

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,  
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА ШКОЛУ-КОНФЕРЕНЦИЮ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ»**

**(Санкт-Петербург, 17—21 октября 2011 г.)**

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА.**  
© Н. Г. Антонец, <sup>1</sup> З. Б. Квачева, <sup>1</sup> В. Л. Чекал, <sup>2</sup> Е. С. Лобанок, <sup>3</sup> С. В. Корень, <sup>1</sup> Ю. А. Кабанова. <sup>1</sup> ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» МЗ РБ, <sup>2</sup> ГУО Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования и <sup>3</sup> ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Белоруссии», Минск.

Обонятельная выстилка (ОВ) является достаточно доступным источником, из которого могут быть получены культуры стволовых и прогениторных нейральных клеток для применения их в заместительной клеточной терапии. На данный момент не существует единого протокола выделения и приготовления культур клеток ОВ человека. Имеющиеся методики выделения и культивирования клеток не всегда воспроизводимы и имеют ряд недостатков. В связи с этим целью данного исследования явилась оптимизация условий выделения и накопления биомассы клеток ОВ в условиях культуры. Нами была избрана стратегия получения культур клеток из биоптатов ОВ области верхних и средних носовых раковин человека без направленного выделения определенных типов клеток при получении первичной культуры. Основой разработанного протокола получения культур клеток ОВ стала методика Roisen et al. (2001). Образцы ткани подвергали ферментативной обработке смесью 0.5%-ного раствора диспазы и 0.5%-ного раствора коллагеназы в течение 30 мин. Выделенные клетки культивировали в пластиковых культуральных флаконах в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в ростовой среде DMEM/F12 с добавлением 10 % сыворотки эмбрионов коров. Оценку роста и морфологии культур клеток проводили как прижизненно с использованием фазово-контрастной микроскопии, так и на окрашенных гематоксилин-эозином препаратах. Фенотипирование клеток проводили косвенным методом флуоресцирующих антител с использованием моно- и поликлональных антител к глиальному фибриллярному белку (ГФКБ), цитокератину 18, фибронектину и нестину. При наблюдении за культурами отмечено формирование монослоя клеток ОВ в течение 10—14 дней. Морфологический состав клеток представлен в основном двумя типами: крупными эпителиоподобными клетками с маленьким ядром и одним-двумя ядрышками; клетками небольших размеров полигональной формы с длинными веретеновидными

отростками и крупным ядром, морфологически сходными с глиальной клетками. Имелись очаги роста фибробластоподобных клеток. Выявлена популяция клеток, формирующая флотирующие структуры в виде сфер. В монослое отмечено появление очагов быстро делящихся клеток, единичные из которых или их кластеры с течением времени отделялись от поверхности культурального флакона и далее пролиферировали в суспензии, также давая начало сферам. Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей о том, что клетки-родоначальники сфер могут представлять собой пул нейральных стволовых и прогениторных клеток ОВ человека. В течение роста клеток в культуре отмечено установление равновесной системы из монослойной и суспензионной частей. При отдельном культивировании клеток сфер наблюдали снижение степени их пролиферации в субпассажах, что подтверждает зависимость их функциональной активности от присутствия монослойной части. В результате фенотипирования популяции культивируемых клеток выявлены ГФКБ-, цитокератин 18-, фибронектин- и нестин-положительные клетки. Эти данные свидетельствуют о присутствии в культурах клеток глиальной природы, клеток-предшественников эпителия и фибробластов. Наличие стволовых и прогениторных нейральных клеток было характерно для флотирующих сфер. Таким образом, разработана технология накопления биомассы клеток *in vitro* ОВ человека, основой которой является равновесное существование двух систем клеток — в монослое и суспензии, позволяющих получать гетерогенную популяцию клеток разной степени дифференцировки. Возможность выделения и накопления в условиях культуры биомассы нейральных стволовых и прогениторных клеток из ОВ является основой для дальнейшей разработки протоколов лечения при травматических повреждениях и дегенеративных заболеваниях ЦНС путем трансплантации аутологичного клеточного материала.

**ОЛФАКТМЕДИНСОДЕРЖАЩИЙ БЕЛОК МОРСКИХ ЕЖЕЙ *STRONGYLOCENTROTUS NUDUS* ВЛИЯЕТ НА СВОЙСТВА НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ.** © А. А. Астахова, <sup>1</sup> Н. П. Токмакова, <sup>2</sup> И. А. Кирсанова, <sup>2</sup> А. П. Анисимов, <sup>2</sup> А. В. Щерблыкина, <sup>1</sup> Н. Е. Зюмченко, <sup>2</sup> П. В. Мищенко, <sup>2</sup> Ю. С. Хотимченко, <sup>1,2</sup> В. В. Кумейко. <sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского РАН и <sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет, Владивосток.

