 году начнут перегонять все остальные по смертности и инвалидизации. Активно развивающаяся регенеративная медицина, объединяющая современные биологические, медицинские и технологические достижения, направлена и на решение проблемы нейродегенеративных заболеваний.

Клетки мозга человека способны к регенерации в период эмбрионального и раннего постнатального развития, в то время как у взрослых регенерация блокируется доминирующей активностью ингибиторных молекул в совокупности с изменением внутренних клеточных регуляторных механизмов. Однако открытие нейральных стволовых клеток (НСК) свидетельствует о том, что в мозге есть зоны перманентной регенерации, где образуются прогениторные клетки, способные мигрировать, дифференцироваться и формировать функциональные связи с нейронами дефинитивного мозга. Сегодня в задачи регенеративной медицины входит изучение биологии НСК, разработка стратегий воздействия на процессы нейродегенерации, среди которых стимуляция эндогенных НСК, нейропротекция трофическими факторами, клеточная терапия на основе клеточных технологий.

При клеточной терапии НСК меняют среду микроокружения в травмированном мозге, стимулируют регенерацию нейронов и поддерживают их функции за счет выделения нейротрофических и противовоспалительных факторов, создают матрикс для регенерации аксонов и замещают погибшие нейроны и глиальные клетки. Основными источниками клеток для терапии являются фетальные НСК, НСК, полученные методами клеточных технологий из ESC и iPSC клеток, из астроцитов, фибробластов, РПЭ; клетки не нейрального генеза (ММСК). Развиваются технологии перепрограммирования астроцитов в нейроны *in situ* — внутри живого мозга.

В целом, очевидно, что успех клеточной терапии, регенераторные процессы и судьба клеток после пересадки в мозге реципиента, зависит от комплекса факторов: источника клеток, технологии культивирования, предифференцировки нейронов, степени их развития, методов трансплантации и иммунной компетенции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ – 14.04.00604а.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ЛЕЧЕБНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ МИОПАТИЯМИ

Деев Р.В.^{1,*}, Юрьева К.С.¹, Лисковых М.А.², Старостина И.Г.³, Соловьева В.В.³, Пономарцев С.В.², Куприна Н.Ю.⁴, Ризванов А.А.³, Томилин А.Н.², Ларионов В.Л.⁴, Исаев А.А.¹

¹Институт стволовых клеток человека, Москва; ²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ³Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; ⁴Национальный институт рака, Бетезда, США

*e-mail: romdey@gmail.com

Проблеме диагностики и этиотропного лечения наследственных мышечных заболеваний уделяется недостаточное внимание во всем мире. В данной области регенеративной медицины большая часть усилий сосредоточена на разработках способов коррекции заболеваний с драматическим патогенезом, в частности миопатии Дюшенна. При этом несколько десятков болезней, связанных с мутациями в генах, ассоциированных с рабдомиоглиогенезом, остаются за пределами внимания исследователей. Одним из таких заболеваний является поясно-конечностная мышечная дистрофия 2В, связанная с генетически обусловленным нарушением синтеза дисферлина, ответственного за репарацию сарколеммы при ее микроповреждениях.

Поскольку для полноценного функционирования поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани необходима постоянная полноценная продукция дисферлина, в качестве перспективных стратегий могут рассматриваться разнообразные способы коррекции генома, в частности технология искусственных хромосом человека (Human Artificial Chromosome, HAC) и сплайсосома-зависимый транс-сплайсинг РНК (Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing SMaRT). HAC может служить вектором для доставки терапевтического гена, способна находиться в клетке в неинтегрированном состоянии и равномерно передаваться во время митоза, практически не имеет ограничения в емкости и не вызывает мутагенеза или иммунного ответа. По технологии bottom-up создана HAC, несущая ген *DYSF*. Подтверждено эписомальное расположение в ядре СНО-клеток, наличие функциональной копии, кодирующей последовательности гена *DYSF*, с которой нарабатывался белок дисферлин.

Возможным альтернативным методом является использование претранс-сплайсируемых молекул РНК (ПТМ), содержащих высокоэффективные сайты сплайсинга и участок гена, нуждающийся в замене. SMaRT создает гибридную мРНК путем реакции транс-сплайсинга между эндогенной мишенью пре-мРНК и молекулой ПТМ. Средствами доставки ПТМ в клетки могут являться генетические вектора на основе адено- и аденоассоциированных вирусов. Получен рекомбинантный аденовирус (Ad5-ПТМ), кодирующий претранс-сплайсируемую молекулу РНК для коррекции мутации в одном из экзонов мРНК. Проведено выделение и генетическая модификация с помощью Ad5-

ПТМ мононуклеарных клеток периферической крови (содержащих моноциты, конституционально вырабатывающих дисферлин) человека (МКПК). Из генетически модифицированных МКПК была выделена общая РНК и синтезирована кДНК. Были оптимизированы условия для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации фрагмента сплайсируемого участка мРНК. Введение лишь части гена, замена отдельного экзона на этапе сплайсинга освобождает от необходимости доставки в клетку полной кДНК и решает проблему неконтролируемой экспрессии гена.

РЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОРНК В ГЕНОМЕ РАКОВОЙ КЛЕТКИ. ПРИЧИНЫ И СЛЕДСТВИЯ

Колесников Н.Н.

ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: kolesnikovnn@mcb.nsc.ru

За несколько последних лет сформировалось новое направление исследований механизмов онкогенеза у человека, связанное с микроРНК (миРНК) — классом малых некодирующих регуляторных РНК, участвующих в регуляции экспрессии белок-кодирующих генов. Они участвуют практически во всех базовых процессах от момента возникновения организма. Многочисленные данные однозначно свидетельствуют об их критической роли в ключевых процессах метаболизма, эмбрионального развития, пролиферации, дифференцировки, старения, иммунном и стрессорном ответах, геномном импринтинге, а также при разных патологиях, включая рак. За миллионы лет эволюции сформировалась регуляторная сеть миРНК с точно отлаженным механизмом взаимодействия миРНК с мРНК гена мишени. Одна миРНК может регулировать экспрессию от 10 до 200 генов, а, в свою очередь, один ген может быть под контролем десятка разных миРНК. МиРНК дифференциально экспрессируются в разных типах раковых клеток по сравнению с клетками нормальных тканей. МиРНК, ассоциированные с разными гистотипами опухолей или стадиями развития, могут служить в качестве соответствующих молекулярных биомаркеров в диагностике и прогнозе течения заболевания, а также быть потенциальными терапевтическими мишенями. Выяснение роли миРНК в канцерогенезе и разработка подходов к использованию миРНК в качестве диагностических биомаркеров при онкологических заболеваниях (рак щитовидной железы, опухоли головного мозга) человека и составили направление наших исследований в тесном сотрудничестве с ЗАО «Вектор-Бест», медицинскими учреждениями г. Новосибирска. На основе профилирования и анализа 25 миРНК на большом клиническом материале (операционный материал, биоптаты, кровь) создан прототип панелей (тест-систем), достоверно выявляющих и дифференцирующих доброкачественные и злокачественные новообразования щитовидной железы и опухоли мозга (глиобластомы), что крайне важно при неопределенности или затруднительности постановки диагноза по гистологическим стандартам. Проведена апробация использования тест-системы в случаях неопределенности диагностики при заболеваниях щитовидной железы на клиническом материале. Показана принципиальная возможность использования миРНК в качестве молекулярных маркеров при типировании новообразований щитовидной железы, молочных желез, опухолей головного мозга человека и перспективность исследований по этому направлению.

ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ДИЗАЙНЕ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Салахутдинов Н.Ф.

ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: anvar@nioch.nsc.ru

В докладе рассматривается роль различных классов растительных метаболитов в создании современных препаратов как используемых в медицине в настоящее время, так и находящихся на различных этапах доклинических и клинических испытаний. Особое внимание уделено следующим классам соединений: монотерпеноиды, фенольные соединения, тритерпеновые кислоты, алкалоиды. Рассматриваются синтетические трансформации различных растительных метаболитов и связь «структура-активность».

АДРЕСОВАННОЕ В МИТОХОНДРИИ ПРОИЗВОДНОЕ ПЛАСТОХИНОНА – НОВЫЙ КЛАСС ГЕРОПРОТЕКТОРОВ

Колосова Н.Г.

ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; НИИ митоинженерии МГУ, Москва, Россия

e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Рост продолжительности жизни людей в развитых странах со второй половины XX века определяли достижения медицины, обеспечившие успешное лечение ассоциированных с возрастом заболеваний, снижение смертности от них, что привело к увеличению числа страдающих ими людей преклонного возраста. Выход — в развитии медицины антистарения, нацеленной на замедление старения и профилактику связанных с ним заболеваний. Обсуждается перспективность использования стволовых клеток как для лечения дегенеративных заболеваний, так и для снижения связанных со старением дисфункций. Действительно, старение связано со снижением функциональных резервов стволовых клеток. Но если эффективность их трансплантации для восстановления тканей при острых повреждениях очевидна, то альтернативой ей при лечении и, тем более, профилактике хронических дегенеративных заболеваний, развивающихся, как правило, комплексно, являются воздействия, нацеленные на увеличение функциональности эндогенных стволовых клеток. Исследования последних лет показали, что такими свойствами обладают адресованные в митохондрии антиоксиданты — производные пластохинонов (Скулачев, 2007). Мы показали, что способность одного из них — 10-(6'-пластохинонил)-децил-трифенилфосфония (SkQ1) — предупреждать и/или задерживать старение, в том числе ускоренное, связана с поддержанием функциональных резервов гемопозитических и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, с предупреждением возрастного миелоидного сдвига. На крысах Вистар и преждевременно стареющих OXYS мы показали, что SkQ1 способен не только предупреждать развитие катаракты, возрастной макулярной дегенерации, ускоренное старение мозга с признаками болезни Альцгеймера и саркопении, но и снижает их выраженность у старых животных. SkQ1 действует как переносчик анионов жирных кислот через мембраны и вызывает мягкое разобщение окисления и фосфорилирования, снижает мембранный потенциал, уменьшая в результате продукцию митохондриями активных форм кислорода (Severin, 2010), имитируя эффекты ограничения калорийности диеты, убедительно доказанного способа увеличения продолжительности жизни, в том числе за счет повышения жизнеспособности стволовых клеток в стволовых нишах тканей организма. Такой механизм действия SkQ1 подтвердило подавление им mTOR-сигнального пути, опосредующего эффекты ограничения калорийности диеты. Мы надеемся, что SkQ1 и его аналоги найдут широкое применение в медицине антистарения. Так, на его основе созданы капли «Визомитин», которые уже широко применяются для лечения и профилактики ассоциированных со старением заболеваний глаз.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Дементьева Е.В.^{1,2,3,*}, Григорьева Е.В.^{1,2,3}, Вялкова А.В.^{1,2,3}, Медведев С.П.^{1,2,3}, Шевченко А.И.^{1,2,3}, Елисафенко Е.А.^{1,2,3}, Байрамова С.А.², Покушалов Е.А.², Иванисенко Н.В.¹, Иванисенко В.А.¹, Караськов А.М.², Сухих Г.Т.⁴, Закиян С.М.^{1,2,3}

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России; ³ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ⁴ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) представляют собой широкий спектр болезней, существенно различающихся по характеру проявления и причинам возникновения, и занимают первое место среди причин смертности населения в большинстве стран мира. Для поиска подходов к терапии ССЗ до недавнего времени использовались, главным образом, модельные животные. Однако, несмотря на достигнутые успехи в исследовании и лечении ССЗ, существуют определенные ограничения в использовании таких моделей, связанные с различиями в физиологии сердечно-сосудистой системы между человеком и другими видами животных. В связи с этим актуальной становится проблема поиска новых более совершенных подходов к моделированию ССЗ.

На данный момент наиболее перспективным является подход, основанный на получении пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и их последующей направленной дифференцировке в кардиомиоциты. В дальнейшем такие кардиомиоциты могут быть использованы для изучения молекулярных механизмов заболеваний и поиска лекарственных препаратов для их терапии. Особенно эффективным данный подход может стать в том случае, когда главной причиной возникновения ССЗ является наличие генетической мутации. В настоящее время уже получены кардиомиоциты, несущие мутации, вызывающие такие ССЗ, как синдром удлиненного интервала QT, катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия, наследственные кардиомиопатии.

В докладе будет подробно рассмотрено современное состояние проблемы моделирования ССЗ с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, а также представлены результаты, полученные авторским коллективом при применении данной технологии для создания модели синдрома удлиненного интервала QT.

ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ВАСКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ СОСУДОВ

Захарова И.С.^{1,2,3,*}, Шевченко А.И.^{1,2,3}, Живень М.К.^{1,3}, Саая Ш.Б.³, Карпенко А.А.³, Покушалов Е.А.^{2,3}, Иванова Л.Н.¹, Караськов А.М.³, Сухих Г.Т.⁴, Закиян С.М.^{1,2,3}

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России; ³ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ⁴ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия
*e-mail: zakharova.is@gmail.com

В настоящее время наблюдается рост числа заболеваний с патологией кровеносных сосудов. Лечение этих заболеваний предусматривает замену сосудов на синтетические или аутологичные, в связи с чем разработка тканеинженерных протезов сосудов остается актуальной задачей. Доклад посвящен разработке подходов получения эндотелиальных и муральных клеток из материала кардиальных эксплантов, а также путем направленной дифференцировки в монослое плюрипотентных стволовых клеток человека. Полученные васкулярные клетки применимы для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов, имеющих физиологические свойства, близкие к свойствам естественных кровеносных сосудов.

Тезисы устных докладов

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ МАКРОФАГОВ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ НЕЙРОРЕГЕНЕРАЦИИ

Черных Е.Р.*, Кафанова М.Ю., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Останин А.А.

ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: ct_lab@mail.ru

Способность поврежденного головного и спинного мозга к функциональному восстановлению позволяет рассматривать нейрорегенерацию в качестве новой мишени терапевтических воздействий. При этом перспективы стимуляции репаративных процессов в нервной ткани связывают с использованием клеточных технологий. Учитывая пластичность стволовых клеток (СК) и их способность дифференцироваться в нервные клетки, большинство экспериментальных исследований проведено со СК. Итоги этих исследований в моделях инсульта и травмы позволили заключить, что 1) трансплантация различных типов СК значительно улучшает неврологическое восстановление и 2) неврологическое восстановление обусловлено в первую очередь паракринными эффектами, связанными с антиапоптотическим действием, стимуляцией нейро- и синаптогенеза, активацией ангиогенеза и подавлением воспалительной реакции. Наряду со СК способностью к стимуляции нейрорепаративного ответа обладают противовоспалительные (M2) макрофаги, которые согласно последним данным во многом опосредуют действие стволовых клеток. Используя оригинальный подход (культивирование в условиях дефицита ростовых факторов), нами разработан новый протокол генерации M-2 макрофагов. По сравнению с M1-провоспалительными макрофагами полученные M2-клетки продуцируют значительно меньшие концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов, обладают существенно более низкой способностью стимулировать пролиферацию T-клеток в смешанной культуре лимфоцитов и не способны стимулировать T-клетки к продукции Th1- и Th-17 цитокинов. При этом M2 макрофаги характеризуются исключительно высокой продукцией IGF-1, повышенным уровнем VEGF и сходным с M1-клетками уровнем продукции ряда других цитокинов, обладающих нейропротективной и репаративной активностями. Клиническая апробация этих клеток при лечении тяжелых форм детского церебрального паралича (ДЦП) показала безопасность и хорошую переносимость, а также отсутствие неблагоприятных отдаленных эффектов в течение 5 летнего периода наблюдения. Интраклеточное введение M2-клеток при тяжелых формах ДЦП сопровождалась значимым улучшением моторных и когнитивных функций, а также снижением спастичности и судорожного синдрома. В настоящее время проводятся клинические испытания безопасности и эффективности M2-клеток в лечении церебрального инсульта и травматической болезни спинного мозга.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ОНКОЛОГИИ

Сенников С.В.^{1,*}, Курилин В.В.¹, Облеухова И.А.¹, Куликова Е.В.¹, Шевченко Ю.А.¹, Христин А.А.¹, Лопатникова Ю.А.¹, Филипенко М.Л.², Боярских У.А.², Храпов Е.А.², Сидоров С.В.³, Соколов А.В.³, Тархов А.В.³, Гончаров М.А.³, Вицин А.Е.³, Максютов А.З.⁴, Максютов Р.А.⁴, Гаврилова Е.В.⁴, Козлов В.А.¹

¹ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН; ²ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ³Городская клиническая больница №1, Новосибирск; ⁴ООО «АваксисБио», Кольцово, Новосибирская область, Россия

*e-mail: sennikov_sv@mail.ru

В настоящее время активно разрабатываются и используются клеточные технологии иммунотерапии онкологических заболеваний. Разрабатываются различные подходы для праймирования антигенами дендритных клеток, в том числе с помощью белковых лизатов или РНК опухолевых клеток, специфических белков, пептидов, а также ДНК конструкций, включающих последовательности антигена или отдельных эпитопов. В наших работах изучалась эффективность праймирования дендритных клеток с помощью лизатов или мРНК опухолевых клеток, ДНК конструкций, кодирующих иммуногенные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, а также эффективность использования иммунорегуляторных цитокинов для формирования цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа. В качестве объектов исследования были использованы мононуклеарные клетки больных колоректальным раком, раком яичника, раком молочной железы и немелкоклеточным раком легкого, а также опухолевые клетки больных после операционного удаления опухолевых узлов. Установлено, что дендритные клетки, праймированные с помощью лизата или мРНК опухолевых клеток, в присутствии иммунорегуляторных цитокинов (ИЛ-12, ИЛ-18) индуцируют в культуре мононуклеарных клеток формирование цитотоксического иммунного ответа против опухолевых клеток. Индукция цитотоксического иммунного ответа в культуре клеток сопровождается повышением продукции цитокинов Тх 1 типа и повышенной экспрессией цитотоксических молекул. Показана эффективность использования для праймирования дендритных клеток ДНК конструкций, кодирующих иммуногенные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов для колоректального рака и рака молочной железы. Таким образом, показана эффективность использования дендритных клеток, праймированных опухоль-ассоциированными антигенами (лизат, мРНК, ДНК-конструкции), для индукции цитотоксического иммунного ответа против аутологичных опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (Соглашение № 14.607.21.0043).

КО-ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

Шевела Е.Я.*, Баторов Е.В., Крючкова И.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: ct_lab@mail.ru

Представлены данные литературы и собственные результаты по применению костномозговых мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с целью восстановления гемопоэза и повышения эффективности иммунной реконституции при гемобластозах. Показано, что введение относительно небольших количеств *ex vivo* генерированных аутологичных МСК при проведении аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) у больных злокачественными лимфомами приводит к уменьшению длительности периодов критической нейтропении и тромбоцитопении. Эффект МСК наиболее выражен у больных с относительно низким количеством вводимых CD34⁺ клеток и не зависит от абсолютного содержания лимфоцитов в продукте сепарации. Пациенты с ко-трансплантацией МСК отличаются более эффективным ранним восстановлением лимфоцитов. Анализ возможных механизмов стимулирующего действия МСК выявил способность МСК усиливать *in vitro* пролиферацию Т-лимфоцитов, индуцированную ИЛ-2 или ИЛ-7. При этом было показано, что стимулирующий эффект МСК на пролиферативный ответ *ex vivo* в условиях индуцированной лимфопении реализуется преимущественно в отношении CD8 Т-клеток памяти, тогда как более интенсивное восстановление наивных CD4⁺ Т-клеток обусловлено антиапоптотическим эффектом МСК. Стимулирующий эффект МСК на иммунную реконституцию в более поздние сроки (к 6-12 мес.) проявлялся большим содержанием Т-клеток с фенотипом недавних мигрантов из тимуса у пациентов с ко-трансплантацией МСК, что свидетельствовало об активации тимопоэза. Характерно, что введение низких доз МСК не сопровождалось возрастанием относительного содержания регуляторных Т-клеток на протяжении всего 12-мес. посттрансплантационного периода. Исследование безопасности и параметров клинической эффективности не выявило увеличения частоты инфекционных осложнений и значимых различий между группами больных со стандартной ТГСК и ко-трансплантацией МСК и ГСК по показателю 5-летней общей выживаемости. Тем не менее, пациенты с ко-трансплантацией МСК характеризовались достоверно более высоким показателем безрецидивной выживаемости.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ В ЛЕЧЕНИИ СПАСТИЧЕСКИХ ФОРМ ДЦП

Романов Ю.А.^{1,*}, Тараканов О.П.¹, Радаев С.М.¹, Зотова Н.С.², Дугина Т.Н.¹, Ряскина С.С.¹, Смирнов В.Н.¹, Сухих Г.Т.²

¹ООО «КриоЦентр»; ²ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: romanov@cryocenter.ru

В ходе пост-регистрационных исследований медицинской технологии «Использование концентрата ядродержащих клеток пуповинной/плацентарной крови в лечении и реабилитации пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, травматическими и перинатальными поражениями головного мозга» (Разрешение Росздравнадзора № 2009/387 от 23.11.2009 г.) была проведена оценка безопасности и эффективности клеточной терапии в комплексном лечении пациентов с детским церебральным параличом (ДЦП) и сопутствующей церебральной патологией.

Под наблюдением находились 95 пациентов в возрасте 1-11 лет с установленным диагнозом ДЦП. У большинства пациентов заболевание было осложнено фокальной эпилепсией, гидроцефалией, частичной атрофией зрительных нервов, задержкой психического и речевого развития.

После комплексного неврологического обследования и письменного информированного согласия пациентам было проведено от 1 до 6 внутривенных введений отмытого от криопротектора концентрата аллогенных АВ0/Rh-идентичных клеток пуповинной крови в дозе 250 ± 10 млн. клеток на введение. Побочных негативных явлений, выходящих за пределы защитно-приспособительных реакций, или отдаленных нежелательных реакций не было выявлено ни у одного пациента.

При обследовании через 3-12 мес. положительная динамика была выявлена у 81% пациентов. Улучшение характеризовалось достоверным снижением патологического мышечного тонуса, возрастанием мышечной силы, улучшением показателей физического и психо-эмоционального развития. Наилучшие результаты были достигнуты в группе пациентов, получивших 3 и более введений концентрата: 74% в неврологическом/физическом статусе и 78% в когнитивной сфере. В группе детей, прошедших обследование по шкале GMFCS, достоверное улучшение показателей физического развития было констатировано у половины пациентов.

В целом, данное исследование подтвердило, что внутривенное введение концентрата ядродержащих клеток пуповинной крови является безопасной процедурой, способствующей в сочетании с физической реабилитацией эффективному снижению степени неврологического дефицита у пациентов с ДЦП и сопутствующими патологическими состояниями.

ВНУТРИВЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТАРНО-ПУПОВИННОЙ КРОВИ УЛУЧШАЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПОСЛЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

Рябов С.И.^{1,*}, Звягинцева М.А.¹, Просвирнин А.В.¹, Павлович Е.Р.¹, Смирнов В.А.², Гринь А.А.², Чехонин В.П.³, Смирнов В.Н.¹

¹ФГБУ РКНПК Минздрава России; ²ФГУ НИИ скорой медицинской помощи им. Н.В. Склифосовского; ³ФГУ ГНЦ социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского, Москва, Россия

*e-mail: sir1601@mail.ru

Восстановление функционирования поврежденного спинного мозга (СМ) является актуальной медико-социальной проблемой. Травмы СМ приводят к 80-100% инвалидизации пострадавших. Наиболее часто страдают грудной и поясничный отделы СМ (40-50%) в виде их компрессии, разможжения, частичного или полного разрыва. Последствием их повреждения являются в виде паралича или пареза конечностей и дисфункцией тазовых органов. В настоящее время не существует эффективных методов лечения травматических повреждений СМ. Применение кортикостероидов, регуляторных пептидов, блокаторов цикло-оксигеназы-1, различных препаратов ноотропного, холиномиметического и сосудорасширяющего действия не приводит к восстановлению утраченных функций СМ, поэтому сегодня ведется поиск препаратов, способных изменить эту ситуацию. Одним из направлений этого поиска может быть использование методов регенеративной медицины, опирающихся на использование стволовых клеток (СК), обладающих широким спектром действия. Источниками СК могут быть различные органы и ткани, как взрослого, так и развивающегося организма. Перспективным источником таких клеток на сегодня представляется пуповинная/плацентарная кровь (ППК), клетки которой имеют слабую иммуногенность, доступны и безопасны при получении, длительно хранятся и обладают широким спектром действия. Экспериментально было показано их положительное действие на выживаемость нейронов, регенерацию их волокон. Целью данного исследования было оценить эффективность внутривенного введения клеток пуповинной крови человека НУСВС после тяжелой травмы спинного мозга. Тяжелую контузионную травму спинного мозга (ТСМ) моделировали по методу “weight drop” на крысах после ламинэктомии на уровне Th9. Криоконцентрат клеток НУСВС в количестве 10 млн. клеток (Банк Стволовых Клеток, ООО «Крио Центр», Москва, Россия) на одно животное вводили в хвостовую вену на 1-е или 5-е сутки после контузии спинного мозга. Травмы спинного мозга были визуализированы с помощью МРТ, анатомических и гистологических методов. Восстановление двигательной функции задних конечностей крыс оценивали с помощью функциональных нагрузочных тестов: «Рота-род», «суживающаяся дорожка», «открытое поле». Тесты проводили еженедельно в течение 8 недель, начиная с 1-го дня после операции. Животные

были разделены на пять экспериментальных групп: 1-я — травма-самовосстановление, 2-я — травма + инъекция НУСВС на 1-е сутки, 3-я — травма + инъекция НУСВС на 5-е сутки, 4-я — ламинэктомия, 5-я — ламинэктомия + инъекция НУСВС. В 4-й и 5-й группах нарушений в движениях задних конечностей не наблюдали. В группах 1-й, 2-й, 3-й была сильная параплегия задних конечностей. Самовосстановление двигательной функции задних конечностей происходило за 4-5 недель и уровень восстановления в тесте «открытое поле» составляло 4-5 баллов по шкале ВВВ. Восстановление двигательной активности в группах 2-й и 3-й происходило в тот же срок после травмы, но его уровень по шкале ВВВ составлял уже 6-7 баллов. Достоверных различий между этими двумя группами обнаружено не было.

Заключение: полученные результаты показывают, что однократная внутривенная инъекция клеток НУСВС на 1-е или 5-е сутки после тяжелой спинномозговой травмы способна улучшить восстановление функций спинного мозга, связанных с движением задних конечностей. Достоверный терапевтический эффект ($p < 0,05$) такого введения ППК у крыс с тяжелой контузионной травмой спинного мозга составляет 14-16%.

ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПИИ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ И ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Савилова А.М.*, Тегруашвили Н.К., Чулкина М.М., Рылова Ю.В., Гордеева М.Н.

ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: a_savilova@oparina4.ru

Перспективным источником мезенхимных стромальных клеток (МСК) являются внезародышевые ткани человека (плацента) в связи с их высоким пролиферативным потенциалом, неинвазивным способом получения и отсутствием этических вопросов. Новизна работы заключается в использовании уникальных иммуномодуляторных свойств МСК для терапии привычного невынашивания. Целью пилотного исследования явилась оценка безопасности и эффективности применения аллогенных МСК из плаценты при системном введении для восстановления функциональной активности эндометрия и изучение возможного механизма действия клеточной терапии.

В исследование были включены 5 пациенток с тремя и более выкидышами в исходах предыдущих беременностей, с тонким эндометрием (не более 5 мм) и отсутствием ответа на стандартную терапию. Пациенткам было проведено однократное внутривенное введение 20-40 млн. выращенных в лаборатории и охарактеризованных немодифицированных аллогенных МСК, полученных из послеродовой плаценты. Наиболее значимым результатом работы является отсутствие побочных эффектов (аллергических, воспалительных реакций) на внутривенное введение данного количества клеток у всех пациенток. У 4 пациенток из 5 зарегистрировано увеличение толщины эндометрия с 4-5 мм до 7-9 мм. У одной пациентки наступила беременность, и произошло рождение здорового ребенка без осложнений, еще у одной пациентки беременность успешно развивается. В двух случаях произошла внематочная беременность. Одна пациентка направлена для проведения программы ЭКО. Проведено совместное культивирование МСК из плаценты и мононуклеарных клеток (МНК) крови от аллогенных доноров. Отдельно исследовали прикрепленную и неприкрепленную фракции клеток с помощью методов ПЦР «в реальном времени» и проточной цитометрии. В процессе совместного культивирования МСК и МНК происходило повышение экспрессии мРНК генов *il10*, *foxp3*, *il2r-alpha* (CD25) в неприкрепленной фракции МНК, что может свидетельствовать о стимуляции образования Т-reg клеток в МНК под действием МСК. Эта гипотеза была подтверждена *in vitro* и методом проточной цитометрии. После проведения клеточной терапии в крови пациенток также наблюдалось повышение содержания Т-reg клеток в трех случаях из четырех. Данные результаты мы рассматриваем как обнадеживающие, и одним из возможных механизмов действия МСК из плаценты считаем стимуляцию образования Т-reg клеток при их контакте с МНК.

НОВАЯ МОДЕЛЬ И СПОСОБ КОМПЕНСАЦИИ ПЕРВИЧНОГО МУЖСКОГО ГИПОГОНАДИЗМА

Куликов А.В.^{1,*}, Куликова П.А.⁴, Архипова Л.В.¹, Смирнова Г.Н.¹, Сусликов А.В.², Куликов Д.А.⁴

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

²Больница ПНЦ РАН, Пушкино; ³МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴Московский областной научно-исследовательский клинический институт, Москва, Россия

*e-mail: kulikov@iteb.ru

Мужской гипогонадизм — патология, характеризующаяся уменьшением уровня андрогенов или снижением чувствительности к ним. До 20% взрослых мужчин страдают приобретенным гипогонадизмом, причем отмечается тенденция к росту заболеваемости. Эта патология обуславливает разнообразные нарушения, как в социальной сфере, так и в соматическом здоровье мужчин. Снижение андрогенов может приводить к нарушению сперматогенеза и, как следствие, к бесплодию. На сегодняшний день основной метод лечения гипогонадизма — терапия андрогенами, имеющая ряд противопоказаний и осложнений. Очевидна необходимость разработки новых подходов коррекции этой патологии. Несовершенство всех имеющихся на сегодняшний день экспериментальных моделей гипогонадизма усложняет задачу разработки новых методов лечения.

Целью нашего исследования является поиск способа восстановления андроген-продуцирующей и репродуктивной функций при гипогонадизме. На пути к осуществлению этой цели мы выделили две последовательные задачи: во-первых, создание доступной модели мужского гипогонадизма со стойким нарушением гормонообразующей и репродуктивной функций, во-вторых, разработка трансплантологического метода коррекции этой патологии.

Работа проводилась на крысах Вистар массой 200-220 гр. Созданная нами модель гипогонадизма основана на временной ишемии тестикул, она характеризуется стойким нарушением гормонообразующей и репродуктивной функций, быстрым достижением эффекта, технологической доступностью.

Для коррекции патологии нами был разработан метод трансплантации аллогенной ткани костного мозга в пораженную область, что приводило к стойкому восстановлению как гормонообразующей, так и репродуктивной функций.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» 2013 г., 2014 г.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Сергеевичев Д.С.*, Докучаева А.А., Лактионов П.П., Сергеевичева В.В.

ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

*e-mail: d_sergeevichev@meshalkin.ru

Терапевтическое использование клеточных продуктов у человека требует соблюдения современных стандартов GMP и GCP, которые ограничивают применение препаратов ксеногенного происхождения в биотехнологическом производстве. Нами оптимизирован способ культивирования мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга человека с использованием лизата тромбоцитов человека вместо фетальной телячьей сыворотки. Способ позволяет за более короткий срок получить клетки, несущие МСК-специфический иммунофенотип, сохраняющие способность к делению и направленной дифференцировке *in vitro*, в количестве, достаточном для терапевтического применения или тканевой инженерии. Лизат тромбоцитов (ТРЛ) получали пулированием 10 стандартных разнотиповых доз тромбоконцентрата человека с последующей заморозкой-разморозкой и 3-ступенчатой стерилизующей фильтрацией. МСК получали из мононуклеарных клеток пунктата костного мозга центрифугированием на градиенте Lympholyte-N и культивированием в среде DMEM-LG, содержащей 10% ТРЛ и антибиотики. Иммунофенотип популяции после 4, 6 и 10 пассажей определяли проточной цитометрией по 12 маркерам. Для «заселения» бесклеточных фрагментов брахиоцефальных сосудов человека МСК метили Mitotracker-DR и культивировали 2 недели в CO₂-инкубаторе. Стерильность ТРЛ была подтверждена микробиологическими тестами, отсутствие ВИЧ, вирусов гепатита В и С показано ИФА и ПЦР. Первичная культура МСК достигала монослоя на 6 сутки. В дальнейшем пассажи осуществляли на 2-3 сутки. МСК имели характерную веретенообразную, иногда звездчатую форму с большим зернистым ядром. Цитометрический анализ МСК после 4 пассажа показал высокую степень чистоты популяции: экспрессия «мезенхимальных» маркеров CD29/44/73/90/105/166 более 96%, экспрессия CD14/19/31/34/45/HLA-DR менее 2%. После 6 и 10 пассажей различий в иммунофенотипическом профиле МСК не обнаружено. Культивирование с использованием ТРЛ снижает временные затраты в среднем на 15%. Способность клеток к остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировке доказана цитохимическим окрашиванием. При заселении графтов клетки формировали участки монослоя на стенках сосуда, что говорит о сохранении адгезивного потенциала при альтернативном способе культивирования, сохранении способности к делению и миграции. На 14 сутки культивирования были обнаружены клетки, экспрессирующие фибробластический маркер CD68 и гладкомышечный актин.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ТРЁХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАТРИЦ-НОСИТЕЛЕЙ

Пономарёв И.В.*, Ройтер Т.

Исследовательский центр по медицинской технике и биотехнологии (fzmb GmbH), Бад Лангензальца, Германия

*e-mail: iponomarev@fzmb.de

Регенеративная медицина, как одна из современных и стремительно развивающихся дисциплин, всё больше нуждается в методах, ориентированных на использование естественного восстановительного потенциала организма, в первую очередь, его клеточного потенциала. К одному из основных направлений в этой области относится метод тканевой инженерии, который сводится к выделению клеток из биоптата ткани, их экстракорпоральному размножению и дальнейшему культивированию на резорбируемой матрице-носителе для поддержания трёхмерного фенотипа с последующей имплантацией вновь созданного трансплантата в место дефекта. Однако, несмотря на биосовместимость и резорбируемость, материалы матриц-носителей являются чужеродными агентами как в среде клеточного конструкта, так и в самой ткани организма после имплантации. В связи с этим, способы изготовления трёхмерных клеточных конструкций без использования искусственных матриц представляют собой особый научно-практический интерес. Нами была разработана оригинальная методика создания трёхмерных клеточных конструкций без помощи матриц-носителей. Базовой моделью был выбран гиалиновый (суставной) хрящ и возможность его восстановления при использовании вновь созданных конструктов. Для начала были проведены сравнительные исследования *in vitro* между хрящевыми трансплантатами, изготовленными различными способами: с помощью матриц-носителей и по оригинальной методике. В результате хрящевые конструкты, изготовленные без применения матриц-носителей, показали 15-ти кратное превышение всех компонентов внеклеточного матрикса по отношению к матрице-ассоциированным моделям. В дальнейшем хрящевые конструкты, изготовленные по оригинальной методике, прошли успешное тестирование в трёх экспериментальных исследованиях на крупных животных: две на моделях лошадей (6 и 10 животных) и одна на овцах (51 животное).

Принимая во внимание принадлежность хондроцитов к общему пулу клеток соединительной ткани, была предпринята попытка использования данной технологии для создания трёхмерных конструктов из клеток других тканей. В качестве модели была выбрана сердечная артерия поросёнка. Изолированные клетки были успешно размножены в монослойной культуре (без выделения из общего пула эндотелиальных клеток, миоцитов и фиброцитов) и переведены в трёхмерное состояние. Таким образом, созданные конструкты из клеток артериальной стенки были подвергнуты аналогичному (по отношению к хондроцитарным) процессу культивирования и показали высокую степень

адаптации к предлагаемым культуральным условиям. Макроскопически и морфометрически они ничем не отличались от хондроцитарных конструкторов — размеры, стабильность формы, долговременное содержание в культуре (4 мес. в 3D). Биомеханическое тестирование конструкторов из разных клеточных линий (хрящевые и артериальные) также не выявило достоверных различий, однако гистологически и биохимически были обнаружены отличия, обусловленные, по-видимому, тканеспецифичностью исходных клеточных популяций. В предлагаемой работе также рассматривается создание сосудистоподобных (трубчатых) конструкций из клеток артериальной стенки, изготавливаемых без применения матриц-носителей.

ТРЕХМЕРНЫЙ ХОНДРОТРАНСПЛАНТАТ — ПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

Зайдман А.М.^{1,*}, Щелкунова Е.И.¹, Шевченко А.И.²

¹ФГБУ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России; ²ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: AZaydman@niito.ru

В настоящее время методом выбора лечения ортопедической патологии и травматических повреждений является применение металлических конструкций в виде винтов и пластин, изготовленных из никеля-титана. Альтернативой этим изделиям может быть разработанный и апробированный в эксперименте трехмерный хондротрансплантат, изготовленный из культивированных низкодифференцированных хондробластов, выделенных из хрящевой ткани новорожденных минисвиней.

Трехмерный хондротрансплантат состоит из хондробластов разной стадии дифференцировки и внеклеточного матрикса. Тканеспецифичность хондротрансплантата подтверждена методами морфогистохимии; ультраструктурной организацией клеток; методами иммуногистохимии — экспрессией белков агрекана, фибронектина, коллагенов I и II типов, хондроитинсульфата, Sox9. ПЦР анализ показал высокий уровень экспрессии протеогликанов матрикса хряща: агрекана, бигликана, люмикана, коллагенов I и II типов.

В эксперименте на модели искусственного перелома тела позвонка исследованы регенераторные потенции трехмерного хондротрансплантата. Остеогенная трансформация хондротрансплантата, помещенного в искусственный дефект тела позвонка, происходит через 1 мес. с последующим формированием органоспецифичной костной ткани. Восстановление костной ткани при применении хондротрансплантата происходит на основе энхондрального остеогенеза, эволюционно закрепленного как в эмбриогенезе, так и при репаративной регенерации.

Межпозвоночный остеохондроз — одна из распространенных патологий позвоночника. В основе развития остеохондроза лежит нарушение микроциркуляции метаболитов и нарушение лимфодренажа, клиническими проявлениями которых являются грыжеобразование, нейровертебральный конфликт, сопровождаемый выраженным болевым синдромом. На экспериментальной папаиновой модели остеохондроза произведено замещение дистрофически измененного пульпозного ядра хондротрансплантатом, по форме и размерам соответствующим дефекту. В зоне трансплантации наблюдалась пролиферация хондробластов, окруженных матриксом, в котором выявлялись высокополимерные протеогликаны. Высота межпозвоночного диска через 3 мес. была восстановлена, через 12 мес. наблюдалась органоспецифическая трансформация хондротрансплантата в структуру пульпозного ядра.

Таким образом, уникальные свойства трехмерного трансплантата, способного к быстрой органоспецифической трансформации, отсутствие антигенных свойств, позволяет осуществлять ксенотрансплантацию. Высокие репаративные потенции хондротрансплантата позволяют рекомендовать последний для лечения патологий опорно-двигательного аппарата.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ТЕРАПИИ ИНФАРКТА МИОКАРДА У КРЫС ЛИНИИ WAG, ОСНОВАННЫХ НА ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК КАРДИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Чепелева Е.В.^{1,2,3,*}, Павлова С.В.^{1,2,3}, Малахова А.А.^{1,2,3}, Милевская Е.А.^{3,4}, Русакова Я.Л.³, Подхватилина Н.А.³, Сергеевичев Д.С.³, Покушалов Е.А.³, Караськов А.М.³, Сухих Г.Т.⁵, Закиян С.М.^{1,2,3,4}

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ³ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России; ⁴ФГАОУ высшего образования Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск; ⁵ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: amareza@mail.ru

Относительно недавно обнаруженные стволовые клетки сердца (СКС) имеют большие перспективы в лечении сердечно-сосудистых заболеваний человека. Они сгруппированы в «ниши», располагающиеся между сердечными мышечными клетками. СКС не имеют возможности делиться во взрослом органе, однако делятся в условиях культуры клеток и дифференцируются в различные типы клеток сердца. Нами был разработан оригинальный протокол получения кардиоваскулярной культуры, обогащенной региональными стволовыми клетками, на основании свойств клоногенности и способности пролиферировать в суспензии в среде с низким процентным содержанием сыворотки. У лабораторных животных (крыс линии WAG) в процессе хирургической операции получали модель инфаркта миокарда. Кардиальные стволовые клетки вводили интрамиокардиально в зону ишемической полутени через 6 недель после инфаркта миокарда, в качестве контроля использовали введение PBS равного объема. Методом Эхо-КГ показано достоверное увеличение ударного объема и диаметра корня аорты в группе опытных животных по сравнению с контрольной группой через 6 недель после трансплантации клеток. На гистологических препаратах криосрезов сегментов сердца, окрашенных по методу пикро-Маллори, определена относительная площадь зоны хронического кардиосклероза. Показано, что у опытной группы крыс относительная площадь пораженной ткани сердца достоверно меньше по сравнению с контрольной группой. Методом иммунофлуоресцентного анализа криосрезов сердца показано увеличение плотности сосудов в периферической зоне сердца крыс опытной группы.

Таким образом, имплантация клеток полученной культуры в область левого желудочка у крыс линии WAG с экспериментальным ишемическим повреждением миокарда снижает объем рубцовой ткани, приводит к ангиогенезу в очаге поражения, предотвращает риск развития сердечной недостаточности.

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСАХ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ РЕГЕНЕРАЦИИ

Северин С.Е., Родина А.В.^{*}, Москалева Е.Ю., Тенчурин Т.Х., Хоменко А.Ю., Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н.

НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский НБИКС-центр, Москва, Россия

*e-mail: rodina.allav@gmail.com

Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в регенеративной медицине возможно для решения двух задач: для обеспечения заместительной терапии путем участия трансплантированных СК в восстановлении клеточного состава поврежденной ткани и для стимуляции процессов регенерации благодаря секреции МСК широкого спектра необходимых цитокинов. Важно подчеркнуть, что для решения задачи стимуляции процессов регенерации за счет секретируемых МСК биологически активных факторов, в отличие от задачи заместительной терапии, возможно использование аллогенных МСК и, благодаря этому, доступно быстрое получение необходимых препаратов при использовании даже небольшого банка таких клеток. В решении обеих задач для успешной трансплантации МСК необходимо создание специальных матриц (скаффолдов) для введения достаточного количества СК в зону повреждения и их длительного сохранения в этой области для реализации их функций. Эффективность полимерных материалов в качестве носителей для МСК определяется в первую очередь их адгезивными свойствами и отсутствием токсических свойств в отношении клеток. Удобными критериями оценки биосовместимости полимерных носителей являются сохранение способности клеток к пролиферации и дифференцировке при культивировании на полимере. Для получения клеточных препаратов на скаффолдах были разработаны протоколы получения МСК человека на волокнистых и пленочных носителях на основе хитозана и полилактида, которые могут быть использованы для стимуляции процессов регенерации при трудно заживающих ранах. МСК выделяли из липоаспирата подкожной жировой клетчатки здоровых добровольцев в соответствии со стандартным протоколом. Для определения уровня экспрессии отдельных маркеров МСК использовали проточную цитофлуориметрию. Морфологию и жизнеспособность клеток определяли с помощью световой микроскопии и регистрировали с помощью цифровой камеры. Показана биосовместимость и эффективность в качестве носителей МСК пленочных и волокнистых полимерных материалов из полилактида и хитозана. Разработанная технология приготовления изученных полимеров и получения препаратов МСК на скаффолдах из этих полимеров предполагает их возможное использование как средства для стимуляции регенерации трудно заживающих ран различного происхождения, в том числе трофических язв при диабете.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМЕРНОЙ КОМПОЗИЦИИ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 3D МАТРИКСОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА И ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРОТЕЗОВ СОСУДОВ

Степанова А.О.^{1,2,*}, Демьянова А.Ю.¹, Лактионов П.П.^{1,2}

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

*e-mail: lebedeva@niboch.nsc.ru

Протезирование сосудов жизненно необходимо при реконструкции коронарного кровообращения и сахарном диабете, зачастую приводящему к облитерирующему атеросклерозу сосудов нижних конечностей. Поскольку коммерчески доступные протезы имеют ряд недостатков, такие как склонность к тромбозу, гиперплазии неоинтимы, склеротизации, которые могут приводить к полной окклюзии протеза, вопрос о поиске подходящего материала для изготовления протезов остается открытым. Одним из перспективных методов для получения разнообразных матриксов является метод электроспиннинга, основным преимуществом которого является возможность сформировать материалы с необходимой структурой для функционального восстановления ткани, а также возможность вводить в состав волокон биологически активные компоненты. В качестве полимеров для создания матриксов были выбраны биodeградируемые полимеры: полилактид-ко-гликолид и поликапролактон и небiodeградируемый полимер — Нейлон 6, а также их смеси с желатином. Модуль Юнга для полученных материалов составляет для поликапролактона 6 МПа, для поликапролактона с добавлением желатина — 12 МПа, для нейлона 6 — 37 МПа, для полилактид-ко-гликолида — 3 МПа. Что свидетельствует о запасе прочности в области упругой деформации по сравнению с нативным сосудом. При исследовании жизнеспособности и скорости пролиферации первичных клеток на поверхности матриксов было показано, что введение в состав материала желатина увеличивает адгезию и скорость пролиферации клеток на поверхности матриксов. Данные относительно экспрессии генов белков адгезии, структурных белков клетки и белков внеклеточного матрикса в клетках, культивируемых на поверхности матриксов из разных полимеров и их смесей, демонстрируют, что экспрессия генов адгезии, цитоскелета и внеклеточного матрикса практически не зависит от микроструктуры поверхности, но зависит от материала, из которого изготовлен матрикс. Материалом, обеспечивающим наиболее близкий уровень экспрессии генов по сравнению с контролем, является матрикс из полилактид-ко-гликолида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА, ИЗГОТОВЛЕННОГО МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА

Попова И.В.^{1,*}, Степанова А.О.^{1,2}, Сергеевичев Д.С.¹, Покушалов Е.А.¹, Захарова И.С.^{1,2,3}, Шевченко А.И.^{1,2,3}, Закиян С.М.^{1,2,3}, Карпенко А.А.¹, Лактионов П.П.^{1,2}

¹ФГБУ НИИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России; ²ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ³ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
*e-mail: popovairinavladim@mail.ru

Отсутствие надежного длительно функционирующего сосудистого протеза малого диаметра (менее 6 мм) является одной из основных проблем современной ангиохирургии. **Цель исследования** — разработать протез сосуда нового поколения, обладающий повышенной био- и гемосовместимостью и длительно сохраняющий биомеханические свойства.

Методы исследования: исследовано 3 типа протезов сосудов, изготовленных методом электроспиннинга, внутренним диаметром 1,7 мм и с толщиной стенки 100-150 микрон, а именно: протез, изготовленный из поликапролактона (ПКЛ), протез из ПКЛ с желатином и непроницаемым внутренним слоем, протез из сополимера молочной и гидроксипропановой кислот (полилактид-ко-гликолид, ПЛГА), ПКЛ с содержанием желатина, включающий непроницаемый внутренний слой. Протезы были имплантированы в интрааортальный отдел аорты 45 крысам линии Wistar (по 15 крыс на каждый протез) с использованием операционного микроскопа OPMI PICO (Carl Zeiss, Германия). Прокладимость протеза сразу после имплантации и перед выведением животных из эксперимента оценивалась при помощи метода магнитно-резонансной томографии с использованием «BioSpec 117/16USR» (Bruker, Germany) и диагностической ультразвуковой системы Vivid i. Крыс выводили из эксперимента на 2; 4 и 19-20 недели после имплантации и анализировали состояние протеза, анастомоза и окружающих тканей при помощи интраоперационной оценки, обзорной микроскопии с использованием бинокулярного микроскопа Stereo Discovery V12 (ZEISS, GERMANY) с окраской SIBR GREEN I; гистологического исследования с окрашиванием Гематоксилин-эозином, по фон Коссу; по Маллори. Исследование на конфокальном микроскопе с окраской на фибронектин, CD31, αSMA.