Теоретические и прикладные исследования процессов морфогенеза тканей требуют использования веществ, в первую очередь белков, способных индуцировать различные процессы в клетках: стимулировать пролиферацию, поддерживать выживание, способствовать или препятствовать дифференцировке клеток в определенном направлении. Ольфактомединосодержащие белки (или колмедины), относящиеся к коллагенам II типа, представлены в низких концентрациях в нервной ткани позвоночных. Особенностью таких биополимеров является наличие спиральной части — коллагенового домена — и ольфактомединового домена, названного в честь первого белка, в котором эта структура была выявлена. Основные представители группы колмединов экспрессируются и присутствуют в структурах нервной системы позвоночных. Для некоторых из них показана специфическая роль в индукции различных процессов в развивающейся ткани: стимуляция или, наоборот, подавление экспансии клеток развивающихся нервных структур, индукция дифференцировки клеток-предшественников в определенные типы и т. д.

Ранее из целомической жидкости морских ежей *Strongylocentrotus purpuratus* был выделен единственный ольфактомединосодержащий белок с «нейтральными» функциями. Однако в дальнейшем было показано, что транскрипты гена амассина обнаруживаются в элементах нервной системы этих животных (Hillier, Vacquier, 2003).

Целью данной работы являлось исследование возможности влияния амассина на клетки эмбриональной нервной ткани млекопитающих.

Амассин выделяли из целомической жидкости морских ежей *S. nudus* (зал. Петра Великого, Приморский край) в соответствии с методикой, указанной для *S. purpuratus*, с некоторыми модификациями (Hillier, Vacquier, 2003). Профиль элюции, полученный в результате фракционирования белков методом ионообменной хроматографии на DEAE-Sepharose, а также результаты электрофоретического анализа (электрофорез по Лэммли, а также нативный электрофорез) выделенных фракций показали соответствие полученного нами препарата амассину, выделенному из *S. purpuratus*.

Препарат амассина был использован в качестве однокомпонентной подложки для культивирования нейральных стволовых клеток ventральной области среднего мозга эмбрионов крыс (E14). Амассин наносили на поверхность оптического стекла в концентрациях 10 и 50 мкг/мл. Для предварительной оценки влияния белка подсчитывали количество нейросфер различной морфологии на разных субстратах (экспериментальных и контрольных).

На основании полученных данных были сделаны следующие выводы: амассин способствует экспансии недифференцированных клеток эмбрионального мозга крыс, увеличивая в культуре в 3—6 раз общее число нейросфер различной морфологии. Препарат амассина, использованный в качестве однокомпонентной матрицы, способствует поддержанию пролиферативного потенциала культуры нервных стволовых клеток, сохраняя значительное количество нейросфер даже на 10-е сут культивирования в питательной среде с низкой концентрацией ростовых факторов.

Таким образом, получены предварительные результаты, демонстрирующие возможность применения амассина для культивирования нейральных стволовых клеток млекопитающих; показана целесообразность продолже-

ния исследований амассина как перспективного фактора для поддержания нейрогенных культур млекопитающих.

ВЛИЯНИЕ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В НЕГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ТКАНЯХ  
© В. В. Базарный, А. И. Исайкин, Н. С. Киселев, Н. Б. Крохина. Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург.

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) — полифункциональная молекула, основная функция которой связана с регуляцией продукции и созревания миелоидных клеток. Вместе с тем в последние годы показаны и негемопоэтические эффекты данного ростового фактора. Однако они являются фрагментарными и нередко противоречивыми. Между тем, хотя Г-КСФ уже и используется в клинической практике, ряд механизмов его действия требует детализации.

Цель исследования заключалась в оценке влияния Г-КСФ на репаративные процессы в тканях с различными типами индуцированной регенерации — в костной ткани и миокарде.

Исследование проведено на 48 крысах-самцах породы Вистар. Для моделирования изучения посттравматического репаративного остеогенеза выполняли резекцию фрагмента большеберцовой кости. В другой группе животных воспроизводили острую ишемию миокарда путем внутримиокардиального введения раствора адреналина. Развитие острого инфаркта у крыс было доказано морфологически, электрокардиографически и подтверждено биохимическими критериями (креатинфосфокиназа). Течение репаративных процессов оценивали в гистологических препаратах с использованием компьютерной морфометрии.

В каждой группе животных выделяли две подгруппы — контрольную и основную; в последней крысам вводили трехкратно препарат Г-КСФ — нейпоген (филграстим, Roche) — в дозе 50 мкг на 1 животное. Все манипуляции с животными проводили с соблюдением правил асептики и гуманного обращения с животными. Статистическую обработку результатов выполняли на основе принципов вариационной статистики с использованием непараметрических критериев.

Индукцированный остеогенез у животных контрольной группы протекал в соответствии с известной морфологической картиной. В частности, к 10 сут в области костных отломков снижалась активность воспалительной реакции, а в соединительнотканной зоне регенерата отмечалась пролиферация фибробластов, хондробластов и остеобластов. Под влиянием Г-КСФ выраженность воспалительной реакции оставалась достаточно заметной. В регенерате была высока пролиферация хондробластов и фибробластов, а периостальный остеогенез осуществлялся лишь перихондральным способом с умеренной пролиферацией остеобластов и увеличением количества остеокластов. Таким образом, Г-КСФ тормозил репаративные процессы в костной ткани.

На модели экспериментального инфаркта миокарда введение нейпогена снижало некротические и дистрофические изменения в кардиомиоцитах, в более ранние сроки вызывало нормализацию микроциркуляции, что было доказано с использованием стандартных критериев (морфологическое исследование миокарда, ЭКГ и

уровень ферментов в крови), т. е. нами было установлено позитивное влияние Г-КСФ на восстановительные процессы в сердечной мышце в постинфарктном периоде.

Таким образом, Г-КСФ способен модулировать регенераторный потенциал различных тканей.

**ПОИСК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ ВОЗРАСТНОЙ ИНВОЛЮЦИИ ВЫСОКОСПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА** © М. В. Балужева, И. Р. Валиева, О. О. Молостова, И. В. Гаврилов, В. Н. Мещанинов. ГУЗ СО ИМКТ, ГОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития РФ и ГОУЗ СОКП Госпиталь для ветеранов войн, Екатеринбург.

На клеточном и субклеточном уровнях организации процесс старения проявляется в нарушении синтеза и секреции сигнальных молекул, в том числе продуцируемых высокоспециализированными клетками (Белоконь, 2005; Хавинсон и др., 2009). Существующие геропротекторные мероприятия малоэффективны в том числе и потому, что они не направлены на предотвращение угасания функций отдельных, в том числе высокоспециализированных, клеток нервной и эндокринной систем.

Цель работы — биохимические предикторы старения высокоспециализированных клеток нервной и эндокринной систем организма человека в крови: тиреотропный гормон (ТТГ), вырабатываемый тиротропоцитами аденогипофиза; (трийодтиронин)  $T_3$  и (тироксин)  $T_4$  — фолликулярными эндокриноцитами щитовидной железы; белок S-100 — клетками астроцитарной нейроглии (Траилин и др., 2009); нейротрофический фактор мозга (БДНФ) — фибробластами, астроцитами и нейронами.

В исследовании приняли участие 92 пациента, которые были разделены на 2 группы. Первую группу составили 73 человека зрелого возраста (средний возраст 41 год), вторую группу — 19 человек пожилого возраста (средний возраст 62 года). Критериями включения явилось наличие полиорганной патологии т. е. не менее 5 хронических заболеваний в стадии стойкой ремиссии. Критерии исключения — обострение хронических заболеваний, травмы, операции менее чем за 1 год до исследования, наличие опухолевых или инфекционных процессов, в том числе нервной или эндокринной природы. Иммуноферментный анализ крови проводили на Chem Well, Awareness Technology США наборами реагентов R&D (Англия). Скорость процессов старения оценивали по биологическому возрасту (по НИИ геронтологии АН Украины). Статистическая обработка проведена в Statistic 6.0.

Выявлена значительная отрицательная корреляционная взаимосвязь между биовозрастом и уровнем  $T_4$  ( $r = -0.658$ ), высокая положительная корреляция между биовозрастом и уровнем  $T_3$ , ( $r = 0.829$ ,  $p < 0.05$ ), что свидетельствует о снижении производства гормонально активными клетками щитовидной железы полноценного тироксина и заместительном усилении производства менее эффективного трийодтиронина. При этом секреция ТТГ оставалась на уровне пациентов зрелого возраста. Наблюдалась отрицательная умеренно выраженная корреляционная взаимосвязь между биологическим возрастом и содержанием в крови белка S-100 ( $r = -0.31$ ,  $p < 0.05$ ). Календарный возраст и БДНФ при этом не дали значимых и (или) достоверных корреляционных показателей с изучаемыми потенциальными предикторами старения. Обнаруженный клеточно-метаболический дисбаланс в системе

эндокриноцитов и нейроцитов внесет коррективы в существующие схемы лечения зависимых от возраста тиреоидных дисфункций в системе гипофиз—щитовидная железа и клеток астроглии.

**ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ c-kit+ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ В УСЛОВИЯХ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЧЕК.** © И. А. Брыкина. Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург.

S-kit (CD117) — это трансмембранный тирозинкиназный рецептор, взаимодействие которого с его лигандом, фактором стволовой клетки (SCF — stem cell factor), запускает процессы пролиферации, миграции и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, в последние годы начали появляться сообщения о роли c-kit/SCF рецептор-лигандной оси в регуляции репаративной регенерации почек (Stokman G., 2010). Известно, что данный рецептор экспрессируется некоторыми канальцевыми эпителиоцитами, образующими выстилку дистальных и проксимальных канальцев коркового вещества (Miliaras D., 2004). Анализ специфической локализации c-kit+ канальцев в почке наталкивает на мысль о том, что именно они формируют ростковые зоны в данном органе. Кроме того, установлено наличие синергетического эффекта в действии SCF и некоторых макрофагальных цитокинов, регулирующих регенерацию (Ren, 2009). Данный факт указывает на то, что c-kit+ клетки почек, а также стволовые клетки костного мозга, экспрессирующие данный антиген, могут рассматриваться как вероятная мишень для регуляторного влияния макрофагов при повреждении органа.

Таким образом, целью данной работы было изучить реакцию c-kit+ канальцевых эпителиоцитов и c-kit+ стволовых клеток костного мозга на повреждение почек в условиях нормального и ингибированного функционального состояний макрофагов.