Заключение: по данным МРТ и УЗИ все типы протезов были проходимы в течение всего времени наблюдения. Данные обзорной микроскопии и гистологического исследования демонстрируют, что оптимальными протезами, не вызывающими воспалительной реакции прилежащих тканей, формирования неоинтимы и не демонстрирующие тенденции к значимому утолщению внутренней стенки и стенозированию, являются протезы, содержащие внутренний непроницаемый слой.

СОЗДАНИЕ ЗАСЕЛЕННОГО АУТОЛОГИЧНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ СИНТЕТИЧЕСКОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА

Розанова И.А.^{1,*}, Повешенко О.В.^{1,2}, Лыков А.П.^{1,2}, Бондаренко Н.А.^{1,2}, Никонорова Ю.В.^{1,2}, Подхвятилина Н.А.¹, Сергеевичев Д.С.¹, Карпенко А.А.¹, Коненков В.И.^{1,2}, Караськов А.М.¹

¹ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России; ²ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: arir@ngs.ru

Одним из вариантов преодоления высокой тромбогенности синтетических сосудистых протезов является создание выстилки из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Последние способны дифференцироваться в эндотелиоциты. Для увеличения адгезии ММСК к синтетическому материалу могут быть использованы компоненты экстраклеточного матрикса (ЭКМ) – фибронектин и коллагены, которые содержатся в межклеточном веществе сосудов человека. **Цель исследования** — разработать технологию изготовления клеточно-заселенных синтетических сосудистых протезов. **Материалы и методы:** работа проведена с использованием синтетических сосудистых протезов (ПТФЭ «Гор-Текс»). Для заселения использовались ММСК, выделенные из костного мозга крыс. Количество клеток для заселения составило 1×10^6 на 1 см^2 материала. Образцы ПТФЭ обрабатывались фибронектином и коллагеном I типа, фибронектином и коллагеном IV типа, фибронектином и смесью коллагенов I и IV типов. Окрашивание клеточного слоя производилось через 6 недель культивирования после фиксации в 10% формальдегиде гематоксилин-эозином. Морфометрия заселенных образцов осуществлялась с использованием светового микроскопа Carl Zeiss, программа Vision 4.8.2. **Результаты:** показано, что предобработка образцов фибронектином и коллагенами приводит к статистически значимому увеличению площади заселения ММСК по сравнению с контролем. В частности, площадь клеточного слоя при культивировании с фибронектином и коллагеном I типа составила 35,1% от общей площади образца, фибронектином с коллагеном IV типа — 7,7% от общей площади образца, фибронектином и коллагенами I и IV типа — до 57,7% от общей площади образца. Площадь клеточного слоя в контроле — 4,7% ($p < 0,05$). Подсчет ядросодержащих клеток показал, что предобработка образцов ПТФЭ смесью фибронектина с коллагеном I типа повышает количество клеток в 5,26 раза, фибронектина с коллагенами I и VI типов в 7,13 раза, а предобработка образца смесью фибронектина и коллагена IV типа в 2,33 раза по сравнению с контрольным необработанным образцом ($p < 0,05$). **Заключение:** предварительная обработка политетрафторэтилена компонентами экстраклеточного матрикса способствует фиксации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОБРАЗЦОВ СКЕЛЕТА АКВАКУЛЬТУР СКЛЕРАКТИНИЕВЫХ КОРАЛЛОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ/ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Сергеева Н.С.^{1,2}, Свиридова И.К.^{1,*}, Бритаев Т.А.³, Комлев В.С.⁴, Попов А.А.², Кирсанова В.А.¹, Ахмедова С.А.¹, Шанский Я.Д.¹, Дгебуадзе П.Ю.³, Тетерина А.Ю.⁴

¹ФГБУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Минздрава России; ²ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России; ³ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцева РАН; ⁴ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

*e-mail: prognos.06@mail.ru

Разработка и внедрение биоматериалов для пластики дефектов костной ткани остается актуальной проблемой. Скелет склерактиниевых кораллов из естественных поселений (СКЕП) может быть использован для органотипического восстановления костной ткани как материал для имплантации или 3D-матрикс для клеток, в том числе, ММСК в составе тканеинженерных конструкций (ТИК). Однако добыча СКЕП и стандартизация состава затруднены. Альтернативой СКЕП мог бы стать скелет кораллов из аквакультуры (СКАК) с условиями с близкими к биотопу параметрами среды.

Цель исследования — изучение физико-химических и биологических особенностей образцов СКАК в аспекте их возможного использования для замещения костных дефектов и инженерии костной ткани.

Материалы и методы: использованы образцы СКАК сем. *Pocilloporidae* (*P. verrucosa*) и *Acroporidae* (*A. formosa* и *A. nobilis*), выращенные на искусственных носителях, и СКЕП тех же видов. Исследованы их структура, морфология частиц, химический состав, динамика резорбции в моделирующем растворе, прочностные свойства. *In vitro* исследована их цитосовместимость на модели фибробластов человека (ФЧ, МТТ-тест), *in vivo* — биосовместимость (подкожная имплантация образцов мышам) и изучено поведение ММСК в составе ТИК (культуры ММСК, меченые CM-DiI и иммобилизованные на образцах СКАК, подкожная имплантация крысам).

Результаты: основной фазой трех образцов АК кораллов и двух из ЕП является арагонит. Все образцы СКАК и СКЕП содержат примеси переходных металлов на уровне предельно допустимых значений. Обнаружена слабая скорость деградации данных кораллов в физиологическом растворе, что подтверждается результатами СЭМ. Образцы СКАК обладают более высоким пределом прочности, чем образцы СКЕП. Образцы СКАК нетоксичны в отношении ФЧ, обладают выраженными матриксными (для клеток) свойствами поверхности, не вызывают реакции воспаления в области имплантации. ММСК крысы в составе ТИК на основе СКАК остаются функционально активными как минимум на протяжении 4-х недель. Образцы СКАК являются

перспективными для их дальнейшего изучения в качестве остеопластического материала или 3D матрикса в составе ТИК в инженерии костной ткани. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-03-12127 офи-м.

ПАТОГЕНЕТИКА ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ: НОВЫЕ ОЖИДАНИЯ ОТ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Лебедев И.Н.^{1,2,*}, Кашеварова А.А.^{1,2}, Скрыбин Н.А.^{1,2}, Назаренко Л.П.¹, Чечеткина Н.Н.¹, Мензоров А.Г.³, Матвеева Н.М.³, Серов О.Л.³

¹ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН; ²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск; ³ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Хромосомные болезни занимают существенное место в структуре врожденной и наследственной патологии человека. Однако, несмотря на продолжительную историю их изучения и наличие высокоразрешающих методов молекулярно-цитогенетической диагностики, многие аспекты патогенеза заболеваний, обусловленных числовыми и структурными нарушениями хромосом, остаются неясными. Причинами этого являются несколько факторов. Среди них можно отметить и значительный клинический полиморфизм хромосомных синдромов, и, в то же время, наличие множества сходных неспецифических признаков, встречающихся у пациентов с совершенно различными хромосомными мутациями. Дополнительную неопределенность в установление фенотипических корреляций вносит протяженный размер хромосомных мутаций, затрагивающих одновременно широкий спектр генов с различными функциями. Наконец, еще одним существенным ограничением является невозможность интерпретации большинства клинических эффектов хромосомных аномалий по анализу лимфоцитов периферической крови, с использованием которых традиционно проводится цитогенетическая диагностика. Появление технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) с их последующей направленной дифференцировкой в тот или иной тип клеток открывает принципиально новые возможности в изучении патогенеза хромосомных болезней на молекулярном и клеточном уровне. Недавно опубликованы первые работы в этом направлении на модели синдрома Дауна (Mou et al., 2012; Hibaoui et al., 2014). В настоящей работе мы впервые сообщаем о получении линий iPSCs от двух пациентов с недифференцированными формами умственной отсталости, имеющих уникальные реципрокные микроделеции или микродупликации одного и того же хромосомного субсегмента 3p26.3, содержащего единственный ген *CNTN6*, продукт которого вовлечен в формирование межаксонных взаимодействий при развитии центральной нервной системы. Дальнейшее направление исследований будет связано с проведением дифференцировки линий iPSCs в нейрональном направлении с целью характеристики морфологических, функциональных и транскриптомных изменений в клетках с хромосомными мутациями. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 14-15-00772.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОМПОНЕНТА ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ В КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Глазко Т.Т.*, Косовский Г.Ю., Глазко В.И.

Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий
РАСХН, Москва, Россия

*e-mail: vglazko@yahoo.com

Под мутационными спектрами принято подразумевать весь ряд мутаций, от геномных до точковых нуклеотидных замен. Сложность мутационных спектров, множественность механизмов возникновения разных типов мутаций затрудняет объективную оценку общей нестабильности генетического аппарата. Генетически обусловленные особенности мутационных спектров по преимущественному варианту геномных и хромосомных мутаций для разных лабораторных линий мышей описаны достаточно давно. Для клеток костного мозга мышей линии BALB/c типична повышенная частота полиплоидизации, для C57BL/6J — анеуплоидии, а для CC57W/Mv — хромосомных aberrаций. Под влиянием ионизирующего облучения (поглощенная доза ~0,5 Гр/год) в клетках костного мозга мышей этих линий возрастает та часть мутационного спектра, которая отличала каждую линию от других в контрольных группах. При спонтанной неопластической трансформации эмбриональных фибробластов мышей разных лабораторных линий наблюдаются отличия по скорости накопления перестроенных хромосом. В 8 линиях и сублиниях, полученных из фибробластов мышей СЗН/He, доля неперестроенных Xp на клетку варьировала от 85 до 95 % (в среднем 93 %); в 4 сублиниях мышей СВА/Са — от 74 до 86 % (80 %); в 3 сублиниях мышей C57BL/6 — от 83 до 86 % (85 %). В исследованиях результатов микроядерного теста у моно- и дизиготных близнецов человека (Surowy et al., 2011) получены данные, свидетельствующие о существенном вкладе генетической компоненты в изменчивость как базальных частот клеток с микроядрами у разных индивидуумов, так и их увеличения под влиянием, в частности, ионизирующего облучения. Накопленный материал означает, что клеточные линии сохраняют генетическую компоненту геномной нестабильности, типичную для источника своего происхождения, на протяжении многих поколений клеточных делений и под влиянием генотоксических воздействий. Каждая клеточная линия имеет свои особенности мутационного спектра, механизмов контроля темпов клеточного деления и клеточной дифференцировки. В этом случае при разработках методов клеточной терапии с использованием клеточных популяций различного происхождения особое значение приобретают исследования и выявления таких особенностей, на основании которых возможен прогноз направлений их эволюции. По-видимому, это требует создания каталога вариантов преобладающих типов генетической изменчивости и их идентификационных признаков для клеточных популяций, наиболее часто используемых в клеточных технологиях, имеющих медицинскую направленность.

ПЕРВИЧНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МЕХАНИЗМАМИ ДЕЙСТВИЯ

Нусштаева А.А.^{1,*}, Коваль О.А.¹, Сакаева Г.Р.^{1,2}, Гуляева Л.Ф.², Герасимов А.В.³, Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.¹

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²ФГБУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН; ³Государственный областной онкологический диспансер, Новосибирск, Россия
*e-mail: nushtaeva.anna@gmail.com

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкозаболеванием среди женщин. Молекулярная характеристика опухоли позволяет выбрать оптимальный способ терапии и снизить токсические эффекты. Одним из перспективных подходов к решению этой проблемы является разработка технологий первичных клеточных культур РМЖ для получения молекулярной характеристики опухоли конкретного пациента и подбора оптимального лечения. Первичные клеточные культуры РМЖ могут быть также использованы в дальнейшем для тестирования новых антираковых препаратов, примером которого является потенциальный противоопухолевый препарат — лактаптин. Лактаптин — природный пептид, фрагмент каппа-казеина человека, обладающий цитотоксическим действием на раковые клетки человека в культуре.

Цель работы — разработка комплексного протокола получения, молекулярного типирования и тестирования чувствительности к действию противоопухолевых препаратов первичных культур клеток для прогностической оценки вероятного ответа опухоли на лечебные воздействия.

Результаты: были разработаны способы получения первичных клеточных культур нормальной и опухолевой ткани молочной железы, среди них был выбран оптимальный способ получения и культивирования. Были получены 8 культур, из которых одна представлена клетками из нормальной ткани молочной железы. С помощью метода ОТ-ПЦР, иммуноцитохимией и проточной цитометрией культуры были охарактеризованы на наличие гормональных рецепторов (ER α , β , PGR), маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (α SMA, CK5/6, CK8/18, виментин и Ki-67) и Cyp19. Исследована чувствительность полученных культур к противоопухолевым препаратам методом МТТ-теста. В режиме реального времени была исследована адгезия, пролиферация клеток и цитотоксическое действие традиционных химиопрепаратов и лактапина на приборе xCelligence.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТВОЛОВЫХ ИНИЦИИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК И СТРАТЕГИЯ ИХ ЭЛИМИНАЦИИ

Долгова Е.В.¹, Алямкина Е.А.¹, Ефремов Я.Р.^{1,2}, Николин В.П.¹, Попова Н.А.^{1,2}, Тыринова Т.В.³, Козел А.В.², Минкевич А.М.², Андрушкевич О.М.², Завьялов Е.Л.¹, Ромащенко А.В.¹, Байбородин С.И.^{1,2}, Таранов О.С.⁴, Омигов В.В.⁴, Шевела Е.Я.³, Ступак В.В.⁵, Мишинов Е.В.⁵, Рогачев В.А.¹, Проскурина А.С.¹, Шурдов М.А.⁶, Останин А.А.³, Черных Е.Р.³, Богачев С.С.^{1,*}

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²Новосибирский государственный университет; ³ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск; ⁴Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область; ⁵ФГБУ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России, Новосибирск; ⁶ООО «Панаген», Горно-Алтайск, Россия

*e-mail: labmolbiol@mail.ru

Известно, что до 40% CD34+ стволовых клеток крови мыши интернализуют фрагменты двуцепочечной ДНК как в *in vivo*, так и в *ex vivo* экспериментах. При этом показано, что совместная обработка экспериментальных мышечных циклофосфаном и препаратом двуцепочечной ДНК интерферирует процесс репарации межцепочечных сшивок в гемопоэтических предшественниках, что приводит к изменению их плюрипотентных свойств. Обнаружено, что в различных сообществах активно пролиферирующих клеток млекопитающих присутствует популяция клеток, способная интернализировать фрагменты двуцепочечной ДНК, и что эта популяция в сообществах раковых клеток обладает признаками стволовых иницирующих клеток. Впервые приводятся данные (на модели опухоли Кребс-2), что совместная обработка циклофосфаном и препаратом двуцепочечной ДНК приводит к эрадикации туморогенных свойств перевиваемого графта, что связано с удалением популяции клеток, обладающей признаками стволовых иницирующих раковых клеток.

ИНДУКЦИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ КЛЕТОК MCF-7 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, АКТИВИРОВАННЫХ ПОЛИЭПИТОПНОЙ ДНК-ВАКЦИНОЙ

Назаркина Ж.К.^{1,*}, Харьковова М.В.¹, Антонец Д.В.², Бажан С.И.², Карпенко Л.И.², Власов В.В.¹, Ильичев А.А.^{1,2}, Лактионов П.П.^{1,3}

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область; ³ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

*e-mail: zha_naz@niboch.nsc.ru

Несмотря на совершенствование средств диагностики и терапии рака молочной железы (РМЖ), смертность от этого заболевания занимает одно из первых мест среди всех онкологических заболеваний женщин. Поэтому повышение эффективности терапии РМЖ является актуальной задачей. Одним из подходов терапии РМЖ является индукция иммунного ответа против клеток опухоли, а одним из вариантов индукции иммунного ответа является активация дендритных клеток (ДК) ДНК-вакцинами, кодирующими искусственные полиэпитопные Т-клеточные антигены, оптимизированные для повышения эффективности индукции Т-клеточного ответа и включающие большое количество эпитопов.

С использованием программного обеспечения TEpredict и PolyCTLDesigner сконструирована полиэпитопная ДНК BC2, содержащая эпитопы белков HER2 и Mammaglobin-1 (Mam) — наиболее часто встречающихся маркеров РМЖ. Получены и охарактеризованы свободные от ЛПС препараты плазмидных ДНК pBC2, pMam и pHER2, кодирующие полиэпитопный антиген и полные копии Mam и HER2. Зрелые ДК были получены из моноцитов периферической крови человека. Оптимизированы условия доставки ДНК в дендритные клетки. С использованием проточной цитометрии и микроскопии показано, что полученные ДК обладают морфологическими и фенотипическими признаками зрелых ДК. Зрелые ДК продуцируют в 10-100 раз больше ИЛ-6, чем незрелые, и в 2 раза меньше ИЛ-10. Стимуляция ДК приводит к усилению пролиферации Т-клеток и повышению секреции ИФН- γ Т-клетками. Не выявлено различий между уровнем продукции ИЛ-4 Т-клетками, культивируемыми в присутствии и в отсутствие ДК. Таким образом, полученные ДК стимулируют Th1-поляризацию Т-клеток и индукцию цитотоксического иммунного ответа. Количество ИФН- γ -продуцирующих Т-клеток, сокультивируемых с клетками MCF-7, было выше для Т-клеток, стимулированных ДК, трансфицированными pBC2, чем для Т-клеток, стимулированных ДК, трансфицированными pMam и pHER2. Полученные данные свидетельствуют о том, что ДК трансфицированные плазмидой pBC2, способны к эффективной антиген-специфической активации Т-клеток.

МОДЕЛЬ *EX VIVO* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ КЛЕТОК-ХОЗЯЕВ С МИКОБАКТЕРИЯМИ В ГРАНУЛЕМАТОЗНЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ МЫШЕЙ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Уфимцева Е.Г.

ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск, Россия

e-mail: ufim1@ngs.ru

Актуальной проблемой медицины в лечении и профилактике туберкулезного заболевания является изучение механизмов продолжительной персистенции микобактерий в клетках млекопитающих на латентной бессимптомной стадии инфекции человека и животных. Для исследования взаимоотношений клеток-хозяев с внутриклеточными патогенами была разработана модель монослойных культур клеток, мигрировавших *ex vivo* из индивидуальных гранулематозных воспалительных образований или гранул, полученных из селезенки, костного мозга и легких мышей линии Balb/c спустя 20 дней, 1 и 2 мес. после заражения вакциной БЦЖ-1 (BCG, bacillus Calmette-Guérin, аттенуированный штамм *M. bovis*) *in vivo* (Уфимцева, 2013; Ufimtseva, 2013). Кислотоустойчивые BCG-микобактерии с неповрежденной клеточной стенкой выявили в макрофагах, дендритных клетках и многоядерных клетках Пирогова-Лангханса, но не в фибробластах, нейтрофилах, эозинофилах и мегакариоцитах гранул мышей с латентной туберкулезной инфекцией. Мыши различались и по количеству гранул с BCG-содержавшими клетками, и по числу клеток с микобактериями в гранулемах. Наблюдали как морфологическую, так и функциональную гетерогенность бактерий BCG в клетках гранул на разных стадиях латентной инфекции мышей. Впервые в цитоплазме макрофагов и дендритных клеток выявили образование туберкулезными бактериями корд-фактора, признака вирулентности микобактерий и аналога биопленки, представляющих колонии микроорганизмов с повышенной устойчивостью к антимикробным агентам. Макрофаги гранул мышей сохранили функцию утилизации в фагосомах поврежденных лимфоцитов и тромбоцитов одновременно с утратой своей бактерицидной способности в отношении микобактерий, содержащихся в тех же клетках. Колокализации BCG-микобактерий с флуоресцентным маркером лизосом LysoTracker DND-99 не обнаружили в макрофагах гранул. Клетки гранул мышей как с кислотоустойчивыми BCG-микобактериями, так и без бактерий содержали повышенное количество рецепторов фагоцитоза CD11b, CD11c, CD14 и CD16/CD32 и костимуляторных молекул CD80, CD83 и CD86, колокализовавшихся в микродоменах на плазматической мембране. Макрофаги гранул продуцировали провоспалительные цитокины IFN γ и IL-1 α , ростовые факторы GM-CSF и FGFb одновременно с сохранением в них микобактерий. Таким образом, предложенная модель *ex vivo* перспективна для дальнейшего изучения механизмов выживания и преодоления внутриклеточными бактериями многочисленных врожденных и приобретенных защитных систем организма-хозяина при туберкулезной инфекции животных и человека.

ПРИЛОЖЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В ЗАДАЧАХ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНОЙ СТРУКТУРЫ И ТКАНИ И ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ СВОЙСТВ

Wynn A.¹, Sunder R.^{2,*}

¹Instron-TGT, Norwood, Massachusetts, USA; ²Bangalore Integrated System Solutions (P) Ltd, Bangalore, India

*e-mail: rs@biss.in

Большой мечтой как пациентов, так и врачей уже долгое время является замена частей тела естественным и совместимым дублем. Современные достижения науки в ряде дисциплин, включая инженеринг прецизионного динамического механического воздействия с учетом его влияния на биологию клеток и регенерацию ткани, химию, физику и биомеханику, все в совокупности позволяет реализовать эту мечту. Доклад посвящается описанию новейшей техники систем механического воздействия, биореакторов, измерения и мониторинга, используемой в регенеративной медицине.

КОГДА МЫ НАУЧИМСЯ РАБОТАТЬ С ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКОЙ? ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ МИКРОХИРУРГИИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Никитин В.А.^{1,2,*}, Фесенко Е.Е.¹

¹ФГБУН Институт биофизики клетки РАН; ²ФГБУН Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Россия

*e-mail: vnikitin2001@rambler.ru

Развитие генетической и клеточной инженерии требует по-новому отнестись к работе с единичной клеткой и с генетическим материалом, вносимым в нее. Для того чтобы все возможности этих инженерий стали реальностью и могли быть безопасно использованы в медицине (ЭКО и др.), необходимо тщательно рассмотреть момент взаимодействия клетки и микроинструментов, клеточного материала и манипуляций экспериментатора. Именно с этого, самого ответственного момента начинаются повреждение клеток, нарушение их целостности. Первый контакт с клеткой вызывает её деформацию. Значительная деформация клетки при введении микроинструмента приводит к увеличению внутриклеточного давления и, в результате, — к утечке внутриклеточного содержимого. В настоящей работе предлагается несколько способов репарации перфораций. Известный, широко используемый способ удерживания эмбриона во время операции при помощи микроприсоски, по нашим данным, приводит к потере компонентов внутриклеточного содержимого: аминокислот, белков и низкомолекулярных веществ. Предлагается оригинальный способ удерживания эмбриона во время операции без использования аспирационного отрицательного давления микроприсоски. Время пребывания клетки или эмбриона в условиях *in vitro* является для неё большим испытанием. Мы предлагаем специальную микрокамеру открытого типа, использование которой сокращает время операции до нескольких десятков секунд в отличие от протокольных десятков минут. Причем микроинструменты, а их может быть много, вводятся в микрокамеру одним движением препаратоводителя микроскопа без опасений их повредить. Исключается применение масла для снижения испарения среды во время пребывания клеток в микрокамере. Использование масла, вообще, приводит к возникновению многих проблем. Микроинструменты, покрытые маслом после прохождения через него, оставляют в клетке масляный «трек». Последнее модифицирует липидный матрикс внутриклеточных мембран так, что, по нашим данным, приводит к изменению их модуля Юнга, проницаемости и эластичности. Мы предлагаем вообще не использовать масло при работе с клетками и ранними эмбрионами и сообщаем о некоторых альтернативных методах преодоления испарения растворителя клеточной среды. Новая микрокамера позволяет также работать при максимальном увеличении оптического микроскопа (объективы 90x и 100x).

ФЕМТОСЕКУНДНЫЕ ЛАЗЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МИКРОХИРУРГИИ КЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ

Айбуш А.¹, Гостев Ф.¹, Астафьев А.¹, Шахов А.¹, Залесский А.¹, Верещагин К.², Шашков Е.², Ларин В.Т.³, Никитин В.А.^{3,4}, Надточенко В.А.^{1,*}

¹ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН; ²ФГБУН Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва; ³ФГБУН Институт биологического приборостроения РАН; ⁴ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

*e-mail: nadtochenko@gmail.com

Достижения медицины в области клеточной биологии создали надежный фундамент для разработки новых клеточных технологий для изучения ряда внутриклеточных механизмов. Применение лазерной техники открывает новые возможности для реализации трудно решаемых задач клеточной инженерии, таких как трансплантация, транспозиция, транслокация, микродиссекция, инкорпорация, имплантация органелл в клетку и др. Развитие клеточных биотехнологий опирается на развитие методов биофотоники для визуализации биоструктур и манипулирования наноразмерными объектами в микрообъемах. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в развитии методов микроманипулирования с помощью микропипеток, электрофореза и диэлектрофореза, и манипуляций с помощью магнитных наночастиц, разработка новых способов генетического репрограммирования клеток или эмбрионов в совокупности с прецизионной пространственно-временной регуляцией разнообразных биологических функций клетки с помощью оптогенетических актуаторов остается высоко актуальной. В настоящей работе сообщается о разработке аппаратного комплекса для решения задач лазерной микрохирургии клеток и эмбрионов. Для экспресс-контроля положения клетки в операционном поле предлагается использовать фазово-контрастную микроскопию при подсветке операционного поля излучением видимого диапазона. Манипулирование в микрообъеме клеток и эмбрионов осуществляется лазерным пинцетом — оптическими ловушками непрерывного Ti^{3+} -сапфирового лазера. Излучение фемтосекундного Ti^{3+} -сапфирового лазера, сфокусированное объективом микроскопа, используется в качестве лазерного скальпеля. Имеется возможность мультиплексирования оптических ловушек непрерывного излучения с функцией лазерного пинцета и оптических ловушек от фемтосекундного лазера с функцией лазерного скальпеля. Мультиплексирование осуществляется методом динамической голографии с использованием SLM матрицы. Для построения трёхмерного изображения клетки и определения химического состава органелл в структуре клетки/эмбриона используется фемтосекундная CARS-микроскопия со сканированием коллинеарно-взаимодействующих световых пучков.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ мРНК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА (BDNF) *IN VITRO*

Ведунова М.В.^{1,2,*}, Сахарнова Т.А.^{2,1}, Митрошина Е.В.^{2,1}, Мухина И.В.^{2,1}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского; ²ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

*e-mail: MVEDUNOVA@yandex.ru

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) участвует не только в дифференцировке нейронов и формировании синаптических контактов в процессе развития мозга, а также может быть активным корректором метаболизма зрелых нейронов при развитии патологических состояний, таких как гипоксия. Ранее нами было показано, что превентивное введение BDNF способствует сохранению функциональной активности нейронных сетей и предотвращает гибель клеток в диссоциированной культуре. Одним из основных путей защиты нейронов головного мозга от гипоксического повреждения является TrkB-зависимая активация NF- κ B1. Однако возможность BDNF-зависимой активации NF- κ B1 в условиях гипоксического повреждения в настоящее время не доказана. Целью исследования стало изучение влияния BDNF на синтез мРНК NF- κ B1 при моделировании нормобарической гипоксии.

Исследования проводились на первичных диссоциированных культурах гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии CBA. Моделирование нормобарической гипоксии осуществлялось на 14 день развития путем замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Исследование функциональной активности нейронных сетей осуществлялось с использованием кальций-чувствительного красителя Oregon Green (Invitrogen). Для оценки активации NF- κ B1 использовались РНК-зонды (SmartFlare, Millipore), позволяющие прижизненно исследовать активацию гена и появление в цитоплазме мРНК. Установлено влияние BDNF на изменение спонтанной кальциевой активности нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа после воздействия нормобарической гипоксии. Показано, что гипоксия вызывает увеличение количества NF- κ B1 активированных клеток. Превентивное введение BDNF (1нг/мл) достоверно снижает ($p < 0,05$) количество мертвых клеток, при этом количество клеток с мРНК NF- κ B1 неотлично от показателей интактных культур. Таким образом, защитный эффект BDNF не связан с активацией синтеза NF- κ B1, а реализуется на более ранних звеньях антиапоптотических реакций.

Работа поддержана грантами РФФИ №13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ПЛАЗМИДА С ГЕНОМ *vegfl65*: РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ И НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Плакса И.Л.^{*}, Деев Р.В., Исаев А.А.

Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

*e-mail: i.plaksa2014@yandex.ru

Реализация стратегии терапевтического ангиогенеза с использованием генных препаратов, в частности плазмиды, кодирующей VEGF165, является одной из современных стратегий улучшения перфузии ишемизированных тканей за счёт индукции естественных процессов образования и роста сосудов. Геннотерапевтический препарат, активным веществом которого является такая кодирующая плазида *p-vegfl65* (Иткес, Киселев, 2005), внесен в Государственный реестр лекарственных средств России в 2011 г. Геннотерапевтический компонент комплексного лечения показан пациентам с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК) 2-3 стадии (по А.В. Покровскому-Фонтейну) атеросклеротического генеза. В ходе длительного (3 года) пострегистрационного наблюдения за пациентами были получены данные, свидетельствующие об увеличении основного диагностического показателя — дистанции безболевого ходьбы на 408%.

Применение *p-vegfl65* у пациентов с осложненными формами ХИНК показало следующие тенденции. У 16 пациентов с критической ишемией на фоне генной индукции ангиогенеза выполнялась гибридная хирургическая операция. Удалось добиться хорошего и удовлетворительного результатов у всех пациентов. Основным критерием эффективности таких операций является проходимость шунтов на отдалённых сроках лечения. Через год 100% шунтов были проходимы и функционировали нормально без признаков стенозирования (Кательницкий, Кательницкий, 2014).

Применение *p-vegfl65* в составе комплексной консервативной терапии у 5 пациентов с синдромом диабетической стопы способствовало прекращению прогрессированию ишемии. У 4 из 5 пациентов на фоне критической ишемии удалось добиться заживления язвенного дефекта и ограничения некрозов. При этом одному пациенту удалось сохранить опорную функцию конечности, выполнив лишь малую ампутацию (в пределах стопы) (Бродский, 2014).

Применение *p-vegfl65* в составе комплексной консервативной терапии у 4 пациентов с облитерирующим тромбангиитом на фоне ХИНК увеличило дистанцию безболевого ходьбы в среднем на 56 м. Улучшение функционального статуса пациентов коррелировало с увеличением объёма периферического русла по данным радионуклидной сцинтиграфии нижних конечностей на 17% (Виноградов, 2014).

Полученные результаты долговременных исследований, а также включение *p-vegfl65* в схему лечения тяжелых сосудистых поражений позволило предположить потенциальную эффективность при ишемическом повреждении миокарда. Результаты доклинического исследования на модели инфаркта

продемонстрировали обнадеживающие результаты. В настоящий момент ведётся подготовка к реализации 2 фазы клинического исследования для определения безопасности и эффективности применения препарата у пациентов с ишемической болезнью сердца, стабильной стенокардией напряжения, у которых нет возможности проведения реваскуляризирующей операции.

НАКОПЛЕНИЕ БЕТА-АМИЛОИДА В КУЛЬТУРАХ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДОНОРОВ С СИНДРОМОМ ДАУНА КАК КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА *IN VITRO*

Дашинимаев Э.Б.^{1,2,*}, Артюхов А.С.², Большаков А.П.^{2,3}, Васильев А.В.¹

¹ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; ³ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*e-mail: dashinimaev@gmail.com

Болезнь Альцгеймера (БА) является одним из самых распространенных и социально значимых нейродегенеративных заболеваний в развитых странах. БА поражает в основном лиц пожилого возраста старше 65 лет, однако существуют редкие формы заболевания поражающие людей в 30 и менее лет. К группе риска БА можно также отнести людей с Синдромом Дауна (СД). К настоящему времени накоплено много данных, говорящих о ненормальном метаболизме бета-амилоида у людей с СД, выражающимся в накоплении бета-амилоидных бляшек в тканях головного мозга, начиная уже с подросткового возраста, а также в аномально высокой встречаемости случаев БА среди людей с СД после 50 лет (Mann et al., 1989; Lemere et al., 1996). В данной работе мы поставили перед собой цель изучить возможность создания клеточной модели, воспроизводящей патологические процессы БА на основе нейральных клеток доноров с СД. Для этого мы репрограммировали несколько культур клеток амниотической жидкости человека с СД до плюрипотентного состояния с получением линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые затем дифференцировали в нейральном направлении. С целью доказательства состоятельности нейральной дифференцировки, полученные культуры клеток мы протестировали несколькими методами, включая измерение специфической электрофизиологической активности нейронов методом патч-клампа. В результате мы показали, что нейральные клетки от доноров СД обладают патологическим метаболизмом бета-амилоида по сравнению со здоровым контролем, выражающимся в повышенной секреции и накоплении гранул патологической изоформы бета-амилоида bA-42 в культуре клеток *in vitro*. Культуры нейральных клеток от доноров с СД можно использовать в качестве основы для создания тест-систем скрининга лекарственных препаратов против БА, поскольку ИПСК обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и позволяют масштабировать данную модель до размеров, необходимых для проведения объемных фармацевтических исследований.

Тезисы постерных докладов

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЖИМОВ СИНЕРГИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАНА И ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК, ЭРАДИЦИРУЮЩИХ ПЕРВИЧНЫЙ АСЦИТ КРЕБС-2

Алямкина Е.А.^{1,*}, Долгова Е.В.¹, Минкевич А.М.², Николин В.П.¹, Попова Н.А.^{1,2}, Ефремов Я.Р.^{1,2}, Байборodin С.И.^{1,2}, Проскурина А.С.¹, Таранов О.С.³, Омигов В.В.³, Шурдов М.А.⁴, Останин А.А.⁵, Черных Е.Р.⁵, Богачев С.С.¹

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск; ³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область; ⁴ООО «Панаген», Горно-Алтайск; ⁵ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: alamkina@gmail.com

Установлено, что, используя комбинации нативной и модифицированной двуцепочечной ДНК из разных источников в синергизме с цитостатиком циклофосфаном, можно частично или полностью разрушить опухолевый потенциал асцита мышью опухоли Кребс-2. Разрушение опухолевого потенциала асцита Кребс-2 связано с элиминацией или изменением ракового статуса стволовых иницирующих клеток опухоли. Найдены режимы сочетания циклофосфана, препаратов двуцепочечной ДНК и антибиотика, позволяющие полностью эрадикаровать первичный асцит у мышьясцитомы. Полученные результаты предполагают, что развитие вторичных опухолей (как солидной, так и асцита) у экспериментальных мышьясцитомы связано с контаминацией тканей животных жизнеспособными опухоль-образующими раковыми клетками, происходящей при многократных режимных интраперитонеальных инъекциях. Предполагается, что гибель животных не несущих или несущих слабо развитый асцит, наблюдаемая в экспериментах, связана с несколькими патологическими процессами, индуцированными обработками и прямо не зависит от развития вторичной опухоли.

ВЛИЯНИЕ ЛЕГИРОВАНИЯ КРЕМНИЕМ ПРИПОВЕРХНОСТНЫХ СЛОЕВ НА ЦИТОСОВМЕСТИМОСТЬ НИКЕЛИДА ТИТАНА

Артемяева Л.В.¹, Матвеев А.Л.¹, Псахье С.Г.², Лотков А.И.², Мейснер Л.Л.², Матвеева В.А.^{1,*}

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²ФГБУН Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

*e-mail: vam@niboch.nsc.ru

Сплавы на основе никелида титана имеют низкую цито- и генотоксичность, но вымывание и накопление ионов никеля в организме рассматривается как потенциальный риск токсичности для клеток и основание для аллергии, поэтому повышение биосовместимости этих материалов необходимо для их использования в медицине. Биосовместимость зависит от токсичности используемого материала и условий, обеспечивающих адгезию клеток к биоматериалу и дальнейшие процессы пролиферации и дифференцировки клеток.

Цитосовместимость никелида титана ($Ti_{49,3}Ni_{50,7}$) с приповерхностными слоями, легированными ионами кремния, изучали на культивируемых *in vitro* мезенхимальных стволовых клетках (МСК) костного мозга крысы. Цитотоксическое действие компонентов, вымытых из сплава TiNi, на культивируемые МСК определяли в режиме реального времени, используя клеточный анализатор RTCA iCELLigence. Пролиферативную активность клеток, культивируемых в присутствии или на поверхностях образцов TiNi, оценивали по количеству жизнеспособных клеток. Жизнеспособность клеток определяли по интенсивности митохондриального дыхания клеток в тесте МТТ с использованием [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] соли тетразолия.

Показано, что ионно-плазменная модификация приповерхностных слоев сплава TiNi кремнием улучшает его цитосовместимость. Растворимые в водной среде компоненты сплава TiNi, модифицированного ионами кремния, не оказывают цитотоксического действия на МСК костного мозга крысы. Пролиферация МСК костного мозга крысы, культивируемых с образцами TiNi, модифицированными ионами кремния, эффективнее пролиферативной активности МСК, культивируемых с образцами сплава TiNi без ионно-модифицированного поверхностного слоя. Эффективность пролиферации МСК на поверхности сплава, модифицированного кремнием, составляла 168,41% от эффективности пролиферации МСК на немодифицированной поверхности. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России ГК № 16.522.12.2019 и Программой фундаментальных исследований РАН, проект № 111.23.2.1.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СЛОЯ ЭНДОМЕТРИЯ

Артемяева Л.В.¹, Овсянникова Т.В.¹, Морозов В.В.¹, Чекалина М.В.¹, Попова Ж.Ю.¹, Ефремов Я.Р.², Матвеева В.А.^{1,*}

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
*e-mail: vam@niboch.nsc.ru

В последние годы отмечается интенсивное развитие новых методов лечения заболеваний, основанных на трансплантации стволовых клеток. Однако эти методы не всегда эффективны из-за кратковременности достигнутого эффекта. Это, возможно, связано с тем, что до сих пор не решен вопрос об оптимальном виде клеточного материала, используемого для введения, что требует поиска новых источников стволовых клеток для терапии. Высокая пролиферативная активность и доступность позволяют рассматривать ткань эндометрия как источник стволовых клеток. Недостаток количества клеточного материала для терапии, выделенного из ткани эндометрия, можно восполнить наращиванием клеток *in vitro* перед введением пациенту.

Из диагностических образцов аспирационной биопсии методом ферментативной диссоциации выделены мононуклеарные клетки функционального слоя эндометрия человека. Во время культивирования клетки были жизнеспособны и активно пролиферировали. Для получения терапевтической дозы клетки пассировали 2 раза в течение 14-18 дней в зависимости от количества выделенных клеток. По результатам метода проточной цитометрии клетки второго пассажа имели фибробластоподобную морфологию и фенотип HLA-DR-, CD14-, CD3-, CD34-, CD38-, CD45-, CD71+, CD73+, CD90+, CD105+, свойственные мезенхимальным стволовым клеткам. Однако клетки оставались гетерогенной популяцией согласно результатам флуоресцентной микроскопии. Часть клеток на своей поверхности несли антигены CD34, KDR или антигены, содержащие остатки фукозы; метаболизировали липопротеины низкой плотности; в составе цитоскелета экспрессировали а-актин гладких мышц и /или цитokerатин 19.

Таким образом, из диагностических аспирационных биоптатов получены культуры клеток функционального слоя нормального эндометрия человека, которые *in vitro* имеют высокий пролиферативный потенциал и содержат стволовые клетки, которые, согласно результатам проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии, предположительно относятся к предшественникам эндотелиальных клеток, супраадвентициальным клеткам, прекурсорам эпителиальных клеток функционального слоя эндометрия.

ОЦЕНКА СТРУКТУРНО-ПРОЧНОСТНЫХ СВОЙСТВ 3D КОНСТРУКЦИЙ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА ПОСЛЕ ПРОЦЕССА ИХ ДЕЦЕЛЛЮРИЗАЦИИ РАСТВОРАМИ ДЕТЕРГЕНТОВ SDS И ТРИТОН X100

Ахмедов Ш.Д.¹, Луговский В.А.^{1,*}, Роговская Ю.В.¹, Ребенкова М.², Афанасьев С.А.¹

¹ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН; ²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

*e-mail: vladimirlugovskij@yandex.ru

Цель: изучить морфологические и прочностные изменения сосудов человека и экспериментального животного, подвергшихся децеллюризации растворами детергентов SDS и тритона X100.

Материалы и методы: исследование выполнено на фрагментах дистальных отделов внутренней грудной артерии человека (ВГА), остающихся после выполнения плановых операций маммарокоронарного шунтирования (n=7) и на фрагментах брюшной аорты крыс линии «Вистар» (n=7). Децеллюляризацию кровеносных сосудов осуществляли с помощью растворов детергентов SDS и тритона X100. Степень децеллюризации и сохранения экстрацеллюлярного матрикса оценивали морфологически, используя световую микроскопию (каждые 30 мин отрезали по сегменту, с последующей фиксацией в 10% формалине). Интактные, а затем децеллюризованные сосуды разрезались на сегменты шириной 2 мм, после рассечения которых получались полоски длиной 8 мм. Подготовленные образцы закреплялись вертикально в зажимы аппарата «Instron 3343». Фиксировались усилие разрыва и удлинение образцов.

Результаты: после обработки ВГА и брюшной аорты крысы детергентами в разные временные промежутки происходит уменьшение их клеточного состава. Отмечается появление фрагментаций и микроразрывы в эластических волокнах. Коллагеновые волокна сохраняют свою структуру, но наблюдаются уменьшение плотности расположения соединительнотканых волокон. По данным иммуногистохимического исследования — происходит вымывание коллагеновых волокон на 20% по сравнению с их количеством в интактном сосуде. Интактные образцы ВГА начинают разрушаться при усилии в среднем 0,304Н (удлинение 2,9 мм), а фрагменты брюшной аорты при усилии 0,742Н (удлинение 5,4 мм). Полные разрывы происходят при усилии в среднем 0,496Н (удлинении 4,13 мм) и 0,829Н (удлинении 5,49 мм) соответственно. Децеллюризованные образцы ВГА начинают разрушаться при усилии в 0,14Н (удлинение 2,5 мм), а фрагменты брюшной аорты при усилии 0,499Н (удлинение 4,9 мм). Полные разрывы происходят при усилии в среднем 0,295Н (удлинении 3,9 мм) и 0,506Н (удлинении 5 мм) соответственно. Изменения в структуре ВГА и аорте крысы, происходящие в результате децеллюризации, привели к снижению прочности сосуда на 54% и 33% соответственно.

Выводы: прочность децеллюризованных сосудов зависит от исходной структуры экстрацеллюлярного матрикса и его сохранения в процессе

децеллюризации. Сосуды эластического типа (аорта) после децеллюризации обладают большей прочностью, чем сосуды мышечного типа (ВГА), что важно учитывать при дальнейшем выборе сосуда для изготовления сосудистых графтов малого диаметра.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ КУЛЬТУР РАННИХ И ПОЗДНИХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ОТ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Бондаренко Н.А.^{1,2,*}, Лыков А.П.^{1,2}, Ким И.И.^{1,2}, Повещенко О.В.^{1,2}, Повещенко А.Ф.^{1,2}, Покушалов Е.А.², Романов А.Б.², Коненков В.И.^{1,2}

¹ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН;
²ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

*e-mail: bond802888@yandex.ru

Эндоthелиальные прогениторные клетки (ЭПК) зарекомендовали себя как активные участники стимуляции ангиогенеза и васкулогенеза. Известно, что два вида ЭПК, ранние и поздние, различаются как морфологически, так и функционально и вносят различный вклад в развитие сосудистой сети. Целью исследования стало изучение цитокинпродуцирующей активности ранних и поздних ЭПК от пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). Культура ЭПК была получена из мононуклеарных клеток (МНК), мобилизованных введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, от пациентов с ХСН. МНК культивировали в эндоthелиальной среде EGM-2 с 10% FCS, гентамицин сульфата, L-глутамина в культуральных флаконах, предварительно обработанных фибронектином и желатином. Уровень продукции цитокинов и ростовых факторов в кондиционных средах от ЭПК определялся с помощью иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Ранние ЭПК, культивировавшиеся на фибронектине, к 8 суткам продуцируют широкий спектр цитокинов и ростовых факторов, таких как TNF- α (10 пг/мл), IL-10, (668,7 пг/мл), IL-18 (612 пг/мл), IL-8 (4442 пг/мл), EPO (132,5 мМЕ), G-CSF (10 пг/мл), VEGF (536,7 пг/мл). К 16 суткам с появлением в культуре поздних ЭПК отмечено статистически значимое снижение продукции IL-10, IL-18, IL-8, EPO, VEGF, а продукция TNF- α и G-CSF остается на том же уровне. В культуре ранних ЭПК, культивировавшихся на желатине, к 8 суткам продукция цитокинов и ростовых факторов TNF- α (297 пг/мл) и EPO (900 мМЕ) оказалась выше по сравнению с культурой ЭПК, культивировавшихся на фибронектине. Однако продукция IL-10, IL-18, IL-8, G-CSF, VEGF была снижена по сравнению с культурой ЭПК на фибронектине. У поздних ЭПК на желатине снижается продукция TNF- α , IL-8, EPO, но на прежнем уровне сохраняется продукция G-CSF и статистически значимо увеличивается продукция IL-10, IL-18 и VEGF, по сравнению с культурой ранних ЭПК на 8 сутки. Таким образом, спектр продукции биологически активных веществ, в том числе цитокинов и ростовых факторов, зависит от сроков и условий культивирования ЭПК.

ПРИМЕНЕНИЕ АУТОГЕННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ. ОТДАЛЕННЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Борисов А.Г.^{1,*}, Савченко А.А.¹, Мальчевский Ю.Е.¹, Козлов В.А.², Черных Е.Р.², Смирнова С.В.¹, Останин А.А.²

¹НИИ медицинских проблем Севера РАН, Красноярск; ²ФГБУ НИИ клинической иммунологии РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: 2410454@mail.ru

В настоящее время все большее внимание уделяется применению аутогенных стволовых клеток, полученных из жировой ткани. Целью исследования явилась оценка отдаленных последствий применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (АСК), полученных из жировой ткани.

АСК были выделены стандартно с помощью обработки жировой ткани коллагеназой. Трансплантация АСК проведена шести добровольцам мужского пола в возрасте от 44 до 65 лет путем внутривенной инфузии после получения от них информированного согласия. Общеклинические, иммунологические анализы и инструментальные исследования проведены до введения АСК, а также через 10 сут., 1, 6 и 12 мес. после внутривенной трансплантации. В дальнейшем такие исследования проводились один раз в 6 мес. в течение 5 лет. Трансплантация АСК не сопровождалась развитием каких-либо побочных реакций. В динамике обследования ухудшения состояния здоровья не выявлено. Через месяц после введения АСК у всех обследуемых наблюдалось увеличение активности аланинаминотрансферазы и содержания сиаловых кислот с последующим снижением значений до исходных показателей через полгода. Со стороны иммунной системы наиболее выраженные изменения исследуемых показателей обнаружены через 1 мес. после введения АСК в виде снижения содержания лимфоцитов и CD4-клеток. Также происходило увеличение числа CD8-лимфоцитов с последующим восстановлением их количества до исходного уровня через 6 мес. При инструментальных исследованиях у всех обследуемых к 6 мес. уменьшилась масса миокарда, увеличилась скорость кровотока нижних конечностей, особенно в мелких сосудах, с сохранением результатов до пяти лет.