Работу проводили на белых беспородных мышцах-самцах, разделенных на 4 группы: 1) интактные; 2) ложнопериоперированные; 3) мышцы, которым была проведена частичная левосторонняя нефрэктомия; 4) животные, которым за 2 ч до аналогичной операции вводил ингибитор макрофагов — каррагинан. Через 24 ч после воздействия на срезах поврежденной и оперированной почек методом иммуногистохимии идентифицировали макрофаги (anti-CD117a), пролиферирующие канальцевые эпителиоциты (anti-Ki-67) и клетки, экспрессирующие c-kit, подсчитывали их количество в 1 мм<sup>2</sup> ткани. Методом проточной цитофлуориметрии определяли содержание CD45<sup>low</sup>c-kit+Thy-1<sup>low</sup> гемопоэтических клеток-предшественников в костном мозге и периферической крови.

После частичной нефрэктомии наблюдается активация пролиферации канальцевых эпителиоцитов в оперированной и в симметричной почках, что сопровождается увеличением количества макрофагов. Отмечается рост числа c-kit+ канальцевых эпителиоцитов. Все перечисленные изменения выражены в большей степени в оперированной почке. Значительно увеличивается количество CD45<sup>low</sup>c-kit+Thy-1<sup>low</sup> клеток-предшественников в костном мозге и крови, что свидетельствует об интенсификации их пролиферации и миграции. При ингибировании функциональной активности макрофагов пролиферативные процессы в поврежденной почке значительно замед-

ляются, что происходит на фоне падения количества фагоцитирующих мононуклеаров в данном органе. Рост числа c-kit<sup>+</sup>-эпителиоцитов, вероятно, носит компенсаторный характер и связан со снижением функциональной активности макрофагов. Миграция макрофагов в правую почку и увеличение количества c-kit<sup>+</sup>-эпителиоцитов обеспечивают достаточно высокий уровень пролиферативных процессов в симметричном органе. При этом обнаруживается снижение количества CD45<sup>low</sup>c-kit<sup>+</sup>Thy-1<sup>low</sup> клеток-предшественников в костном мозге и крови, что может указывать на усиление их миграции к регенерирующим органам.

Таким образом, очевидно, что c-kit<sup>+</sup>-стволовые клетки костного мозга и эпителиоциты ростковой зоны почек принимают участие в репаративной регенерации органа, причем процессы активации c-kit<sup>+</sup>-клеток различной локализации в той или иной степени находятся под контролем макрофагов.

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ.** © В. А. Васильев, А. Ю. Курманова, В. Т. Какпаков. Всероссийский государственный научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко РАСХН, Москва.

Культивирование клеток медоносной пчелы *in vitro* является не решенной проблемой в мире. Ученые пытаются выделить культуру клеток из всевозможных органов и тканей медоносной пчелы, подбирают условия для длительного культивирования (Bergem, Norberg, 2006). В нашей работе ведется подбор оптимальной питательной среды для культивирования культуры клеток медоносной пчелы. В качестве добавки мы применяли маточное молочко и пыльцу для выявления их ростостимулирующего действия на культуру клеток насекомых. На первом этапе изучали диапазон концентраций маточного молочка и растворов обножки (пыльцы).

В качестве тест-культуры была использована постоянная линия клеток шинельной моли *Spodoptera frugiperda* SF9K-адаптированная к среде Какпакова С46 (Какпаков, Курманова, 2009). Критерием оценки клеточной тест-системы служили: лизис клетки, сокращение, сморщивание и отсутствие адгезии, вакуолизация, заметная грануляция цитоплазмы, определение количества мертвых клеток методом витальной окраски 0.04%-ным раствором трипанового синего (Методы культивирования клеток, 2008). В питательную среду добавляли эмбриональную бычью сыворотку фирмы NuClone (США). Изучали действие маточного молочка двух сортов: адсорбированное гранулированное ММБ1 ГОСТ Р 52680-2006 и адсорбированное сырое ММБ2 (получены от Л. А. Бурмировой (ВНИИ пчеловодства РАСХН, г. Рыбное). Маточное молочко имеет сложный химический состав и содержит многие легкоусвояемые питательные и биологически активные вещества. В состав маточного молочка входят аминокислоты (в том числе незаменимые), сахара, свободные жирные кислоты (деценовые, азелоиновая, пимелиновая и др., которые синтезируются только в организме пчелы) и фосфатиды (например, фракции липоидов, которая участвует в образовании и обновлении оболочки клетки). В опыте мы применили следующие концентрации маточного молочка 1, 0.1, 0.01, 0.001 и

0.0001 %. На 2-е сут после посева был зарегистрирован наибольший рост стимулирующий эффект в культурах клеток с добавлением 0.0001 % разведения маточного молочка (ММБ1), тогда как в контроле результаты были в 2 раза ниже. В опытах с сырым маточным молочком (ММБ2) ростостимулирующую активность показали концентрации 0.01 и 0.1 %.

В качестве следующей биологической добавки к питательной среде С46 мы использовали пыльцу, при этом было выявлено, что ростостимулирующей активностью обладает 1%-ный раствор пыльцы.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что ростостимулирующее действие на культуру клеток оказывают адсорбированное гранулированное маточное молочко ММБ1, адсорбированное сырое маточное молочко ММБ2, а также пыльца, что может быть использовано при подборе оптимального состава питательной среды, используемой для получения культуры клеток медоносной пчелы.