Таким образом, после внутривенного введения АСК выявляется динамическая перестройка иммунной системы в течении 1 мес. с последующей нормализацией показателей к 6 мес., а также изменение величин ряда общеклинических показателей, характеризующих состояние сердечно-сосудистой системы (уменьшение массы миокарда и усиление скорости кровотока). У всех исследуемых не выявлено развития «новых» заболеваний и ухудшения динамики имеющихся хронических болезней. Все это свидетельствует о безопасности применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани, и возможности их применения для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ НМДА-РЕЦЕПТОРОВ АМИДОМ ЛАМБЕРТИАНОВОЙ КИСЛОТЫ

Вечкапова С.О.^{1,3,*}, Морозова Е.А.², Проскура А.Л.¹, Шульца Э.Э.², Толстикова Т.Г.², Запара Т.А.¹, Ратушняк А.С.¹

¹УРАН Конструкторско-технологический институт вычислительной техники СО РАН; ²ФГБУН Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН; ³ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
*e-mail: svetavech@yandex.ru

При многих заболеваниях центральной нервной системы наблюдается сдвиг баланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторных систем. Такие нейродегенеративные заболевания, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, рассеянный склероз, эпилепсия, ишемические поражения мозга, хотя и вызваны различными механизмами, но могут совместно использовать общий путь — гиперактивацию ионотропных глутаматных рецепторов, особенно Ca^{2+} -проводящих НМДА-подтипа. В настоящее время активно разрабатываются препараты для лечения когнитивных расстройств и нейродегенеративных процессов. Часто источником подобных препаратов являются растительные метаболиты и их производные. Ламбертиановая кислота — растительный метаболит, выделяемый из хвои сибирского кедра. Исследование проводилось на срезах гиппокампа мышей линии ICR с помощью стандартной методики. Стимуляция коллатералей Шаффера и регистрация вызванных популяционных спайков пирамидных нейронов поля СА1 производились с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных соевым раствором. Для гиперактивации глутаматергической системы, проявляющейся в виде эпилептиформной активности пирамидных нейронов, использовался модифицированный физиологический раствор без ионов Mg^{2+} (селективного блокатора НМДА-рецепторов). Показано, что амид ламбертиановой кислоты (Т-90) существенно уменьшает гиперактивацию ионотропных глутаматных рецепторов и предотвращает развитие нарушений активности пирамидных нейронов, вызванное снижением уровня ионов Mg^{2+} . Обработка срезов Т-90 в нормальном физиологическом растворе не препятствует развитию НМДА-зависимой синаптической потенциации. Вероятно, Т-90 действует как низкоаффинный канальный блокатор НМДА-рецепторов, занимая сайт связывания Mg^{2+} , тем самым предотвращая излишний приток Ca^{2+} в нейрон, но позволяя при этом развиваться НМДА-зависимой долговременной потенциации. Возможно, ламбертиановая кислота и её производные могут стать источником доступных препаратов с глутаматергическим механизмом действия, которые можно будет применять для лечения когнитивных расстройств и нейродегенеративных заболеваний. Работа выполнена при поддержке базового проекта фундаментальных исследований РАН 35.1.5 и программы президиума РАН ФНМ-46 «Фундаментальные науки медицине».

СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ СИНДРОМА УДЛИНЕННОГО ИНТЕРВАЛА QT ПРИ ПОМОЩИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Вялкова А.В.^{1,2,3,*}, Григорьева Е.В.^{1,2,3}, Дементьева Е.В.^{1,2,3}, Медведев С.П.^{1,2,3}, Шевченко А.И.^{1,2,3}, Елисафенко Е.А.^{1,2,3}, Байрамова С.А.², Покушалов Е.А.², Закиян С.М.^{1,2,3}

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России; ³ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: anna.vyalkova@gmail.com

Одной из наиболее частых причин развития тяжёлых нарушений ритма сердца является **синдром удлинённого интервала QT (LQTS)**. Как врождённые, так и приобретённые его формы характеризуются увеличением продолжительности интервала QT на ЭКГ и связаны с повышенным риском возникновения полиморфной желудочковой тахикардии типа «пируэт», что вызывает развитие синкопе, фибрилляции желудочков и даже внезапную смерть больного. Несмотря на достигнутый прогресс в понимании механизмов LQTS, не существует высокоэффективных методов лечения данного заболевания, что во многом объясняется отсутствием адекватных модельных систем. На сегодняшний день наиболее перспективным подходом к моделированию LQTS является использование пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). При помощи их направленной дифференцировки в кардиомиоциты можно воспроизвести фенотип различных наследственных форм LQTS *in vitro*, что поможет понять механизм аритмогенеза и существенно повлиять на выбор лечебной тактики.

В данной работе был осуществлен поиск мутаций, вызывающих LQTS, у пациентов с соответствующим диагнозом. У двух пациентов были выявлены мутации Val254Met в 5 экзоне гена *KCNQ1* и Asp85Asn в 4 экзоне гена *KCNE1*, которые отвечают за развитие LQTS 1 и 5 типов соответственно. От этих пациентов были получены первичные культуры фибробластов. В результате трансдукции фибробластов пациентов при помощи лентивирусов, несущих кДНК генов плюрипотентности, были получены пациент-специфичные ИПСК. Клетки демонстрировали экспрессию щелочной фосфатазы, транскрипционных факторов, связанных с поддержанием плюрипотентного состояния, поверхностных антигенов SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. При дифференцировке полученные клетки давали производные всех трех зародышевых листков. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные клетки действительно являются плюрипотентными. В данный момент проводится их направленная дифференцировка в кардиомиоциты для моделирования LQTS и более глубокого понимания механизмов, лежащих в основе патогенеза аритмии.

КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Глазунова С.А.*, Новожилова Н.М., Пазилин А.С.

Life Technologies (part of Thermo Fisher Scientific) совместно с Parkinson's Institute, Sunnyvale, California

*e-mail: svetlana.glazunova@thermofisher.com

Болезнь Паркинсона (БП) — это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, поражающее более 5 миллионов людей по всему миру. БП возникает в результате потери дофаминэргических нейронов в черной субстанции. Потеря этих нейронов, в первую очередь, отрицательно влияет на двигательную функцию, а затем и на сознание, что на поздних стадиях заболевания часто сопровождается слабоумием. Основной проблемой в исследовании БП является отсутствие физиологически значимых клеточных моделей заболевания. Такие модели крайне необходимы для изучения механизмов заболевания, поиска лекарственных мишеней и скрининга.

В данной работе мы описываем первый этап в создании модельных систем — получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). Современные методы клеточного и генетического анализа позволили получить iPSC и подтвердить успешное репрограммирование. Мы успешно получили iPSC из дермальных фибробластов трех доноров с болезнью Паркинсона, одного донора с MCA и двух доноров из группы контроля (соответствующих по возрасту) с помощью набора для репрограммирования CytoTune®-iPS Sendai. Эффективность репрограммирования варьировала в диапазоне от 0,01% до 0,3%. Плюрипотентность iPSC подтверждали с помощью морфологического и цитогенетического анализа, иммунного окрашивания, FACS-анализа и профилирования экспрессии генов. Клетки формировали эмбрионидные тельца с тремя зародышевыми слоями, что подтверждало их способность к дифференциации. Используемые в этом исследовании фибробласты также протестировали на наличие других генетических мутаций, связанных с БП, и ни одна из них не была обнаружена. Очистку от частиц вируса Sendai детектировали в некоторых линиях уже на 10 пассаже. Было подтверждено, что полученные iPSC происходили из соответствующих родительских фибробластов. Учитывая эффективность, быстроту и легкость, с которой мы репрограммировали фибробласты взрослых больных, можно констатировать, что набор для репрограммирования CytoTune®-iPS Sendai представляет собой значительный шаг вперед в направлении автоматизированного и масштабного репрограммирования.

Получение полностью охарактеризованных линий iPSC из образцов с известным клиническим анамнезом предоставляет новую платформу для дальнейших исследований заболевания, разработки систем поиска лекарственных препаратов, клеточной терапии и оценки факторов окружающей среды, влияющих на развитие БП.

МЕТОД СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ПЛАСТОВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА

Дергилев К.В.*, Цоколаева З.И., Макаревич П.И., Парфенова Е.В.

ФГБУ Российский кардиологический научно–производственный комплекс Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: doctorkote@gmail.com

Реконструкция левого желудочка и восполнение необратимо утраченных клеток миокарда является одной из наиболее сложных задач восстановительной хирургии. В последние годы для этих целей используются тканеинженерные конструкции в виде клеточных накладок, созданные на основе разных типов стволовых клеток (костного мозга, скелетных миобластов, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и др). Особое внимание привлекают резидентные стволовые клетки сердца, которые обладают паракринной активностью и способны образовывать новые кардиомиоциты и клетки сосудов *in vitro* и *in vivo*.

Цель исследования — разработать методику получения клеточных накладок на основе стволовых клеток сердца.

В работе использованы 2 типа стволовых клеток сердца крысы: c-kit⁺ и клетки кардиосфер. Для получения клеточных накладок c-kit⁺ или клетки кардиосфер культивировали на чашках, покрытых фибронектином или термочувствительным синтетическим полимером (poly-N-isopropylacrylamide). Открепление клеточной наклейки от поверхности культуральной чашки проводили путем кратковременной обработки раствором фермента или понижением температуры культуральной чашки ниже 37С. Данный метод позволяет создавать многослойные клеточные структуры и проводить комбинацию клеточных накладок из различных типов клеток.

Анализ полученных клеточных конструкций с помощью гистологического и иммунофлуоресцентного окрашивания срезов показал, что они представляют собой комбинацию белков внеклеточного матрикса и клеток, взаимодействующих между собой при помощи коннексин–43 содержащих щелевых контактов. Культивирование клеток в составе накладок не вызывало их гибели и сохраняло их способность к пролиферации. Культивирование c-kit⁺ клеток в составе клеточных накладок вызывало повышение экспрессии транскрипционного фактора Gata4, что указывает на индукцию кардиомиогенной дифференцировки при культивировании клеток в составе 3D культуры (клеточной наклейки). Трансплантация клеточных накладок после экспериментального инфаркта миокарда на поверхность сердца вызывало их интеграцию в поврежденный миокард.

Разработанная методика получения и трансплантации клеточных накладок на основе стволовых клеток сердца может быть альтернативой традиционным методам доставки стволовых клеток в миокард.

ФЕНОМЕН «ОТСРОЧЕННОЙ СМЕРТИ»: ХАРАКТЕРИСТИКА СИНЕРГИЧНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАНА И ЭКЗОГЕННОЙ ДНК

Долгова Е.В.^{1,*}, Проскурина А.С.¹, Николин В.П.¹, Попова Н.А.^{1,2}, Алямкина Е.А.¹, Ефремов Я.Р.^{1,2}, Таранов О.С.³, Омигов В.В.³, Загребельный С.Н.², Шурдов М.А.⁴, Останин А.А.⁵, Черных Е.Р.⁵, Богачев С.С.¹

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск; ³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область; ⁴ООО «Панаген», Горно-Алтайск; ⁵ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: zhenk123@mail.ru

Инъекции экзогенной ДНК на фоне предобработки цитостатиком циклофосфаном приводят к болезни и гибели мышей. Установлено, что фрагменты экзогенной ДНК после интраперитонеальных инъекций достигают клеток костного мозга. Клетки костного мозга также захватывают фрагменты экзогенной ДНК в условиях *ex vivo*. Промежуток времени 18-24 ч. представляет собой конечную фазу репарации двуцепочечных разрывов, индуцируемых циклофосфаном, в клетках костного мозга. Инъекции экзогенной ДНК в этот промежуток времени приводят к патологическим изменениям в клетках костного мозга и в различных органах-мишенях. Индуцируется апоптоз клеток костного мозга на фоне всего периода времени введения препарата ДНК. Отмечается исчезновение у заболевших животных субпопуляции костномозговых клеток размером 12-20 нм, включающей предшественников лимфопоэза, при общей нормализации количества CD34+ стволовых кроветворных клеток. Патоморфологический анализ предполагает, что причиной гибели животных является полиорганная недостаточность, вызванная акцидентальной инволюцией лимфоидных органов на фоне системного воспалительного процесса, связанная с масштабными инъекциями экзогенной ДНК и разрушением лимфоидного ростка кроветворения.

УЧАСТИЕ mTORc1 КОМПЛЕКСА В РЕГУЛЯЦИИ БАЛАНСА ГЛЮКОЗЫ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Жылкибаев А.А.^{1,*}, Сарбасов Д.Д.², Берсимбаев Р.И.¹

¹Институт клеточной биологии и биотехнологии Евразийского национального университета имени Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан; ²Онкологический центр имени М.Д. Андерсона Техасского университета, Хьюстон, США

*e-mail: askokshe@mail.ru

В настоящее время широко рассматриваются вопросы взаимодействия вторичных мессенджеров в регуляции молекулярных процессов в опухолевых клетках. Данные исследования помогают понять клеточные механизмы развития онкозаболеваний и разработать подходы к получению более эффективных ингибиторов роста опухоли. Высококонсервативная протеинкиназа mTOR (*mTOR-mammalian target of rapamycin*) рассматривается как основной киназный комплекс, который играет важную роль при развитии онкозаболеваний. Известны два комплекса mTOR (mTORc1 и mTORc2), которые различаются по белковому составу и чувствительности к аллостерическому ингибитору mTOR — рапамицину. Ранее было показано, что mTOR-сигнальный путь контролируется присутствием аминокислот, а также чувствителен к содержанию глюкозы в клетках. Активация катаболических реакций в клетках индуцирует метаболический стресс, что приводит к ингибированию активности mTORc1 комплекса. Цель исследования — изучение участия mTORc1 комплекса в регулировании баланса глюкозы в опухолевых клетках человека. Изучена mTOR-зависимая регуляция энергетического статуса опухолевых клеток при их глюкозном голодании. Низкая концентрация глюкозы в питательной среде (0,25 мМ и 0,5 мМ) приводит к гибели клеток. Однако при добавлении рапамицина (0,1 мМ) и АТФ-конкурирующих ингибиторов mTORc1 комплекса — pp242 (0,5 мМ) и Торин-1 (0,1 мМ) — в питательную среду клетки выживали. Низкий уровень глюкозы в клетках вызывал острую нехватку АТФ, что являлось критичным для жизнеспособности клеток. В случае оптимальной концентрации глюкозы (5 мМ) в питательной среде клетки показывали устойчивый рост. Как известно, mTOR комплекс 1 контролирует субстрат-специфичную генерацию энергии с помощью цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования. При ингибировании mTORc1 происходит независимый от гликолиза переход в цикл трикарбоновых кислот, что является эффективной стратегией выживания клеток от смерти при недостатке глюкозы. Полученные результаты свидетельствуют, что регуляция метаболизма глюкозы с помощью mTORc1 играет решающую физиологическую роль в условиях быстрого ответа клетки на энергетический дисбаланс. Установлено, что клетки используют эффективный путь метаболизма для удовлетворения потребности в энергии, необходимой для роста и размножения. Показано участие серин-треониновой киназы mTOR в регуляции баланса глюкозы в опухолевых клетках.

ЭФФЕКТ КОНДИЦИОННЫХ СРЕД ОТ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ И МИГРАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ В ТЕСТЕ «РАНЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ»

Лыков А.П.^{1,2,*}, Никонорова Ю.В.^{1,2}, Бондаренко Н.А.^{1,2}, Повещенко О.В.^{1,2}, Повещенко А.Ф.^{1,2}, Коненков В.И.^{1,2}

¹ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН;
²ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

*e-mail: aplykov2@mail.ru

Резидентные стволовые клетки принимают активное участие в процессах репарации/регенерации в области повреждения органов и тканей (Yeum, 2013). Функциональная активность стволовых клеток зависит от паракринного эффекта продуцируемых мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками цитокинов и ростовых факторов (Noch, 2012). Целью исследования стало проведение сравнительного анализа влияния биологически активных веществ, содержащихся в кондиционной среде от стволовых клеток различного генеза на процесс заживления «раневой поверхности». В работе использованы крысиные костномозговые мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (КМ-ММСК), человеческие фибробласты, стволовые клетки роговицы свиньи на 6-10 пассажах. Пролиферацию и горизонтальную миграцию исследовали в 24 луночных плоскодонных планшетах (TPP, Швейцария). Предварительно клетки вносили в лунки планшетов для прикрепления и образования монослоя, далее в центре лунок наносили кончиком наконечника на 200 мкл рану, слущенные клетки удалялись, в контроле — вносили культуральную среду с минимальным содержанием сыворотки (1%), в опыте: к КМ-ММСК вносили 30% кондиционной среды (КС) от фибробластов и от клеток EA.Hy926, к фибробластам и стволовым клетками роговицы — 30% КС от КМ-ММСК и от клеток EA.Hy926. Под инвертированным микроскопом исследовали динамику изменения ширины «раневой поверхности» на 0 ч. и через 30 ч. В кондиционных средах от КМ-ММСК и клеток EA.Hy926 методом ИФА оценивали уровни биологически активных. Показано, что процент закрытия «раневой поверхности» КМ-ММСК в присутствии 30% КС от фибробластов составил 43%, в присутствии 30% КС от клеток EA.Hy926 — 18%, а в контроле — 14%. Для фибробластов показано, что скорость закрытия «раневой поверхности» в присутствии 30% КС от КМ-ММСК и 30% КС от клеток EA.Hy926 составила 12% и 13% соответственно, а в контроле — 10%. Скорость закрытия «раневой поверхности» стволовыми клетками роговицы в присутствии 30% КС от КМ-ММСК и 30% от клеток EA.Hy926 составила 23% и 10% соответственно, а в контроле 6%. Показано, что в КС от КМ-ММСК от клеток EA.Hy926 в достаточном количестве содержится IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α , G-CSF, VEGF, EPO, NO. Таким образом, в механизме активации процессов репарации/регенерации «раневой поверхности» важная роль отводится паракринному эффекту цитокинов и ростовых факторов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА БАЗЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРОВОТОКА

Макаревич П.И. *, Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Парфенова Е.В.

Лаборатория Ангиогенеза ИЭК РКНПК, Москва, Россия

*e-mail: pavel.makarevich@gmail.com

Цель исследования: разработка нового метода доставки модифицированных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ), трансплантируемых в виде клеточных конструкторов.

Материалы и методы: в работе использована мышинная модель ишемии задней конечности (самцы линии C57/B6) с трансплантацией МСК ЖТ, модифицированных с помощью бакуловируса с геном *VEGF165* с целью повышения их терапевтического потенциала. Снятие клеточных конструкций проводилось методом кратковременной (10-12 сек.) трипсинизации, после чего трансплантат переносился внутрь операционной раны и размещался на поверхности мышц в зоне проекции иссеченной бедренной артерии. Оценка кровотока проводилась методом лазерной доплерометрии под изофлюрановым наркозом.

Результаты: при оценке эффективности клеточной терапии с помощью МСК ЖТ нами было отмечено, что к 7-ым суткам восстановление кровотока после инъекции клеток в виду суспензии (1,5 млн. МСК ЖТ) было сопоставимо с новым способом трансплантации — в виде клеточных накладок. Оба способа позволяли эффективно стимулировать восстановление перфузии ишемизированной конечности до 33-35% по сравнению со здоровой, что было значимо выше, чем в группе отрицательного контроля (МСК ЖТ, трансдуцированных геном *GFP*), где аналогичный показатель составил около 25%. Кроме того, нами было показано сохранение пересаженных клеточных накладок и отсутствие признаков их отторжения или инкапсуляции.

Выводы: применение тканеинженерных конструкций из модифицированных МСКЖТ обладает эффективностью, сопоставимой с традиционным методом введения (инъекцией).

Отработанный нами метод позволяет стимулировать ангиогенные процессы в ткани, значимо увеличивая ее перфузию уже через 7 суток после трансплантации, уменьшая вызываемое ишемией повреждение мышцы, что позволяет предлагать его для дальнейшей разработки с целью использования в регенеративной медицине.

СИНЕРГИЧНЫЙ ТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЦИКЛОФОСФАНА И ПРЕПАРАТА ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК НА РАЗВИТЫЙ ОПУХОЛЕВЫЙ ТРАНСПЛАНТАТ

Минкевич А.М.^{1,*}, Алямкина Е.А.², Николин В.П.², Попова Н.А.^{1,2}, Козел А.В.¹, Долгова Е.В.², Ефремов Я.Р.^{1,2}, Байбородин С.И.^{1,2}, Андрушкевич О.М.¹, Таранов О.С.³, Омигов В.В.³, Рогачев В.А.², Проскурина А.С.², Шурдов М.А.⁴, Останин А.А.⁵, Черных Е.Р.⁵, Богачев С.С.¹

¹Новосибирский государственный университет; ²ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; ³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область; ⁴ООО «Панаген», Горно-Алтайск; ⁵ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: aaalex13@yandex.ru

В работе исследовано воздействие препаратов циклофосфана и фрагментированной двуцепочечной ДНК на клетки опухоли мышцы Кребс-2, растущей в солидной и асцитной формах, а также на клетки культуры клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Установлено прямое цитотоксическое воздействие на солидный трансплантат опухоли Кребс-2 синергичного действия циклофосфана и инъекций двуцепочечной ДНК. Действие циклофосфана и двуцепочечной ДНК (как в монорежиме, так и совместно) приводит к быстрой эрозии кишечного эпителия таким образом, что многократно уменьшает время и синхронизирует процесс бактериального обсеменения асцитной жидкости, являющегося одной из причин скоротечной гибели животных. Одновременно и препарат двуцепочечной ДНК, и циклофосфан, и оба препарата вместе индуцируют апоптоз асцитных раковых клеток, достигающий 80% для препарата двуцепочечной ДНК и 50% для циклофосфана, перерастающий во вторичный некроз. Оба процесса приводят к стремительно развивающимся системной воспалительной реакции, сепсису и полиорганной недостаточности, сопровождающейся практически одновременной гибелью мышей. Обработка препаратом двуцепочечной ДНК индуцирует апоптоз асцитных раковых клеток таким образом, что его конечная фаза, нуклеосомная фрагментация, определяется к 24 ч. после начала обработки. Эффект индукции масштабного апоптоза, достигающего 45%, характерен и для культуры клеток MCF-7. Предполагается, что масштабный апоптоз раковых клеток индуцируется по механизму, подобному «эффекту свидетеля».

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИСПРАВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МУТАЦИИ В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ КРЫС ЛИНИИ BRATTLEBORO

Немудрый А.А.^{1,2,3,*}, Маланханова Т.Б.^{3,4}, Стекленева А.Е.^{1,2,3}, Васькова Е.А.^{1,2,3}, Медведев С.П.^{1,2,3,4}, Закиян С.М.^{1,2,3,4}

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ³ФГБУН ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России; ⁴Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: nemudryy@bionet.nsc.ru

За последние несколько лет были разработаны доступные и эффективные методики редактирования сложных геномов млекопитающих – TALEN и CRISPR/Cas9. Данные системы позволяют специфично вносить двунитевые разрывы в выбранные исследователем сайты генома, что может быть использовано для увеличения частоты гомологичной рекомбинации, при которой происходит обмен участками между гомологичными участками ДНК. Системы TALEN и CRISPR/Cas9 обладают перспективами применения в медицине человека. С помощью гомологичной рекомбинации возможно заменить мутантный аллель, вызывающий наследственное заболевание, на «здоровый» в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека (ИПСК). ИПСК с «исправленным» генотипом могут быть использованы для заместительной клеточной терапии наследственных заболеваний.

Существует потребность в создании модельных систем с использованием лабораторных животных, которые позволили бы проводить доклинические испытания. В данной работе использованы крысы линии Brattleboro, являющиеся носителями мутации, вызывающей гипоталамический несахарный диабет. Получена система для проведения исследований по исправлению генетических мутаций, которая состоит из 1) модельной линии крыс Brattleboro, 2) плюрипотентных стволовых клеток крыс данной линии 3) генетических конструкций (TALEN и CRISPR/Cas9, донорные конструкции для гомологичной рекомбинации), необходимых для исправления вызывающей заболевание мутации. Данная система позволяет ответить на ряд вопросов, связанных с методами исправления генетических мутаций в ИПСК, возможными нецелевыми эффектами, и таким образом оценить безопасность использования TALEN и CRISPR/Cas9 для клинического применения; определить судьбу введенных в организм клеток, возможность коррекции мутантного фенотипа. Вдобавок, данная система моделирует заболевания, вызванные нарушением в конкретных типах нейронов, что позволяет говорить о разработке методик для коррекции нейродегенеративных заболеваний.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА НА МИГРАЦИОННУЮ И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРА ЧЕЛОВЕКА

Никонорова Ю.В.*, Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Повещенко О.В., Коненков В.И.

ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: jvnik@mail.ru

Одним из перспективных методов лечения ишемических нарушений в настоящее время является совместное применение мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) и эритропоэтина. В ряде исследований показана более высокая эффективность применения комбинированных препаратов или предобработанных эритропоэтином ММСК по сравнению с введением пациентам только клеток без предварительной обработки. Механизмы, обуславливающие лучший терапевтический эффект в подобных случаях, остаются мало изученными. Целью нашего исследования стала оценка роли и степени воздействия эритропоэтина на важные функциональные характеристики ММСК, такие как пролиферация и миграционная активность.

Оценку миграционной и пролиферативной активностей клеток осуществляли методом измерения импеданса культуры в реальном времени с помощью прибора XCellingence RTCI DP. Первичные культуры ММСК получали из подкожной клетчатки человека по стандартной методике. По истечению трех пассажей клетки снимали 0,25% трипсином-ЭДТА и рассеивали по 10^4 на лунку в планшеты для исследования пролиферации и миграции. Предварительно в лунки помещали среду с добавлением 1% сыворотки плода коровы и эритропоэтина в концентрации 33 МЕ/мл или без него. Планшеты с клетками устанавливали в прибор и помещали в CO_2 -инкубатор на 72 ч. При культивировании клеток в среде с эритропоэтином миграционная активность ММСК повышалась незначительно, но наблюдалось выраженное стимулирующее действие на их пролиферацию. Значение клеточного индекса (КИ), вычисленное прибором по показаниям импеданса в конечной точке эксперимента, в лунках с эритропоэтином составило $2,15 \pm 0,38$ при оценке пролиферативной и $1,17 \pm 0,07$ для миграционной активности. В лунках без эритропоэтина, где процессы миграции и пролиферации ММСК протекали спонтанно, значение КИ оказалось равно $1,00 \pm 0,08$ и $1,00 \pm 0,06$ соответственно. Таким образом, нами выявлено стимулирующее действие эритропоэтина на важнейшие функциональные характеристики ММСК — их пролиферативную и миграционную активности. Это, вероятно, в немалой степени обуславливает более высокую эффективность совместного применения эритропоэтина и ММСК для лечения ишемии.

АДЕНОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРА С КОНТРОЛИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ

Ожаровская Т.А.*, Лысенко А.А.

ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: bu.bulo4ka@gmail.com

Рекомбинантные аденовирусы человека широко исследуются в качестве векторов для доставки генетической информации в клетки. Безопасность аденовирусных векторов с делетированными E1 и E3 областями доказана в многочисленных клинических испытаниях. Аденовирусные вектора — одни из основных кандидатов для создания геннотерапевтических препаратов и вакцин. Необходимым требованием к таким препаратам является возможность контроля уровня экспрессии трансгена. Одной из систем для контроля экспрессии генов является система TetOFF/TetON, основанная на работе оперона, определяющего устойчивость к тетрациклину (Tet) у *E.coli*. В этой системе важными являются нуклеотидная последовательность из промотора Tet-оперона (tetO), транскрипционный фактор (tTA), способный связываться с областью tetO и антибиотиком Tet (доксциклином (Докс)). В системе TetOFF в отсутствие Tet транскрипционный фактор tTA связывается с tetO и запускает экспрессию трансгена. Если в систему добавляется Tet, то tTA, образуя комплекс с Tet, теряет способность связываться с tetO, и экспрессия трансгена прекращается. Нами сконструирован рекомбинантный аденовирус на основе аденовируса человека 5 серотипа и системы TetOFF. Использована технология AdEasy™ Adenoviral Vector System (Agilent Technologies, USA). В геном аденовируса с делетированными E1 и E3 областями были включены две экспрессионные кассеты: одна с геном фактора tTA под контролем полного CMV промотора и вторая с геном *EGFP* под контролем tetO и минимального промотора CMV. Аденовирус Ad5Tet-EGFP был получен в перmissiveной культуре клеток HEK293. Титр препарата аденовируса составил 10^8 БОЕ/мл. Определена выживаемость культуры клеток HEK293 и A549 при различных концентрациях Докс (полусинтетический аналог Tet) в среде. С помощью окрашивания пропидий йодидом показано, что 50 мкг/мл — максимально возможная концентрация Докс в среде (выживаемость $85 \pm 5\%$ в течение 96 ч. инкубации с Докс). Клетки линий HEK293 (пермиссивные) и A549 (непермиссивные) были трансдуцированы вирусом Ad5Tet-EGFP и контрольным вирусом Ad5CMV-EGFP. При концентрации Tet 30 мкг/мл и более экспрессия EGFP практически полностью подавлена в случае с вирусом Ad5Tet-EGFP и не изменяется в клетках с контрольным вирусом Ad5CMV-EGFP. Количество светящихся клеток и интенсивность свечения определялись с помощью проточной цитофлуорометрии. Таким образом, получен аденовирус с контролируемым уровнем экспрессии трансгена, что, например, можно использовать для наработки рекомбинантных аденовирусных частиц, несущих токсичные для клеток HEK293 трансгены.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР НОРМАЛЬНОГО И ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ЭНДОМЕТРИЯ

Сакаева Г.Р.^{1,*}, Нуштаева А.А.¹, Коваль О.А.¹, Гуляева Л.Ф.², Герасимов А.В.³, Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.¹

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²ФГБУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН; ³Новосибирский областной онкодиспансер, Новосибирск, Россия
*e-mail: galia.nsu@gmail.com

Одной из серьезных проблем современной медицины является своевременная диагностика и эффективное лечение онкологических заболеваний. Рак эндометрия (РЭ) — самая частая злокачественная опухоль женских половых органов в развитых странах. Ежегодно в мире выявляют более 200 000 новых случаев РЭ, и около 50 000 женщин умирают от этой опухоли. Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов развития опухолей человека, причины, приводящие к злокачественной трансформации клеток, зачастую остаются неизвестными и требуют проведения дальнейших исследований в этой области. Кроме того, крайне важным является повышение эффективности терапии онкологических заболеваний. Одним из перспективных подходов к решению этой проблемы является разработка технологий первичных культур нормальных и опухолевых клеток для изучения канцерогенеза и тестирования действия противоопухолевых препаратов. Цель работы — получение и исследование характеристик первичных клеточных культур нормальной и трансформированной ткани эндометрия человека.

Были разработаны способы получения первичных клеточных культур нормального и трансформированного эндометрия, выбран оптимальный способ получения и культивирования. Полученные культуры охарактеризованы по скорости пролиферации, экспрессии стероидных рецепторов (ER α , ER β , PGR) и ферменту локального синтеза эстрогенов — ароматазе CYP19. Проведены исследования цитотоксичности стандартных химиопрепаратов и нового потенциального противоопухолевого препарата Лактапина (RL2) методами МТТ и мониторинга в режиме реального времени с помощью прибора xCelligence. Методом проточной цитометрии исследован апоптоз полученных культур под действием стандартных химиопрепаратов и действием RL2. Показано, что полученные культуры обладают разной скоростью пролиферации, различаются по экспрессии исследуемых генов и степени чувствительности к действию антираковых препаратов, а также обладают различной способностью клеток к апоптозу под действием противоопухолевых препаратов.

Работа поддержана Интеграционным проектом СО РАН №94, ГК №11.BVV.21.0171.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ КУЛЬТУР МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ КОЛЕННОГО СУСТАВА ЧЕЛОВЕКА

Сарсенова М.А.*, Укбаева Т.Д., Огай В.Б.

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан

*e-mail: sarsenova_madina93@mail.ru

В настоящее время особо востребованы методы клеточной терапии, которые позволяют за короткий период времени получить клеточный трансплантат. Для получения клеточного трансплантата в качестве источника мезенхимальных стволовых клеток (МСК) использовали синовиальную оболочку коленного сустава человека.

Выделение синовиальной оболочки из коленного сустава проводили, придерживаясь методики, впервые предложенной Casimo De Bari (De Bari et al., 2001). Забор материала проводился асептическим путем при помощи артроскопических процедур при наличии информированного согласия пациента. На первом этапе получения первичной культуры произвели механическую и ферментативную дезагрегацию синовиальной оболочки. Для этого материал был измельчен на мелкие фрагменты, размером 1-2 мм и обработан с помощью раствора коллагеназы II типа в течение 12-16 ч. при 37°C. Далее полученную суспензию клеток профильтровали через нейлоновый фильтр (размер пор 70 мкм) для удаления оставшихся участков ткани. После двукратной отмывки ФСБ (фосфатно-солевой буфер), клетки ресуспендировали в среде DMEM. Для получения первичной культуры МСК клетки культивировали в полной питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина в культуральных 25 см² флаконах и оставляли в СО₂-инкубаторе при 37°C и 5% СО₂. Через 3 дня неприкрепленные к пластику клетки удаляли. Смена среды осуществлялась через каждые 3 дня.

В результате выделения средний выход клеток из 1 мг синовиальной оболочки составил примерно $1,5-2 \times 10^4$ клеток. После ресуспендирования в полной питательной среде, клетки посеяли в культуральные 25 см² флаконы с расчетом 1×10^4 клеток/см². На третий день неприкрепившиеся к пластику клетки удалили и провели морфологический анализ адгезивных клеток. Как показал анализ, первичная культура являлась гетерогенной и содержала синовиальные клетки, олигодендритные, полидендритные и клетки с фибробластоподобной морфологией. Однако после 1 пассажа культура клеток отличалась от первичной. Для данной культуры была характерна гомогенность и наличие клеток с ярко выраженной веретенновидной фибробластоподобной морфологией, имеющих крупное овальное ядро с характерными двумя или более ядрышками. Также наблюдается цитоплазматическая перинуклеарная зернистость, что может указывать на выраженную секреторную активность этих клеток.

Ранее было установлено, что МСК синовиальной оболочки имеют способность к трехлинейной дифференцировке в адипоциты, остеобласты и хондроциты (Friedenstein et al., 1976; Owen, 1988; D'Ippolito et al., 2004). Для этого был проведен анализ на дифференцировочный потенциал. После трех недель культивирования в соответствующих условиях со сменой среды через каждые три дня, для установления факта дифференциации, клетки были окрашены по известной методике (Oscier et al., 2004). В процессе дифференцировки МСК в остеобласты наблюдаются образование многослойных узлов и процессы кальцификации во внеклеточном матриксе, которые были идентифицированы и проанализированы с помощью красителя ализариновый красный (Friedenstein et al., 1976). Культивирование МСК КМ и синовиальной оболочки в адипогенной среде привело к появлению клеток с крупными вакуолями в цитоплазме, занимавшими все пространство в клетке. Наличие липидных включений подтвердилось положительной окраской Oil Red O (Owen, 1988). По данным гистологического исследования образовавшихся микрошариков в обоих образцах была выявлена хондрогенная морфология с частичным образованием коллагена. Образование коллагена, в свою очередь, свидетельствует о формировании хрящевой ткани (Pittenger et al., 1999).

АНТИГИПОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ (BDNF, GDNF) ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ *IN VIVO* и *IN VITRO*

Сахарнова Т.А.^{1,2,*}, Ведунова М.В.^{2,1}, Митрошина Е.В.^{1,2}, Шишкина Т.В.², Мухина И.В.^{1,2}

¹ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России; ²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*e-mail: saHarnova87@mail.ru

Согласно современным представлениям нейротрофические факторы играют ключевую роль в функционировании нейронных сетей головного мозга в норме и при развитии патологических состояний, способствуя сохранению функциональной активности клеток на высоком метаболическом уровне. Показано, что механизмы защитного действия глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) связаны и реализуются через одни триггерные механизмы поддержания гомеостаза нейронных сетей. Совместное применение нейротрофических факторов потенциально может усилить активационный сигнал и повысить эффективность клеточного ответа при воздействии повреждающих факторов. Целью исследования стало изучение антигипоксических свойств нейротрофических факторов BDNF и GDNF при моделировании острой гипоксии *in vivo* и *in vitro*. Исследования *in vitro* проводились на первичных диссоциированных культурах гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии СВА. Моделирование нормобарической гипоксии осуществлялось после 14 дня культивирования путем замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Моделирование острой гипобарической гипоксии (ОГБГ) *in vivo* проводили на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6 по стандартной методике (Лукьянова, 1990). Показано, что при моделировании гипоксии *in vitro* достоверно увеличивалось количество мертвых клеток по сравнению с интактной группой ($p < 0,01$). Выявлены антигипоксические свойства нейротрофических факторов (GDNF, BDNF), причем GDNF обладал более выраженным антигипоксическим эффектом. При превентивном применении GDNF количество мертвых клеток в культуре снижалось, а при моделировании ОГБГ повышалась выживаемость животных более чем в 2 раза ($p < 0,05$). Однако совместное применение GDNF и BDNF в экспериментах *in vitro* и *in vivo* снижало эффективность применения каждого из нейротрофинов. Таким образом, обнаружено взаимоподавляющее действие нейротрофических факторов, несмотря на то, что каждый из них обладал выраженным антигипоксическим действием.

Работа поддержана грантами РФФИ №13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601.

ЛИЗАТ ТРОМБОЦИТОВ ДОНОРОВ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТЕЛЯЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Сергеева Н.С., Свиридова И.К.^{*}, Шанский Я.Д., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Кувшинова Е.А.

ФГБУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: prognoz.06@mail.ru

Актуальной проблемой регенеративной медицины является безопасность биомедицинских клеточных продуктов. Для стандартизации процесса получения биомедицинских клеточных продуктов требуется, в частности, использование адекватных культуральных сред и добавок для культивирования клеток. Внимание исследователей в этом аспекте обращено к лизату тромбоцитов (ЛТ) человека как альтернативе традиционно используемой эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС). **Цель исследования** — сравнительное изучение биохимического, гормонального и иммунохимического профилей ЛТ доноров и ЭТС и оценка их биологической активности *in vitro*.

Материалы и методы: материалом для получения ЛТ являлась тромбоцитарная масса (ТМ) 95 доноров. ЛТ получали из ТМ методом температурного лизиса. Биохимический анализ проведен для 20 образцов ЛТ доноров и 4 образцов ЭТС. Концентрации инсулина, эстрадиола и тестостерона были оценены в ЛТ 20 доноров и в 4-х образцах ЭТС. Содержание факторов роста (ФР) (TGF- β 1, VEGF, PDGF AA, PDGF AB, PDGF BB, IGF-1) в 95 образцах ЛТ доноров и 4 образцах ЭТС определяли методом ИФА. Оценку динамики роста культур с использованием ЛТ и ЭТС в качестве ростовых добавок осуществляли на модели иммортализованных фибробластов кожи человека (ФЧ) и ММСК 2-3 пассажа из ЖТ пациентов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Для оценки влияния ЛТ в составе среды на дифференцировочные потенции ММСК человека *in vitro* их культивировали в остеогенном или адипогенном коктейле до 28 сут. и окрашивали клетки на щелочную фосфатазу и липидные включения.

Результаты: в ЛТ, как и в ЭТС, содержатся все исследованные компоненты венозной крови человека, однако их уровень различался: концентрации щелочной фосфатазы, ЛДГ, креатинина и ряда ионов в ЛТ были достоверно ниже, чем в ЭТС, а концентрации холестерина, ЛПВП, общего белка, альбумина и мочевой кислоты и исследованных гормонов — выше. Уровни ФР PDGF AA, AB, TGF- β 1 и VEGF в ЛТ оказались в 10-50 раз выше, чем в ЭТС; PDGF BB в ЛТ не выявлен, а концентрации IGF-1 в ЛТ и ЭТС были близки. *In vitro* ЛТ эффективно поддерживал пролиферацию ФЧ и ММСК ЖТ. ЛТ, как и ЭТС, не препятствовал индукции остеогенной и адипогенной дифференцировки ММСК *in vitro*. Можно сделать вывод, что ЛТ может стать

полноценной аллогенной добавкой к ростовой среде для культивирования нормальных, в т.ч. стволовых, клеток человека.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 12-02-00704а.

ОТЛИЧИЯ В УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Сульдина Л.А.^{1,*}, Павлова С.В.^{1,2,3}, Малахова А.А.^{1,2,3}, Стекленева А.Е.^{1,2,3}, Васькова Е.А.^{1,2,3}, Закиян С.М.^{1,2,3}, Киселева Е.В.¹

¹ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН; ²ФГБУ ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России; ³ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: suldinalubov@gmail.com

Индукцированные стволовые клетки (ИПСК) широко используются для моделирования заболеваний человека и проявляют высокое сходство в экспрессии ключевых факторов плюрипотентности с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) (Mallon et al., 2014). Выявлены также существенные различия между этими клетками по уровню экспрессии ряда других генов, эффективности дифференцировки, а также функциональной активности таких органелл, как митохондрии (Suhr et al., 2010; Zhao et al., 2014). Сравнительный анализ структурной организации ЭСК (*RES 27* пас.37) и ИПСК (*BRS 18* пас.51) крыс, культивируемых нами в присутствии либо в отсутствии ингибиторов апоптоза на последнем пассаже показал, что оба типа клеток проявляют сходство по форме клеток (округлая, реже удлинённая), наличию крупных ядер с большими ретикулярными ядрышками и незначительными инвагинациями ядерной оболочки. Цитоплазма обеднена органеллами, содержит много свободных полисом, типичный аппарат Гольджи (АГ), цистерны гладкого и шероховатого ЭПР в виде узких цистерн и иногда лизосомы. В ЭСК и ИПСК были обнаружены скопления аморфного материала (возможно липопротеидов). Они выявлялись в клетках в присутствии ингибиторов апоптоза, но чаще при их отсутствии, причем в ИПСК этого материала, а также лизосом, было существенно больше, чем в ЭСК. Длина цистерн шероховатого ЭПР увеличивалась в присутствии ингибиторов апоптоза. В отсутствие ингибиторов апоптоза в обоих типах клеток преобладали митохондрии с гетерогенными (узкими и везикулярными) по строению кристами. При добавлении ингибиторов апоптоза большинство митохондрий становились более однородными и содержали в основном везикулярные кристы, однако в ЭСК часть митохондрий сохраняли гетерогенную форму крист, что почти не наблюдалось в ИПСК. Полученные данные свидетельствуют о том, что ЭСК и ИПСК имеют разную чувствительность к отсутствию ингибиторов апоптоза, оказывающих положительное влияние на морфологию обоих типов клеток.

ИНДУКЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА И ДНК В СОВМЕСТНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ И КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

Ткаченко Т.А., Дударев А.Н., Печенкина А.Ю., Давыденко С.В.,
Мирошниченко С.М., Усынин И.Ф.*

ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: ivan.usynin@niibch.ru

В последние годы значительно возрос интерес к исследованиям, направленным на создание экстракорпоральной («вспомогательной») печени с использованием в качестве основного компонента биоискусственного органа изолированных гепатоцитов. Одной из основных проблем при разработке биоинженерной печени является получение достаточного количества гепатоцитов с сохранением их органоспецифических функций в течение длительного времени. Клетки печени, обладающие высоким пролиферативным потенциалом *in vivo*, утрачивают это свойство в изолированном состоянии. Причины нарушения функций гепатоцитов остаются до сих пор невыясненными. Ранее нами установлено, что биосинтетическая активность гепатоцитов сохраняется при совместном культивировании (сокультура) с непаренхимными клетками печени (Усынин и др., 1995; Усынин, Панин, 2008). В работе исследована роль гетеротипических межклеточных взаимодействий в регуляции биосинтеза белка и ДНК в сокультуре гепатоцитов с клетками костного мозга (КМ) и эндотелиальными клетками (ЭК) печени. Раздельное культивирование гепатоцитов и клеток КМ в бессывороточной среде RPMI-1640 сопровождалось постепенным снижением скорости биосинтеза ДНК и белка. Напротив, при совместном культивировании гепатоцитов и клеток КМ в соотношении 1:5 скорость включения ³H-тимидина в ДНК возрастала, и через 24 ч. данный показатель был в 3-6 раза выше, чем в монокультурах гепатоцитов и клеток КМ. Еще более выраженный прирост (в 10-12 раз) обнаружен в сокультуре клеток при соотношении гепатоцитов и клеток КМ 1:10. Подобные различия между монокультурой и сокультурой клеток обнаружены при оценке скорости биосинтеза белка. При совместном культивировании гепатоцитов и клеток КМ в трансвеллах (Costar, США), позволяющих моделировать дистантные взаимодействия клеток, пролиферативная активность возрастала как в гепатоцитах, так и в клетках КМ. Однако прирост данного показателя в этих условиях был менее выраженным. Обнаруженные различия в скорости биосинтетических процессов в зависимости от условий сокультивирования свидетельствуют о важной роли контактного взаимодействия гепатоцитов и клеток КМ в индукции биосинтеза ДНК и белка. Подобные закономерности обнаружены и при совместном культивировании гепатоцитов с ЭК печени. Таким образом, реконструирование ткани печени *in vitro* с использованием клеток КМ и/или ЭК позволит создать наиболее оптимальные условия для сохранения пролиферативного потенциала и дифференцированных функций гепатоцитов в аппаратах типа биоискусственная печень.

РАЗЛИЧИЯ ДИНАМИКИ ЗАРАЖЕННОСТИ МИКОБАКТЕРИЯМИ КЛЕТОК-ХОЗЯЕВ В МОДЕЛЯХ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ГРАНУЛЕМ МЫШЕЙ *EX VIVO* И ОСТРОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Уфимцева Е.Г.

ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск, Россия

e-mail: ufim1@ngs.ru

Одной из актуальных задач в разработке новых лекарственных средств лечения и профилактики туберкулезного заболевания человека, уносящего, по данным ВОЗ, до 2 млн. жизней в год, остается поиск адекватных моделей, в том числе на основе клеток, для тестирования антимикобактериальных препаратов. В двух моделях: латентная туберкулезная инфекция мышей *ex vivo* и острое заражение мышинных клеток бациллами вакцины БЦЖ (BCG, bacillus Calmette-Guérin, аттенуированный штамм *M. bovis*) *in vitro*, — сравнили количество кислотоустойчивых BCG-микобактерий в клетках-хозяевах. Макрофаги гранулематозных воспалительных образований (гранулем), полученных из костного мозга и селезенки мышей Balb/c спустя 20 дней, 1 и 2 мес. после заражения вакциной БЦЖ *in vivo*, содержали в основном единичные BCG-микобактерии в течение 2-5 суток культивирования *ex vivo*. Клетки с 10 и более бациллами наблюдали достаточно редко в гранулемах мышей, а макрофаги с 50 и более бактериями выявили в единичных образованиях. При остром заражении бактериями вакцины БЦЖ культур клеток костного мозга и перитонеальных макрофагов интактных мышей Balb/c обнаружили, наоборот, значительный рост числа микобактерий в клетках в течение 5 суток инфекции *in vitro*. На 4 ч. после заражения клетки-предшественники макрофагов костного мозга содержали в среднем по две BCG-микобактерии, однако на 24, 48, 72 и 96 ч. инфекции наблюдали снижение числа таких клеток с постепенным увеличением количества макрофагов с числом бацилл больше 10. На 120 ч. анализа значительное число макрофагов в популяции клеток костного мозга характеризовалось повышенной зараженностью микобактериями (от 20 бацилл и даже больше 50 бактерий). Параллельно обнаружили снижение числа клеток с одиночными микробами. Аналогичную динамику зараженности BCG-микобактериями выявили и в перитонеальных макрофагах мышей в течение инфекции *in vitro*. Следовательно, макрофаги гранулем мышей на латентной стадии туберкулезной инфекции были неспособны уничтожить некоторую часть микобактерий, но могли контролировать размножение выживших бацилл как *in vivo*, так и в культуре *ex vivo*, в отличие от макрофагов, полученных из разных органов интактных мышей и зараженных BCG-микобактериями *in vitro*. Таким образом, использованные экспериментальные модели туберкулезной инфекции мышей *ex vivo* (латентная стадия) и *in vitro* (стадия острой инфекции) перспективны для оценки действия антимикобактериальных агентов на клетки животных с различной динамикой зараженности BCG-микобактериями.

ОСТЕОФИЛЬНЫЙ ПОЛИМЕР И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Янцен Ю.И.^{1,*}, Идрисова Д.¹, Олжаев Ф.С.¹, Умбаев Б.А.¹, Мурата Х.², Рассел А.², Аскарова Ш.Н.¹

¹Центр наук о жизни, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан; ²Institute for complex engineering systems, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA

*e-mail: yantsen@nu.edu.kz

На сегодняшний день регенерация костной ткани является очень важной и актуальной проблемой. Нарушение костного метаболизма при таких заболеваниях, как остеопороз или болезнь Педжета приводит к усилению остеокластной активности и потере как остеобластных клеток, так и клеток-предшественников остеобластов. Для восполнения пула остеобластов было предложено применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК). С целью разработки таргетной доставки клеток к очагам повреждения костной ткани был синтезирован полимер, способный стабильно связываться с МСК и обладающий тропностью к костной ткани. Базовой молекулой при синтезе являлся кополимер, состоящий из двух мономеров: биологически инертного N,N-диметилакриламида (ДМАА) и N'-гидроксисукцинимидного эфира N-акрилоил-6-аминогексановой кислоты (NHS) — с последующей полимеризацией и ковалентным присоединением бисфосфонатной (БФ) группы. БФ имеют высокую степень сродства к гидроксиапатитам и, таким образом, могут выступать в качестве остеофильного компонента данного синтетического полимера. Для придания полимеру свойства присоединяться к клеткам другой конец несет на себе NHS-группу, что обеспечивает его связывание с amino- и карбоксильными группами на поверхности клеточных мембран. Для изучения способности полимера присоединяться к поверхности клеток молекулы полимера были синтезированы с небольшим количеством флуоресцеина. Это позволяет проводить флуоресцентный качественный и количественный анализ полимера как в связанном, так и свободном состоянии. Была проведена оценка цитотоксичности полимера с помощью Luminescent Viability Assay и его влияние на процессы остеогенной дифференцировки МСК *in vitro*. Был также проведен ряд экспериментов *in vivo* для оценки распределения модифицированных полимером МСК в теле лабораторного животного при помощи компьютерного микромографа и имиджера IVIS (Caliper).