#### Список литературы

Bergem M., Norberg K. 2006. Long-term maintenance of *in vitro* cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. BMC Develop. Biol. 17.

Какпаков В. Т., Курманова А. Ю. 2009. Экологический апи-мониторинг. В кн.: Труды РУДН «Актуальные проблемы экологии и природопользования». М. Вып. 11: 84—86.

Методы культивирования клеток. 2008. Ред. Г. П. Пинаев, М. С. Богданова. СПб.: Изд-во Политехнич. ун-та. 118—135.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ОРТОТАНТАЛАТА ИТТРИЯ И СЕРЕБРА НА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА.** © М. С. Васильева, А. В. Коротков, О. Г. Макеев. ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий и ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, Екатеринбург.

Несмотря на то что наноматериалы в мире используются более 10 лет, до сих пор ни один вид не был изучен на биобезопасность в полном объеме. Имеющиеся данные о свойствах веществ в наноразмерном диапазоне свидетельствуют о необходимости коррекции традиционных подходов к оценке их токсичности, поскольку эффекты наночастиц зависят не столько от их химического состава, сколько от суммарной площади поверхности на границе раздела фаз.

Исследования на лабораторных животных продемонстрировали способность взвеси наночастиц ортотанталата иттрия (диаметр частиц 20—40 нм) более интенсивно поглощать рентгеновское излучение, чем известные рентгеноконтрастные вещества на основе соединений йода в сопоставимых концентрациях. Однако данные о биобезопасности ортотанталата иттрия, полученные *in vivo*, оказались малоинформативными не только в отношении эффектов на клеточном уровне, но и в прогнозировании возможных повреждений генома. Поэтому сформулированная цель исследования предусматривала оценку токсичности наночастиц ортотанталата иттрия на культивируемых клетках человека.

Объектом исследования служили культуры дермальных клеток пациентов 45—63 лет, хранящиеся в криобанке лаборатории. Для изучения возможного токсического

действия наночастиц изучали параметры митохондриального дыхания (посредством измерения суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ) и гликолиза (активность лактатдегидрогеназы). Генотоксичность оценивали с использованием анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК (ПДАФ) в нашей модификации. В качестве эталонной базы сравнения использовали наночастицы серебра, известные своей цитотоксичностью.

Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием наночастиц ортотанталата иттрия наблюдается некоторое снижение как оптической плотности культур, так и комплекса метаболических показателей, что позволяет предположить участие митохондриальных дегидрогеназ и гликолитических ферментов в реализации механизма неспецифического действия исследуемого вещества. Однако выявленная тенденция в пределах сроков совместного с частицами культивирования (8 сут) не является статистически значимой по сравнению с контролем. В то же время наночастицы серебра уже в 1е сут воздействия в сопоставимых концентрациях в значительной степени ингибируют энергетические процессы в дермальных клетках человека.

Результаты исследования фрагментации образцов ДНК культивируемых фибробластов продемонстрировали, что в контрольных культурах коэффициент фрагментации составил  $0.221 \pm 0.009$ . В культурах, содержащих ортотанталат иттрия, коэффициент фрагментации ДНК определен как  $0.234 \pm 0.008$  ( $p > 0.05$ ), что указывает на отсутствие повреждений ДНК под действием наночастиц ортотанталата иттрия. В то же время при воздействии наночастиц серебра фрагментация ДНК достоверно возрастает более чем в 2 раза (коэффициент фрагментации  $0.458 \pm 0.009$ ).

Таким образом, по сравнению с наночастицами серебра вся часть ортотанталата иттрия в применяемых диагностических концентрациях за двойной период их полувыведения из крови не оказывает существенного токсического и генотоксического действия на культивируемые фибробласты человека. Полученные результаты позволяют рассматривать частицы ортотанталата иттрия в наноразмерном диапазоне в качестве перспективного рентгеноконтрастного вещества.

**ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И СОСТОЯНИЯ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ТКАНИ АОРТЫ У БОЛЬНЫХ С АНЕВРИЗМОЙ ВОСХОДЯЩЕГО ОТДЕЛА АОРТЫ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ.** © И. В. Воронкина,<sup>1</sup> Л. В. Смагина,<sup>1</sup> О. Б. Иртыгога,<sup>2</sup> О. М. Моисеева.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург.

Патогенетические механизмы, лежащие в основе развития аневризмы грудного отдела аорты, до сих пор недостаточно изучены. Одна из существующих гипотез формирования аневризмы аорты связана с повышением активности тканевых протеаз. Известно, что матриксные металлопротеиназы (ММП) принимают активное участие в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса. Однако достоверно неизвестно, существует ли связь между структурными изменениями восходящего отдела аор-

ты, активностью ММП и составом белков внеклеточного матрикса (ВКМ). Диссекция аорты связана с дегенеративными изменениями в средней оболочке сосуда, при которых происходит фрагментация эластических волокон, что является одной из наиболее важных причин диссекции аорты. Целью настоящей работы было оценить влияние ММП и качественного и количественного состава ВКМ на структурные изменения аорты у больных с аневризмой восходящего отдела различной этиологии.

В исследовании участвовали 32 пациента с аневризмой восходящего отдела аорты и с ишемической болезнью сердца без патологии аорты. Этиология поражения аорты и аортального клапана подтверждалась в процессе интраоперационного гистологического исследования. В зависимости от этиологии поражения аорты пациенты были разделены на 3 подгруппы: 1-я подгруппа — пациенты с атеросклерозом, 2-я — пациенты с врожденным пороком сердца — двустворчатым аортальным клапаном (БАК) и 3-я — пациенты с трехстворчатым клапаном (ТАК). Был разработан способ анализа образцов ткани на присутствие ММП и некоторых белков ВКМ. В интраоперационных биоптатах оценивали содержание и активность ММП-2 и ММП-9, а также содержание фибриллина, эластина и коллагена I типа. Активность ММП, расщепляющих желатин, определяли методом зимографии. Содержание ММП-2 и ММП-9, а также белков ВКМ (коллаген I типа, фибриллин и эластин) в биоптатах аорты определяли методом Вестерн-блоттинга.

По результатам анализа содержания ММП-2 и ММП-9 выявлена тенденция к повышению уровня ММП-9 у больных с аневризмой восходящего отдела по сравнению с контрольной группой. Сравнительный анализ ММП-2 и ММП-9 в исследуемых подгруппах продемонстрировал наибольшее повышение данных показателей в подгруппе с БАК (ММП-9 активная,  $563.9 \pm 79.9$  усл. ед. при БАК и  $283.4 \pm 82.0$  усл. ед. в контрольной группе,  $P = 0.04$ ; ММП-9 латентная,  $650.7 \pm 74.5$  и  $277.9 \pm 87.0$  усл. ед. соответственно,  $P = 0.01$ ). У больных с ТАК и атеросклерозом различий в содержании и активности ММП выявлено не было. По данным исследования биопсийного материала аорты-подгруппы не различались по содержанию фибриллина. Выявлено увеличение соотношения коллаген/эластин в сторону увеличения содержания коллагена у больных с атеросклерозом и БАК (1 : 1.5).

По результатам данной работы можно сделать следующие выводы: развитие аневризмы восходящего отдела аорты связано с повышением активности ММП; максимальные значения ММП-2 и ММП-9 выявлены у больных с БАК по сравнению с пациентами с ТАК и атеросклеротическим поражением аорты. Повышение активности ММП сопряжено с увеличением соотношения коллаген/эластин в тканях аорты.

**КУЛЬТУРА КЛЕТОК КИШЕЧНИКА СВИНЬИ: ПОЛУЧЕНИЕ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ.** © Т. В. Гальнбек, [Л. П. Дьяконов], Е. С. Федорова. Всероссийский государственный научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко РАСХН, Москва.

Развитие современной вирусологии в значительной мере определяется наличием эффективных клеточных систем, позволяющих проводить эксперименты и осуществлять диагностику и биопроизводство с максимальным

выходом продукции (вирусные антигены и биологически активные вещества). Поэтому остается актуальной задача выведения новых клеточных культур, чувствительных к вирусам — возбудителям болезней сельскохозяйственных животных.

Применительно к вирусам, выделяемым от свиней, важно получить культуры клеток, использование которых позволило бы наряду с накоплением достаточного количества биомассы вирусов создать условия для максимального сохранения их антигенных и иммуногенных свойств. Это, в частности, относится к коронавирусу — возбудителю трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС).

Для ткани кишечника плодов свиньи и поросят — гнотобиотов — необходим щадящий способ трипсинизации. Применение дезагрегирующих растворов с пониженным содержанием трипсина и длительности дезагрегации 5—10 мин обеспечивает выход 50—70 % жизнеспособных клеток из ткани кишечника плодов свиньи и поросят — гнотобиотов. При использовании эмбрионов свиней разных сроков развития (1.5—3.5-месячного) замечено, что целесообразно использовать для дезагрегации и культивирования клеток ткань кишечника плодов на более поздних сроках эмбрионального развития (2.5—3.5 мес).

При использовании сред ГЛА и Игла в равном соотношении с добавлением 15 % сыворотки крови крупного рогатого скота клетки активно растут и на 5—6-е сут культивирования формируют монослой.

Для получения субкультур клеток кишечника плодов свиньи и поросят — гнотобиотов — использовали культуры клеток с конфлюэнтным монослоем. Культивирование проводили на смеси сред 0.5 % гидролизата лактальбумина и среды 199 или Игла (1 : 1) с 15 % сыворотки крупного рогатого скота и 10 % кондиционированной среды. На цитологических препаратах первично-трипсинизированные клетки кишечника плодов свиньи и поросят — гнотобиотов — морфологически не имели заметных различий. Они представлены клетками эпителиоподобного и фибробластоподобного типов. Эпителиоподобные клетки — полигональной формы, ядра крупные, округлой или овальной формы. Количество ядрышек от 1 до 3. Ядерный матрикс имеет крупносетчатую структуру, цитоплазма с мелкой вакуолизацией. Фибробластоподобные клетки имеют форму веретена и удлиненное ядро. Средний митотический индекс в культуре КЭС на 3-и сут культивирования был равен 12.5—15 %, на 5-е сут культивирования — 5—8 %.