Ключевые слова: остеопороз, костный метаболизм, мезенхимальные стволовые клетки, АТРП синтез, клеточная терапия, целенаправленная доставка клеток.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 3D МОДЕЛЕЙ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Carr K.^{1,*}, Riss T.L.², Valley M.P.², Zimprich C.A.², Niles A.L.², Kupcho K.R.², Lazar D.F.²

¹Promega GmbH, Mannheim, Germany; ²Promega Corporation, Madison, WI, USA
*e-mail: kseniya.carr@promega.com

Клетки, растущие в 3D модельных системах в большей степени соответствуют естественным структурам, чем клетки, которые росли в тонком монослое на стандартных пластиковых планшетах. Многоклеточные 3D культуры, содержащие не один тип клеток и формирующие сложный внеклеточный матрикс представляют собой более физиологически соответствующее окружение. В то же время такие культуры затрудняют анализ клеточных событий, так как химические наборы первоначально были разработаны для монослойных культур. Таким образом, существует необходимость создания и проверки удобных и эффективных методов анализа, применимых к большим 3D микротканям. Для каждой модели должны быть учтены такие критические факторы, как эффективное проникновение реагентов для анализа и/или полный лизис микротканевых структур с использованием как детергентов, так и физического разрушения. Мы разработали улучшенный состав реагентов для измерения жизнеспособности клеток с помощью биолюминесцентного определения АТФ. Такой улучшенный состав реагентов продемонстрировал более эффективный лизис больших микротканей. В сочетании с активным физическим разрушением микротканей мы также получили результаты измерения каспазной активности и анализа оксидативного стресса в клетках.

Тезисы заочных участников

ДЕРМАЛЬНЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИТОЗАНА И КУЛЬТИВИРОВАННЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ И КЕРАТИНОЦИТАМИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ

Ахмадеева Ж.Т.^{1*}, Жылкибаев А.А.¹, Рамазанов Ж.К.², Белан Е.А.², Данлыбаева Г.А.¹

¹Национальный центр биотехнологии; ²НИИ травматологии и ортопедии, Астана, Казахстан

*e-mail: zhans_86@mail.ru

Комбустиология имеет многовековую историю, однако способы, средства и тактика лечения ожогов остаются одной из актуальных проблем регенеративной медицины. Длительность и сложность лечения глубоких ожогов заставляют искать новые средства и подходы для исцеления ожоговых больных. Известно, что хитозан — это биodeградируемый, биосовместимый полисахарид. Это обусловлено наличием у него защитных, гидросорбционных, антикоагулянтных, антибактериальных свойств в отношении ряда бактерий и грибов и его способностью активизировать заживление раневой поверхности.

Целью данного исследования было применение подложки (графта) с культивированными клетками кожи для улучшения результатов лечения глубоких ожогов. В работе применяли хитозан-пектиновую подложку (патент РФ №2458077) с культивируемыми фибробластами и кератиноцитами кожи человека при лечении глубоких ожогов кожи. Подложку готовили путем растворения 0,3% хитозана в 0,2N уксусной кислоте, которую затем смешивали с 0,3% раствором пектина, растворенного в дистиллированной воде. Хитозановую пленку формировали в чашке Петри в течение 20-24 ч. при температуре 20-25°C. После высыхания пленки и обработки ее поверхности коллагеном, рассеивали культивированные и охарактеризованные ранее аллогенные фибробласты (патент РК № 25091), либо аутологичные фибробласты и кератиноциты. Иммуноцитохимический анализ и микроскопирование выявили, что клетки имели типичную для них морфологию. 9 больным с ожогами 3АБ-4Б степени во время операции аутодермопластики на гранулирующие раны наносили суспензию культуры аллофибробластов в виде аэрозоля. Затем поверх сетчатых аутотрансплантатов накладывали хитозановую подложку с клетками. В результате было выявлено, что применение дермального эквивалента с аллофибробластами или аутофибробластами с аутокератиноцитами, обеспечивает более высокий уровень эпителизации ячеек перфорации сетчатых трансплантатов (5 день) и облегчает проведение перевязок по сравнению с бесклеточной хитозан-пектиновой подложкой (7 дней) и необработанной поверхностью ран, покрытой влажно-высыхающей марлевой повязкой (10 день).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффективности и целесообразности применения дермального эквивалента из хитозана и культивируемых клеток кожи в комбустиологии.

ОЦЕНКА ЦИТОСОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ-НОСИТЕЛЕЙ, ИМПРЕГНИРОВАННЫХ ИБУПРОФЕНОМ

Бухарова Т.Б.^{1,*}, Антонов Е.Н.², Волков А.В.³, Минаева С.А.², Вихрова Е.Б.¹, Попов В.К.², Гольдштейн Д.В.¹

¹ФГБУ МГНЦ РАМН; ²ФГБУН ИПЛИТ РАН; ³ФГБУ НИИМЧ РАМН, Москва, Россия

*e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Существенным ограничением использования аллогенного клеточного материала в тканевой инженерии является низкая иммунная совместимость донорского трансплантата и организма реципиента. Для снижения иммунного ответа используют глюкокортикоиды различного происхождения, которые часто искажают дифференцировку клеток, снижая эффективность трансплантации. В настоящей работе предлагается для этой цели применять нестероидный противовоспалительный препарат ибупрофен, включая его в состав полимерных матриц-носителей для клеток. Инкапсуляция препарата внутри биорезорбируемого носителя обеспечит его локальное и пролонгированное действие за счет постепенного диффузного высвобождения в окружающие ткани. Целью исследования является разработка матриц-носителей из полилактогликолида, импрегнированных ибупрофеном и изучение их цитосовместимости. **Материалы и методы:** трехмерные пористые матрицы-носители изготавливали из мелкодисперсных гранул полилактогликолида марки Purasorb PDLG 7507, смешанных с порошкообразным ибупрофеном среде сверхкритического CO₂ с помощью установки для сверхкритической флюидной монолитизации полимерных материалов. Для анализа распределения ибупрофена внутри полимерной матрицы и исследования кинетики его высвобождения в буферный раствор использовалась спектроскопия комбинационного рассеяния. В качестве клеточных культур использовали мультитипентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) жировой ткани. Клетки культивировали в ростовой среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мг/л амикацина. Для оценки цитотоксичности образцов проводили МТТ-тест, а адгезию клеток на поверхности носителей изучали с помощью флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии. **Результаты:** предложенный метод получения носителей обеспечивает равномерное распределение ибупрофена по поверхности и объему матриц. Препарат высвобождается из матриц постепенно и практически без нежелательного первичного выброса. Скорость высвобождения зависит от состава полимера, пористости матрицы и количества инкапсулированного вещества, что позволяет подбирать условия для различных задач тканевой инженерии. В условиях *in vitro* показано, что носители не оказывают цитотоксического действия на культуры ММСК. Клетки эффективно прикрепляются и распластаются на поверхности матриц-носителей. Оптимальная концентрация ибупрофена внутри матрицы составляет 20 масс.%. Работа поддержана грантами РФФИ № 13-02-12041 и 13-04-12073.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОТРАНСПЛАНТАТА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТА КОСТНОЙ ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

Данилкович Н.Н.^{1,*}, Космачева С.М.¹, Игнатенко С.И.¹, Деркачев В.С.²

¹РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий; ²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

*e-mail: nndanilkovich@gmail.com

Применение клеточных технологий в составе тканеинженерных конструкций для восстановления костных дефектов является перспективным решением в стимуляции репаративного остеогенеза. **Цель исследования** — оценить эффективность биотрансплантата в регенерации костной ткани на модели *in vivo*.

Материалы и методы: использовали биотрансплантат на основе остеопластических материалов (Кафам, Коллапан, Остеоматрикс), релизатов тромбоцитов (РТ), преифференцированных в остеогенном направлении мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека (МСК). РТ получали из концентрата тромбоцитов методом активации тромбином. Влияние биотрансплантата на регенерацию трубчатых костей проводили на модели краевого дефекта лучевой кости кроликов (1,5 см). Контролем служил дефект кости, заполненный остеопластическим материалом без МСК и РТ. Биотрансплантат в дефекте покрывали фибриновым гелем (Фибриностат М, Беларусь). Восстановление костного дефекта оценивали методом компьютерно-томографического исследования (КТ) и гистологическим (окраска гематоксилин-эозином) через 1, 2 и 3 мес. после применения биотрансплантата.

Результаты: по результатам КТ трудно было оценить преимущества биотрансплантатов по сравнению с контролем и между собой. Денситометрия показала увеличение плотности костных дефектов с Кафамом и Остеоматриksom в составе биотрансплантатов по сравнению с контролями через 2 мес. наблюдения. К 3-му мес. плотность данных биотрансплантатов снижалась и не отличалась от контроля. Плотность биотрансплантата, в состав которого входил Коллапан, нарастала к 3-му мес. Морфологический анализ показал, что при применении Коллапана в составе биотрансплантата наблюдается полная регенерация костного дефекта (первичное заживление), активация остеогенеза с избыточным формированием пластинчатой костной ткани в зоне дефекта ко 2-му мес. наблюдений. При использовании Остеоматрикса и Кафама отмечено сегментарное замещение костного дефекта вновь сформированной незрелой и зрелой пластинчатой костной тканью (первичное заживление, но с сохранением костных кист, содержащих материал). В контролях — многочисленные кисты и инкапсуляция материала.

Таким образом, показана эффективность применения в составе биотрансплантата МСК и растворимых факторов тромбоцитов, как ключевых индукторов остеогенеза в зоне дефекта кости.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *PROPIONIBACTERIUM AVIDUM 1*

Огай Д.К.¹, Миралимова Ш.М.¹, Кутлиева Г.Д.^{1,*}, Элова Н.А.¹, Наврузов С.Н.², Еникеева З.М.²

¹Институт микробиологии АН РУз; ²Республиканский онкологический научный центр МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

*e-mail: aziz0761@gmail.com

Повышение эффективности лечения больных со злокачественными новообразованиями — одна из наиболее актуальных проблем современной онкологии. Наиболее оптимальным в онкологической практике является применение иммуномодуляторов (ИМ), которые в терапевтических дозах восстанавливают функции иммунной системы. К современным методам биотерапии, используемым в онкологии, относятся активная иммунотерапия с применением клеточных (аутологичных и аллогенных) и неклеточных (ганглиозиды, белки теплового шока, ДНК, рекомбинантные пептиды) вакцин. В последние годы среди иммуномодулирующих средств особый интерес вызывают препараты микробного происхождения. Цель наших исследований: изучение влияния отечественного препарата «Авидин», состоящего из мертвых клеток *Propionibacterium avidum 1*, на ингибирование процесса опухолеобразования у мышей BALB/c с перевивными опухолевыми клетками аденокарциномы толстого кишечника (АКАТОЛ). Новый препарат «Авидин» при одномоментном введении экспериментальным мышам внутрибрюшинно за 3 дня до перевивки опухолевых клеток аденокарциномы толстого кишечника процент торможения опухоли (% ТРО) составил 43,18% по массе и 58,0% по объему, за 6 дней — 63,6% по массе и 76,5% по объему соответственно. Препарат, состоящий из мертвых клеток *Propionibacterium avidum 1*, оказал высокую антиканцерогенную активность, что свидетельствует о перспективности применения данного препарата в качестве бактериальной вакцины. Установлена стимуляция иммунной системы, в частности активация макрофагов, повышение экспрессии рецепторов CD16 натуральных киллерных клеток в 1,6-1,7 раз. Необходимость применения иммуномодуляторов в онкологии связана не только с патогенетическими особенностями заболеваний, но и с методами их лечения: химио- и лучевая терапия, а также любые оперативные вмешательства индуцируют или усугубляют вторичную иммунную недостаточность. Препараты данного класса могут оказаться чрезвычайно полезными для снижения побочных эффектов традиционной противоопухолевой терапии и для профилактики и лечения сопутствующих инфекционных осложнений.

ЛИМФОИДНЫЕ ФОЛЛИКУЛЫ КИШЕЧНИКА КАК ЗОНА ОБРАЗОВАНИЯ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ТКАНИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ ЖИВОТНЫМ С ТОКСИЧЕСКИМ ФИБРОЗОМ

Умбаев Б.А.^{1,*}, Аскарлова Ш.Н.¹, Шалахметова Т.М.², Цой А.К.¹, Буланин Д.С.¹

¹Центр наук о жизни, Назарбаев Университет, Астана; ²Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

Альтернативой трансплантации печени является трансплантация гепатоцитов (ТГ). При интрапортальной трансплантации, основном методе введения гепатоцитов, главными осложнениями являются тромбоз воротной вены, портальная гипертензия, геморагия и миграция клеток в легкие, которая приводит к эмболии легочной артерии. Альтернативой инъекции клеток в портальную вену является эктопическая трансплантация гепатоцитов. В 2011 году Норро и соавторы показали, что гепатоциты способны выживать и пролиферировать в лимфатических узлах мышей и снижать смертность, вызванную острой печеночной недостаточностью. Однако в данном исследовании эксперименты проводились на трансгенных мышах Fah. В данном исследовании была использована модель, более приближенная к клиническим условиям. Были использованы 72 половозрелых белых беспородных крысы с массой тела 200-230 г, которые были разделены на 4 группы: (1) интактная группа (n=18); (2) крысы с экспериментально индуцированным фиброзом (ИФ) (n=18); (3) крысы с ИФ, которым трансплантировали гепатоциты (n=18); для предотвращения иммунного ответа группы 2 и 3 получали ежедневно иммуносупрессор циклоспорин А (ЦА) (25 мг/кг); (4) в качестве контроля крысы получали только ЦА (n=18). Для развития ИФ была использована модель интоксикации крыс N-нитрозо-диметиламином (НДМА), интраперитонеально, 10 мг/кг, три раза в неделю в течение 4 недель. Через два дня после прекращения воздействия НДМА животным из 3 группы вводили аллогенные гепатоциты в концентрации $3-5 \times 10^6$ клеток/на животное. Функции печени оценивали с помощью количественных биохимических показателей крови (АЛТ, АСТ, ГГТ, общий белок, билирубин и альбумин) через 1 неделю, 1 и 2 мес. после ТГ. Для выявления заселения трансплантированных клеток в лимфоузлах проводили иммуногистохимический анализ с использованием маркера гепатоцитов (Нер Par 1). Показано, что аллогенная интраперитонеальная трансплантация донорских гепатоцитов улучшает функциональные показатели печени у животных, подвергавшихся токсическому воздействию гепатотоксина, что отражалось на их выживаемости. Иммуногистохимический анализ срезов на маркер гепатоцитов Нер Par 1 продемонстрировал, что ТГ приводит к заселению паренхимы лимфоидных фолликулов кишечника Нер Par 1 позитивно окрашенными клетками.

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ПОДТИПОВ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Христин А.А. *, Шевченко Ю.А., Курилин В.В., Блинова Д.Д., Фалалева С.А., Кузнецова М.С., Сенников С.В.

ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

*e-mail: AAlex.Khristin@gmail.com

Одной из причин развития как первичного очага опухоли, так и метастазов может служить нарушение процесса созревания циркулирующих дендритных клеток (ДК) до функционально активных форм и присутствие Т-регуляторных клеток. В то же время активно разрабатываются и применяются технологии лечения онкологических заболеваний с помощью сгенерированных ДК, нагруженных опухоль-ассоциированными антигенами. В связи с этим представляется важным охарактеризовать фенотипически и функционально исходное состояние ДК периферической крови, их потенциал к дальнейшей дифференцировке, а также содержание регуляторных Т-клеток, как основных клеток-эффекторов иммуносупрессии, перед началом оперативного лечения рака молочной железы для использования их в качестве базовых показателей для разработки иммунотерапевтических стратегий лечения. В данной работе была использована периферическая кровь женщин, больных раком молочной железы, до и после оперативного лечения (через 1-1,5 мес). Определение содержания циркулирующих миелоидных и плазмцитойдных дендритных клеток проводилось методом проточной цитометрии с использованием антител к специфическим маркерам: CD123 и CD11c (для плазмцитойдных и миелоидных ДК, соответственно). Для определения содержания регуляторных Т-клеток был использован комплекс маркеров CD4/CD25/FoxP3. Был проведен сравнительный анализ полученных показателей до и после оперативного вмешательства, в результате которого было выявлено значительное более низкое относительное содержание миелоидных ДК в периферической крови больных как до, так и после операции по сравнению с контрольной группой. Содержание плазмцитойдных ДК в крови больных не имело достоверных различий по сравнению с контролем. Содержание Трег в крови больных (n=4) имело тенденцию на уменьшение, но эти изменения не имели статистически значимых различий. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сохранении измененного соотношении подтипов ДК и содержания Трег после оперативного удаления опухолевого очага. Эти данные подтверждают, что разработка иммунотерапевтических подходов на основе клеточных вакцин на основе функционально-зрелых дендритных клеток важно для эффективного комплексного лечения онкологических больных.

Работа поддержана грантом Президента РФ № 14.120.14.161-МК.

ВЛИЯНИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ C₇, C₈ и C₁₂ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO* ПОСЛЕ ЧЕТВЕРТОГО ПЕРЕСЕВА

Шаров М.А.^{1,*}, Новиков Д.В.¹, Казацкая Ж.А.¹, Новиков В.В.¹, Эль-Регистан Г.И.²

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ²ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

*e-mail: scharovm1990@yandex.ru

Алкилоксибензолы (АОБ) — обширная группа биологически активных веществ как природного происхождения (встречаются как у растений, так и у бактерий), так и химически синтезированных из ауторегуляторного фактора анабиоза микроорганизмов (фактора d1). В настоящее время почти не исследовано их влияние на рост опухолевых клеток человека. **Цель** данного исследования — изучение влияния АОБ C₇, C₈ и C₁₂ на жизнеспособность клеток острый Т-клеточный лейкоз.

Материалом для изучения явилась клеточная линия *Jurkat* (острый Т-клеточный лейкоз) после второго пересева. Культивирование данной клеточной линии и ее пересевы проводились в среде DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и L-глутамина (Sigma) с 4%-гентамицином. Клеточная суспензия в концентрации 10⁶ клеток/мл высевалась во флаконы в присутствии АОБ C₇, C₈ и C₁₂ в концентрации 1×10⁻²% и наблюдалась в течение 10 дней. Химически синтезированные алкилоксибензолы C₇, C₈ и C₁₂ предоставлены Институтом микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Жизнеспособность клеток определяли методом исключения красителя (трипановый синий). В качестве контроля использовали клетки, не обработанные алкилоксибензолом.

Результаты: обнаружено, что при концентрации АОБ C₇, равной 1×10⁻²%, фаза отмирания клеток наступала с 8 дня для клеточной линии *Jurkat*. При той же концентрации алкилоксибензола C₈ фаза отмирания тоже наступала с 8 дня, при АОБ C₁₂ — с 9 дня, в контроле фаза отмирания наступала с 10 дня.

Выводы: таким образом, было показано цитотоксическое действие алкилоксибензолов C₇, C₈ и C₁₂ на клеточную линию *Jurkat*. Определено, что фаза отмирания клеток данной линии наступала позже при действии алкилоксибензола C₁₂, чем при действии C₇ и C₈.



БИОСТАНЦИЯ NIKON ST

ИНТЕРАКТИВНАЯ ПЛАТФОРМА ПОИСКА И АНАЛИЗА КЛЕТОЧНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

- Полный контроль параметров культивирования
- Фазовый контраст и 5 каналов флуоресценции
- Протоколы съемки и микроскопия в реальном времени

ПО для автоматического распознавания фенотипа, подсчета клеток и колоний, оценки экспрессии, пролиферации, эффективности репрограммирования iPS, wound healing, трекинг и другие приложения



СИСТЕМЫ XVIVO

ЗАКРЫТЫЕ МОДУЛИ ДЛЯ АСЕПТИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПРОЦЕССИНГА

- Класс A (ISO 5)
- Соответствие cGMP
- Одобрено FDA и EMA

Экономия бюджета
Экономия времени
Экономия пространства
Безопасность продукта



ООО «БиоВитрум»
Россия, г. Санкт-Петербург
Тел./факс: (812) 3050606
info@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум М»
Россия, г. Москва,
Тел./факс: (495) 7874046
moscow@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрумСибирь»
Россия, г.Новосибирск,
Тел./факс: (383) 2304900
sibir@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрумЮг»
Россия, г. РостовнаДону
Тел./факс: +7 (863) 2550305
garegin.khachatryan@biovitrum.ru

СОВРЕМЕННОЕ ОБРУДОВАНИЕ ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Сидоренко О.Е.

ООО БиоВитрум, направление «Клеточные технологии», Санкт-Петербург, Россия

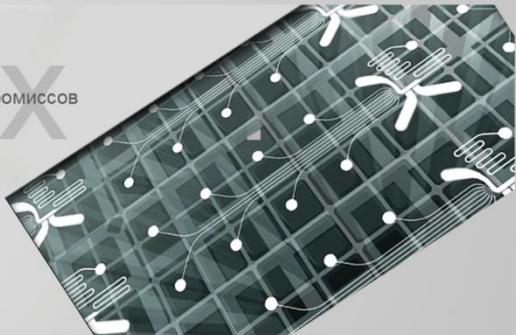
e-mail: olga.sidorenko@biovitrum.ru

Традиционное клеточное культивирование предполагает содержание культур клеток в CO₂-инкубаторе и проведение визуального анализа с помощью отдельно установленного микроскопа. В этом случае можно сколь угодно улучшать условия содержания клеток в инкубаторе, но при переносе культуры к микроскопу или станции визуального анализа риск контаминации и клеточного стресса остается довольно высоким. Современные интегрированные системы анализа клеточных параметров позволяют в автоматическом режиме исследовать динамические процессы в клетках, не нарушая при этом оптимальных параметров инкубирования. Исследователь может в любой момент оценить состояние культуры и сделать снимок, либо задать протокол анализа, по которому система автоматически будет снимать отмеченные лунки или области чашки/флакона через заданный временной интервал и сохранять изображения на собственный сервер. Подобные системы идеально подходят для ведения долгосрочных экспериментов с непрерывным мониторингом и съемкой фазово-контрастных и флуоресцентных изображений, а также для быстрого многопараметрического скрининга. Все данные сохраняются на сервере вместе с параметрами инкубирования на момент съемки, и могут быть доступны в любое время, в том числе удаленно. Удобно также вести пок кадровую документацию и снимать в автоматическом режиме time-lapse ролики изменения клеточной морфологии, миграции, дифференцировки стволовых клеток, изменения экспрессии генов, образования колоний и прочие динамические эксперименты по заданному протоколу без необходимости постоянного присутствия исследователя в лаборатории. Современные приложения для обработки изображений позволяют быстро и точно обрабатывать серии снимков и представлять результаты экспериментов в удобной форме графиков, диаграмм или таблиц для статистического анализа.