Изучена чувствительность культур КЭС, КПГ к вирусу ТГС. Цитопатогенное действие вируса ТГС (штамм «ТНК») на культуре клеток КЭС, КПГ проявлялась с 1-го пассажа, а штамма ВГС-ВИЭВ — со 2-го. Оно характеризовалось увеличением размеров клеток, а затем их округлением. К 72 ч после внесения вируса клетки сморщивались и отторгались от стекла.

Полученные нами данные показывают, что культуры клеток из ткани кишечника эмбрионов свиней и поросят — гнотобиотов — могут быть использованы в качестве клеточной модели для выращивания коронавируса — возбудителя ТГС.

**НОВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ.** © М. Ю. Герасимов, А. Е. Зверева, Р. Р. Рахматуллин, Е. С. Князева, О. Г. Макеев,

С. А. Коротких. Институт медицинских клеточных технологий, Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, Екатеринбург, и Оренбургский государственный университет.

Лечение патологии роговицы, связанной с клеточной недостаточностью эпителия, является актуальной проблемой офтальмологии. Чаще дефицит регионарных стволовых клеток обусловлен ожоговым повреждением, которому в основном подвержены лица в трудоспособном возрасте. В зависимости от объема поражения лимба развивается частичная или полная утрата стволовых клеток эпителия (эпителиальных прогениторов), отвечающих за его прижизненную регенерацию. Это приводит к замещению прозрачного эпителия на непрозрачный конъюнктивальный, что уменьшает светопропускаемость роговицы и тем самым снижает остроту зрения.

В настоящее время перспективной методикой лечения таких состояний является трансплантация культивированных на матрице эпителиальных прогениторов роговицы. При пересадке происходит восстановление популяции утраченных стволовых клеток с восстановлением эпителия. Это существенно увеличивает прозрачность роговицы и улучшает остроту зрения поврежденно-го глаза.

В качестве матрицы нами впервые был использован биоматериал Гиаматрикс® из немодифицированной гиалуроновой кислоты. При получении тканеинженерной конструкции эпителия роговицы на данном биоматериале применялся новый подход, позволивший исключить использование мышинных фибробластов в качестве фидерного слоя.

Исследовали эффективность использования смешанной аутологичной культуры клеток роговицы человека, содержащей кератоциты и эпителиальные прогениторы. Биопат роговицы из области лимба получали по оригинальной технологии (положительное решение по заявке № 2010130201/14) от пациентки 84 лет после заполнения испытуемой информированного добровольного согласия, одобренного этическим комитетом ГОУ ВПО УГМА. В течение 3 нед культивирования по оригинальной методике получали стабильную смешанную культуру клеток роговицы человека, содержащую 85 % кератоцитов и 15 % эпителиальных прогениторов.

Суспензию смешанной культуры клеток роговицы наносили на поверхность биоматериала Гиаматрикс® из расчета  $10^5$  на  $414 \text{ см}^2$ . Культивировали в течение 2—3-х нед в среде DMEM с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой при 5 %  $\text{CO}_2$  и 37 °C со сменой среды и витальным контролем каждые 3 сут. Полученные образцы фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине с проводкой по спиртам и заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Гистологические срезы оценивали с использованием световой микроскопии на микроскопе Leica DM 2500.

Витальный контроль на 7-е сут культивирования позволил выявить адгезию кератоцитов на образцах Гиаматрикс®. В дальнейшем наблюдалось увеличение количества клеток в толще биоматериала. Морфологическая оценка на 15-е сут культивирования показала наличие на поверхности биоматериала Гиаматрикс® плоскостной монолитной многослойной эпителиальной конструкции, имеющей прочный контакт не только с подлежащей матрицей, но и с клетками, местами в комплексе с базальной мембраной.

Проведенные исследования продемонстрировали, что для формирования тканеинженерной конструкции эпителия достаточно использовать культуру клеток роговицы, содержащую роговичные фибробласты (кератоциты), что позволяет исключить применение ксеногенного фидерного слоя на основе мышинных фибробластов.

**ОТСУТСТВИЕ РЕАКТИВАЦИИ НЕАКТИВНОЙ Х-ХРОМОСОМЫ ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ПЛЮРИПОТЕНТНОМУ СОСТОЯНИЮ.** © Е. А. Грачева,<sup>1,2</sup> С. П. Медведев,<sup>1,2</sup> А. И. Шевченко,<sup>1,2</sup> Е. В. Григорьева,<sup>1,2</sup> А. А. Малахова,<sup>1,2</sup> Е. В. Дементьева,<sup>1,2</sup> У. А. Боярских,<sup>2</sup> С. М. Закиян.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН и <sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск.