IonFlux

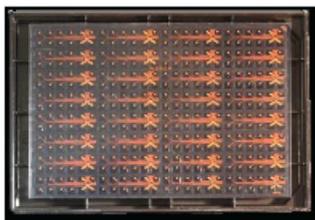
Исследование ионных каналов без компромиссов

Автоматизированная система на основе метода patch-clamp



Patch-clamp еще никогда не был проще

Система IonFlux сочетает в себе непревзойденное качество метода patch-clamp и простоту планшетного ридера



Технология микрожидкостного потока обеспечивает:

- Гигаомный контакт
- Быстрые добавление и смену среды
- Исследование до 256 компонентов на планшете
- Длительные эксперименты



ООО «БиоВитрум»
Россия, г. СанктПетербург
Тел./факс: (812) 3050606
info@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум М»
Россия, г. Москва,
Тел./факс: (495) 7874046
moscow@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрумСибирь»
Россия, г.Новосибирск,
Тел./факс: (383) 2304900
sibir@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрумЮг»
Россия, г. РостовнаДону
Тел./факс: +7 (863) 2550305
garegin.khachaturyan@biovitrum.ru

Рамановское картирование: все тайны жизни перед Вашими глазами

Рамановское изображение фрагмента
нематоды (круглый червь)

5 МКМ

**От простейших организмов,
до сложных заболеваний
человека**

Детальная визуализация с технологией
StreamLine™ от Renishaw

Без использования маркеров!

www.renishaw.ru/raman

ПРИМЕНЕНИЕ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПЕРЕХОДОВ КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ, ОТСЛЕЖИВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ *IN VIVO* И *IN VITRO*, А ТАКЖЕ ЦЕЛЕВОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОПУХОЛИ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ

Понкратов К.В.

ООО «Ренишоу», Москва, Россия
e-mail: kirill.ponkratov@renishaw.com

Рамановская спектроскопия — метод колебательной спектроскопии. Этот способ анализа вещества универсален, не требует введения маркеров, позволяет проводить их идентификацию, а также визуализацию структуры на основе различий в получаемых спектрах. Применение этого метода в биологических исследованиях во всем мире неуклонно растет. И клеточная биология — не исключение. Метод позволяет идентифицировать и сравнивать различные типы клеток на основе их молекулярного состава; анализировать распределение биомолекул и органелл в клетке с субмикронным разрешением, определяя их размер, расположение и полярность в зависимости от стволовости; проводить неинвазивный анализ живых клеток и организмов, в том числе животных, включая использование поверхностного усиления рамановского сигнала (SERS).

Один из примеров использования метода — изучение стволовых клеток до и после дифференцировки в различных направлениях. Обнаружена значительная разница в рамановских спектрах ядер дифференцированных и недифференцированных клеток, что может отражать их эпигенетические изменения. Второй пример — сравнение живых индуцированных плюрипотентных клеток с эмбриональными стволовыми клетками. Установлено, что до дифференцировки их спектры близки. Однако разница между дифференцированными hESC и iPSC оказалась значительной. Хемометрически выявлено, что iPSC ближе по спектру к hESC, чем дифференцированные hESC. Еще один пример — выявление имплантированных стволовых клеток и тератом *in vitro* и *in vivo*. Для визуализации использовались специфические меченые наночастицы, обладающие SERS-активностью. Дифференцированные в условиях *in vitro* ESCs подкожно вводились живой мыши и вызывали развитие тератомы. Наночастицы вводились в хвостовую вену мыши. Через кожу были получены спектры всех трех зародышевых слоев опухоли. Небольшой сигнал наблюдался и от печени, где наночастицы скапливались, будучи чужеродным веществом. Приведены примеры визуализации наночастиц, введенных в клетку с целью изучения возможности доставки лекарственных препаратов в опухоли.

Интерактивный
многофункциональный
микроскоп для инкубатора
IncuCyte



Технологии
для клеточных
исследований

Лазерный
флуоресцентный
планшетный микроскоп
Acumen



Компания QuadroS-Bio
8 (495) 981 80 35
info@quadosbio.ru
www.quadosbio.ru



Иновационная
система
для хранения образцов
в парах азота

C+ CRYO SYSTEM

Технологии
для хранения
клеточных
культур

Автоматизированная
система хранения
биологических образцов

SmartFreezer
-196°C



QVADROS  *Bio*

INCUCYTE ZOOM — НЕЗАВИСИМАЯ TIME-LAPSE ВИЗУАЛИЗАЦИЯ 2D И 3D КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР. ЛЮБЫЕ КЛЕТКИ, ЛЮБОЙ ПЛАСТИК, ЛЮБЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Струкова Л.А.

ООО Квадрос-Био, Москва, Россия

e-mail: las@qvadrosbio.ru

Для полноценного анализа клеточных культур требуется оборудование, которое позволяет следить за их ростом в динамике (time-lapse анализ, с заданной периодичностью). При этом желательно иметь возможность получения качественных изображений и экспорта видеофайлов. Обычно за культурами наблюдают с помощью настольных микроскопов, при этом клетки каждый раз приходится вынимать из инкубатора, подвергать температурным изменениям и тряске, определять то же место, которое анализировали в прошлый раз. Климатические камеры современных микроскопов решают эту проблему, но, как правило, эксперименты длительностью более трех дней на таком оборудовании не проводят. Несомненно, есть скрининговые приборы, которые могут поддерживать как режимы температуры и влажности, так и заданную концентрацию газов, однако они обладают низкой пропускной способностью (1-2 планшета, как правило, только планшетный формат). Компания “Квадрос-Био” представляет в России полностью автоматизированный микроскоп для инкубатора IncuCyte Zoom, который помещается в стандартный клеточный инкубатор, обладает высокой вместимостью пластика различного вида, автоматически фокусируется и делает снимки с заданной периодичностью, обрабатывает информацию и выдает графические результаты. За экспериментами можно наблюдать в режиме реального времени удаленно по локальной сети, а не в тесном клеточном блоке. Прибор устанавливают на нижнюю полку инкубатора, культивационный пластик помещают на выдвижной столик с подставками для различного формата емкостей, задают программу сканирования и обработки данных — и все остальное прибор делает сам.

У IncuCyte Zoom есть возможности фазово-контрастной и флуоресцентной съемки. В перечень исследований, проводимых с помощью IncuCyte Zoom, входят оценка пролиферативного потенциала, наблюдение за процессами цитотоксичности, апоптоза, дифференцировки стволовых клеток, формирования колоний, активации репортерных генов, миграции и инвазии, ангио- и нейрогенеза и др. Популярное направление исследований 3D — культур, моделирующих ткани, расширяет возможности регенеративной медицины и тестирования химических веществ. Используя IncuCyte Zoom, можно следить за формированием 3D культур с момента посева клеток. Прибор с заданной периодичностью получает изображения сфероидов, обчисляет размеры и интенсивность флуоресцентного свечения.

Результаты легко экспортируются в различных форматах, изображения и графики можно перенести кнопкой компьютерной мыши, например, в текстовый документ или программы для создания презентаций. Из любой серии снимков можно получить видеозапись.

Специальные устройства и программные модули в комплектации IncuCyte Zoom упрощают клеточный анализ, минимизируя затраты времени и внимания исследователя.



GE Healthcare
Life Sciences



ООО «Аламед» –
официальный дистрибьютер
GE Healthcare

Красновармейская ул., д. 2 стр. 4
Москва 125167 Россия
Т +7 (495) 614 45 97
www.alamed.ru

IN Cell Analyzer 2200

Автоматизированная система
для мультипараметрического
клеточного анализа



- Широкоформатная CMOS камера – 5.5Mp scientific-grade 16-bit
- Источник света – светодиод с усиливающим люминофором
- Объективы-автоматизированные; широкий выбор(2x-100x); визуализация целых лунок
- Режим предварительного просмотра выбранной области на любом увеличении (увеличение скорости сканирования за счет элиминирования нежелательных участков визуализации)
- Деконволюция – опция улучшения изображения даже с утолщенными образцами, например, срезы тканей
- Режим ручного микроскопа – изменение параметров вручную в режиме реального времени
- Визуализация слайдов в режиме предварительного просмотра – локализация региона интереса до перехода на большие увеличения
- 3 режима проходящего света – микроскопия светлого поля, фазово-контрастная микроскопия и ДИК для анализа живых клеток

Системы для электрофизиологических исследований от компании Axion BioSystems (США) – in vitro исследования на уровне нескольких клеток.

Доклинический скрининг лекарственных средств, фенотипирование моделей заболеваний и исследования стволовых клеток.



Система DEPArray - уникальная разработка компании Silicon Biosystems (Италия) для идентификации, сортировки и выделения чистых одиночных клеток. Изучение циркулирующих опухолевых клеток, опухолевого инфильтрата, стволовых клеток, клеток плода, Т-клеток.

Микроскопы-цитофлуориметры Amnis (США) – уникальная комбинация возможностей проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии для клеточных исследований. Визуализация каждой клетки.



ООО «БиоГен-Аналитика»
+7 (499) 704 62 44; +7 (495) 220 94 85
84997046244@bga.su
www.bga.su

www.bga.su

Все для молекулярной биологии



Оборудование



Реактивы



Расходные
материалы

Геномика

Протеомика

Клеточная
биология

ООО «Компания Хеликон»
+7 (499) 705-50-50
helicon.ru

helicon

Список участников

Аверьянов Александр Вячеславович	averyanovav@mail.ru
Александрова Мария Анатольевна	mariaaleks@inbox.ru
Алямкина Екатерина Анатольевна	alamkina@gmail.com
Артемьева Людмила Владимировна	vam@niboch.nsc.ru
Ахмадеева Жансая Тулеевна	zhans_86@mail.ru
Богачев Сергей Станиславович	labmolbiol@mail.ru
Бондаренко Наталья Анатольевна	bond802888@yandex.ru
Борисов Александр Геннадьевич	2410454@mail.ru
Бухарова Татьяна Борисовна	bukharova-rmt@yandex.ru
Ведунова Мария Валерьевна	MVEDunova@yandex.ru
Вечкапова Светлана Олеговна	svetavech@yandex.ru
Вялкова Анна Викторовна	anna.vyalkova@gmail.com
Глазко Татьяна Теодоровна	vglazko@yahoo.com
Глазунова Светлана Андреевна	svetlana.glazunova@thermofisher.com
Готье Сергей Владимирович	transplant2009@mail.ru
Данилкович Наталья Николаевна	nndanilkovich@gmail.com
Дашинимаев Эрдэм Баирович	dashinimaev@gmail.com
Деев Роман Вадимович	romdey@gmail.com
Дементьева Елена Вячеславовна	dementyeva@bionet.nsc.ru
Дергилев Константин Владимирович	doctorkote@gmail.com
Долгова Евгения Владимировна	zhenk123@mail.ru
Жылкыбаев Асылбек Айтанулы	askokshe@mail.ru
Зайдман Алла Михайловна	AZaydman@niito.ru
Закиян Сурен Минасович	zakian@bionet.nsc.ru
Захарова Ирина Сергеевна	zakharova.is@gmail.com
Карпова Галина Георгиевна	karpova@niboch.nsc.ru
Карр Ксения Сергеевна (Carr K.)	kсениya.carr@promega.com
Козлов Владимир Александрович	vakoz40@yandex.ru
Колесников Николай Николаевич	kolesnikovnn@mcb.nsc.ru
Колосова Наталия Гориславовна	kolosova@bionet.nsc.ru
Куликов Александр Владимирович	kulikov@iteb.ru
Кутлиева Гузаль Джуманиязовна	aziz0761@gmail.com
Лебедев Игорь Николаевич	igor.lebedev@medgenetics.ru
Луговский Владимир Андреевич	vladimirlugovskij@yandex.ru
Лыков Александр Петрович	aplykov2@mail.ru
Макаревич Павел Игоревич	pavel.makarevich@gmail.com
Макаров Сергей Владимирович	samara-cm@mail.ru
Матвеев Андрей Леонидович	guterus@gmail.com
Медведев Сергей Петрович	medvedev@bionet.nsc.ru
Минкевич Александра Михайловна	aaalex13@yandex.ru
Муслимов Сагит Асхатович	msagit@mail.ru

Надточенко Виктор Андреевич	nadtochenko@gmail.com
Назаркина Жанна Константиновна	zha_naz@niboch.nsc.ru
Немудрый Артем Александрович	nemudryy@bionet.nsc.ru
Никитин Владимир Афанасьевич	vnikitin2001@rambler.ru
Никонорова Юлия Владимировна	jnunik@mail.ru
Нуштаева Анна Андреевна	nushtaeva.anna@gmail.com
Ожаровская Татьяна Андреевна	bu.bulo4ka@gmail.com
Плакса Игорь Леонидович	i.plaksa2014@yandex.ru
Понкратов Кирилл Владимирович	kirill.ponkratov@renishaw.com
Пономарёв Игорь Владимирович	iponomarev@fzmb.de
Попова Ирина Владимировна	popovairnavladim@mail.ru
Родина Алла Валерьевна	rodina.allav@gmail.com
Розанова Ирина Аркадьевна	arir@ngs.ru
Романов Юрий Аскольдович	romanov@cryocenter.ru
Рябов Сергей Иванович	sir1601@mail.ru
Савилова Анастасия Михайловна	a_savilova@oparina4.ru
Садовой Михаил Анатольевич	niito@niito.ru
Сакаева Галия Ратмировна	galia.nsu@gmail.com
Салахутдинов Нариман Фаридович	anvar@nioch.nsc.ru
Сарсенова Мадина Арыстановна	sarsenova_madina93@mail.ru
Сахарнова Татьяна Александровна	saHarnova87@mail.ru
Свердлов Евгений Давидович	edsverd@gmail.com
Свиридова Ирина Константиновна	prognoz.06@mail.ru
Сенников Сергей Витальевич	sennikov_sv@mail.ru
Сергеевичев Давид Сергеевич	d_sergeevichev@meshalkin.ru
Сидоренко Ольга Евгеньевна	olga.sidorenko@biovitrum.ru
Степанова Алёна Олеговна	lebedeva@niboch.nsc.ru
Струкова Лидия Александровна	las@qvadrosbio.ru
Сульдина Любовь Александровна	suldinalubov@gmail.com
Сундер Рмасуббу (Sunder R.)	rs@biss.in
Ткаченко Татьяна Александровна	vadanyata@mail.ru
Ткачук Всеволод Арсеньевич	secretary@fbm.msu.ru
Умбаев Бауыржан Айтжанович	bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz
Уфимцева Елена Геннадьевна	ufim1@ngs.ru
Христин Александр Александрович	AAlex.Khristin@gmail.com
Чепелева Елена Васильевна	amareza@mail.ru
Черных Елена Рэмовна	ct_lab@mail.ru
Чернявский Александр Михайлович	amchern@mail.ru
Шаров Михаил Андреевич	scharovm1990@yandex.ru
Шевела Екатерина Яковлевна	ct_lab@mail.ru
Янцен Юлия Ивановна	yantsen@nu.edu.kz

Авторский указатель

Айбуш А.	51
Александрова М.А.	14
Алямкина Е.А.	46, 57, 68, 72
Андрушкевич О.М.	46, 72
Антонец Д.В.	47
Антонов Е.Н.	89
Артемьева Л.В.	58, 59
Артюхов А.С.	55
Архипова Л.В.	30
Аскарова Ш.Н.	85, 92
Астафьев А.	51
Афанасьев С.А.	60
Ахмадеева Ж.Т.	88
Ахмедов Ш.Д.	60
Ахмедова С.А.	41, 80
Бажан С.И.	47
Байбородин С.И.	46, 57, 72
Байрамова С.А.	20, 65
Баторов Е.В.	25
Белан Е.А.	88
Берсимбаев Р.И.	69
Блинова Д.Д.	93
Богачев С.С.	46, 57, 68, 72
Большаков А.П.	55
Бондаренко Н.А.	40, 62, 70, 74
Борисов А.Г.	63
Боярских У.А.	24
Бритаев Т.А.	41
Буланин Д.С.	92
Бухарова Т.Б.	89
Васильев А.В.	55
Васькова Е.А.	73, 82
Ведунова М.В.	52, 79
Верещагин К.	51
Вечкапова С.О.	64
Вихрова Е.Б.	89
Вицин А.Е.	24
Власов В.В.	47
Волков А.В.	89
Вялкова А.В.	20, 65
Гаврилова Е.В.	24

Герасимов А.В.	45, 76
Глазко В.И.	44
Глазко Т.Т.	44
Глазунова С.А.	66
Гольдштейн Д.В.	89
Гончаров М.А.	24
Гордеева М.Н.	29
Гостев Ф.	51
Григорьев Т.Е.	37
Григорьева Е.В.	20, 65
Гринь А.А.	27
Гуляева Л.Ф.	45, 76
Давыденко С.В.	83
Данилкович Н.Н.	90
Данлыбаева Г.А.	88
Дашинимаев Э.Б.	55
Дгебуадзе П.Ю.	41
Деев Р.В.	15, 53
Дементьева Е.В.	20, 65
Демьянова А.Ю.	38
Дергилев К.В.	67, 71
Деркачев В.С.	90
Докучаева А.А.	31
Долгова Е.В.	46, 57, 68, 72
Дугина Т.Н.	26
Дударев А.Н.	83
Елисафенко Е.А.	20, 65
Еникеева З.М.	91
Ефремов Я.Р.	46, 57, 59, 68, 72
Живень М.К.	21
Жылкибаев А.А.	69, 88
Завьялов Е.Л.	46
Загребельный С.Н.	68
Зайдман А.М.	34
Закиян С.М.	12, 20, 21, 36, 39, 65, 73, 82
Залесский А.	51
Запара Т.А.	64
Захарова И.С.	21, 39
Звягинцева М.А.	27
Зотова Н.С.	26
Иванисенко В.А.	20
Иванисенко Н.В.	20
Иванова Л.Н.	21
Игнатенко С.И.	90

Идрисова Д.	85
Ильичев А.А.	47
Исаев А.А.	15, 53
Казацкая Ж.А.	94
Караськов А.М.	20, 21, 36, 40
Карпенко А.А.	21, 39, 40
Карпенко Л.И.	47
Карпова Г.Г.	11
Кафанова М.Ю.	23
Кашеварова А.А.	43
Ким И.И.	62
Кирсанова В.А.	41, 80
Киселева Е.В.	82
Коваль О.А.	45, 76
Козел А.В.	46, 72
Козлов В.А.	13, 24, 63
Колесников Н.Н.	17
Колосова Н.Г.	19
Комлев В.С.	41
Коненков В.И.	40, 62, 70, 74
Космачева С.М.	90
Косовский Г.Ю.	44
Крючкова И.В.	25
Кувшинова Е.А.	80
Кузнецова М.С.	93
Кулигина Е.В.	45, 76
Куликов А.В.	30
Куликов Д.А.	30
Куликова Е.В.	24
Куликова П.А.	30
Куприна Н.Ю.	15
Курилин В.В.	24, 93
Кутлиева Г.Д.	91
Лактионов П.П.	31, 38, 39, 47
Ларин В.Т.	51
Ларионов В.Л.	15
Лебедев И.Н.	43
Лисковых М.А.	15
Лопатникова Ю.А.	24
Лотков А.И.	58
Луговский В.А.	60
Лыков А.П.	40, 62, 70, 74
Лысенко А.А.	75
Макаревич П.И.	67, 71

Максютов А.З.	24
Максютов Р.А.	24
Маланханова Т.Б.	73
Малахова А.А.	36
Мальчевский Ю.Е.	63
Матвеев А.Л.	58
Матвеева В.А.	58, 59
Матвеева Н.М.	43
Медведев С.П.	12, 20, 65, 73
Мейснер Л.Л.	58
Мензоров А.Г.	43
Милевская Е.А.	36
Минаева С.А.	89
Минкевич А.М.	46, 57, 72
Миралимова Ш.М.	91
Мирошниченко С.М.	83
Митрошина Е.В.	52, 79
Мишинов Е.В.	46
Морозов В.В.	59
Морозова Е.А.	64
Москалева Е.Ю.	37
Мурата Х.	85
Мухина И.В.	52, 79
Наврузов С.Н.	91
Надточенко В.А.	51
Назаренко Л.П.	43
Назаркина Ж.К.	47
Немудрый А.А.	73
Никитин В.А.	50, 51
Николин В.П.	46, 57, 68, 72
Никонорова Ю.В.	40, 70, 74
Новиков В.В.	94
Новиков Д.В.	94
Новожилова Н.М.	66
Нуштаева А.А.	45, 76
Облеухова И.А.	24
Овсянникова Т.В.	59
Огай В.Б.	77
Огай Д.К.	91
Ожаровская Т.А.	75
Олжаев Ф.С.	85
Омигов В.В.	46, 57, 68, 72
Останин А.А.	23, 25, 46, 57, 63, 68, 72
Павлова С.В.	36, 82

Павлович Е.Р.	27
Пазилин А.С.	66
Парфенова Е.В.	67, 71
Печенкина А.Ю.	83
Плакса И.Л.	53
Повещенко А.Ф.	62, 70
Повещенко О.В.	40, 62, 70, 74
Подхватилина Н.А.	36, 40
Покушалов Е.А.	20, 21, 36, 39, 62, 65
Понкратов К.В.	99
Пономарёв И.В.	32
Пономарцев С.В.	15
Попов А.А.	41
Попов В.К.	89
Попова Ж.Ю.	59
Попова И.В.	39
Попова Н.А.	46, 57, 68, 72
Просвирнин А.В.	27
Проскура А.Л.	64
Проскурина А.С.	46, 57, 68, 72
Псахье С.Г.	58
Радаев С.М.	26
Рамазанов Ж.К.	88
Рассел А.	85
Ратушняк А.С.	64
Ребенкова М.	60
Ризванов А.А.	15
Рихтер В.А.	45, 76
Рогачев В.А.	46, 72
Роговская Ю.В.	60
Родина А.В.	37
Розанова И.А.	40
Ройтер Т.	32
Романов А.Б.	62
Романов Ю.А.	26
Ромащенко А.В.	46
Русакова Я.Л.	36
Рылова Ю.В.	29
Рябов С.И.	27
Ряскина С.С.	26
Саая Ш.Б.	21
Савилова А.М.	29
Савченко А.А.	63
Сакаева Г.Р.	45, 76

Салахутдинов Н.Ф.	18
Сарбасов Д.Д.	69
Сарсенова М.А.	77
Сахарнова Т.А.	52, 79
Сахно Л.В.	23
Свиридова И.К.	41, 80
Северин С.Е.	37
Сенников С.В.	24, 93
Сергеева Н.С.	41, 80
Сергеевичев Д.С.	31, 36, 39, 40
Сергеевичева В.В.	31
Серов О.Л.	43
Сидоренко О.Е.	96
Сидоров С.В.	24
Скрябин Н.А.	43
Смирнов В.А.	27
Смирнов В.Н.	26, 27
Смирнова Г.Н.	30
Смирнова С.В.	63
Соколов А.В.	24
Соловьева В.В.	15
Старостина И.Г.	15
Стекленева А.Е.	73, 82
Степанова А.О.	38, 39
Струкова Л.А.	102
Ступак В.В.	46
Сульдина Л.А.	82
Сусликов А.В.	30
Сухих Г.Г.	20, 21, 26, 36
Тараканов О.П.	26
Таранов О.С.	46, 57, 68, 72
Тархов А.В.	24
Тенчурин Т.Х.	37
Тетерина А.Ю.	41
Тетрашвили Н.К.	29
Тихонова М.А.	23
Ткаченко Т.А.	83
Толстикова Т.Г.	64
Томилин А.Н.	15
Тыринова Т.В.	46
Укбаева Т.Д.	77
Умбаев Б.А.	85, 92
Усынин И.Ф.	83
Уфимцева Е.Г.	48, 84
	114

Фалалеева С.А.	93
Фесенко Е.Е.	50
Филипенко М.Л.	24
Харькова М.В.	47
Хоменко А.Ю.	37
Храпов Е.А.	24
Христин А.А.	24, 93
Цой А.К.	92
Цоколаева З.И.	67, 71
Чвалун С.Н.	37
Чекалина М.В.	59
Чепелева Е.В.	36
Черных Е.Р.	23, 25, 46, 57, 63, 68, 72
Чехонин В.П.	27
Чечеткина Н.Н.	43
Чулкина М.М.	29
Шалахметова Т.М.	92
Шанский Я.Д.	41, 80
Шаров М.А.	94
Шахов А.	51
Шашков Е.	51
Шевела Е.Я.	23, 25, 46
Шевченко А.И.	20, 21, 34, 39, 65
Шевченко Ю.А.	24, 93
Шишкина Т.В.	79
Шульца Э.Э.	64
Шурдов М.А.	46, 57, 68, 72
Щелкунова Е.И.	34
Элова Н.А.	91
Эль-Регистан Г.И.	94
Юрьева К.С.	15
Янцен Ю.И.	85
Сагг К.	86
Курчо К.Р.	86
Lazar D.F.	86
Niles A.L.	86
Riss T.L.	86
Sunder R.	49
Valley M.P.	86
Wynn A.	49
Zimprich C.A.	86