Репрограммирование дифференцированных клеток к плюрипотентному состоянию приводит к морфологическим, транскрипционным и эпигенетическим изменениям. В соматических клетках женщин, как и в клетках самок других млекопитающих, наблюдается случайная инактивация отцовской или материнской Х-хромосомы. Для того чтобы это наблюдалось при направленной дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в соматические производные, необходимо изучение механизмов поведения Х-хромосом при получении ИПСК. Известно, что при получении ИПСК из клеток самок мыши Х-хромосома облигатно реактивируется. Вопрос о том, происходит ли это при репрограммировании дифференцированных клеток человека, в настоящее время изучен недостаточно хорошо. Есть данные о том, что при получении ИПСК с помощью ретровирусной трансдукции фибробластов с набором половых хромосом XX одна из Х-хромосом остается неактивной. Однако из-за многообразия методов получения ИПСК можно ожидать, что, как и в случае эмбриональных стволовых клеток, возможны линии как с одной активной, так и с двумя активными Х-хромосомами.

В работе исследованы линии ИПСК, полученные из фетальных нейральных стволовых клеток с кариотипом 46, XX трансфекцией плазмидной ДНК, содержащей гены *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Oct4*. При получении некоторых линий в культуральную среду добавляли ингибитор гистоновых диацетилаз вальпроевую кислоту и VIX01294 — ингибитор гистоновой метилтрансферазы G9a, которые увеличивают эффективность получения ИПСК. Полученные линии были исследованы на наличие ковалентных гистоновых модификаций, свойственных неактивной Х-хромосоме, с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания препаратов метафазных хромосом антителами к маркерам неактивного хроматина. С помощью ПЦР-анализа кДНК, полученной с помощью метода цепь-специфической обратной транскрипции, было проведено исследование наличия экспрессии гена *XIST*. Паттерн метилирования промоторной области гена *XIST* был изучен методом пироквенирования бисульфидно-модифицированной ДНК.

Во всех исследованных линиях вне зависимости от добавления в культуральную среду вальпроевой кислоты или вещества VIX01294 начиная с самых ранних пассажей на одной из Х-хромосом присутствуют ковалентные гистоновые модификации, характерные для неактивного хроматина. При культивировании ИПСК в стандартных

условиях маркеры неактивного хроматина (H3K27me3 и H3K9me3) могут утрачиваться. Тем не менее, не приобретаются маркеры активного хроматина (H3K4me2). В исследованных линиях экспрессируется ген *XIST*, что также свидетельствует о наличии неактивной Х-хромосомы. Исследование паттерна метилирования промотора гена *XIST* показало, что при репрограммировании к плюрипотентному состоянию паттерн метилирования в полученных линиях ИПСК совпадает с исходной линией клеток. Таким образом, при получении ИПСК из дифференцированных клеток человека вне зависимости от исходной линии, типа векторов и использования веществ, повышающих эффективность репрограммирования, не происходит реактивации неактивной Х-хромосомы.

**ВОЗМОЖНОСТЬ КОРРЕКЦИИ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕЛЕЗЕНКИ С ПОМОЩЬЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.** © Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова. Институт медицинских клеточных технологий и Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, Екатеринбург.

Стволовые клетки обладают уникальной способностью дифференцироваться и давать росток любым тканям и структурам организма независимо от их сложности и разнообразия. Эта способность делает стволовые клетки важнейшим восстановительным резервом в организме, который используется для замещения дефектов, возникающих в силу тех или иных обстоятельств. В данном исследовании изучалась возможность использования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) для изменения морфометрических показателей селезенки в физиологических условиях и при острой кровопотере.

Эксперименты выполнены на 28 белых лабораторных крысах-самцах возраста 6—8 мес, массой 200—250 г. Эксперименты по получению культуры ММСК выполнены на 8 лабораторных крысах-самцах возраста 3—4 мес, массой 150—170 г, срок гестации — 18 сут. Культивирование проводили в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при 37 °С в увлажненной атмосфере с содержанием углекислого газа 5 %. Смену питательной среды производили каждые 3—4 сут. Подсчет клеток производили в гемоцитометре. Жизнеспособность выделенных клеток составляла 95—97 %. Массивную кровопотерю вызывали кровопусканием из хвостовой вены крысы в объеме 2 % от массы тела, что составляет 25—35 % от объема циркулирующей крови. Животным опытной подгруппы внутривенно вводили ММСК из расчета 6 млн клеток на 1 кг, животным контрольной подгруппы вводили раствор хлорида натрия (0.9 %, 0.5 мл). Введения осуществляли через 1 ч после кровопускания однократно. Аутопсию селезенки производили на 5 сут после введения ММСК. Оценивали уровень апоптоза клеток лимфатических фолликулов селезенки с помощью определения апоптотического индекса на гистологических срезах. Подсчитывали лимфоциты, находящиеся в состоянии апоптоза, встречаемые на 500 клеток, полученный результат выражали в %. Морфометрическое исследование селезенки: оценивали средний диаметр лимфоидных фолликулов, расстояние между центрами фолликулов, общее содержание клеточных элементов в красной пульпе, содержание эритроидных элементов в красной пульпе, содержание лейкоцитов в красной пульпе.

В физиологических условиях на 5-е сут после трансплантации ММСК при измерении морфометрических показателей селезенки не установлено достоверных различий в опытной подгруппе относительно контроля. На 5-е сут после острой кровопотери в контрольной подгруппе при определении диаметра лимфоидных фолликулов установлено достоверное увеличение относительно контроля ( $352.71 \pm 10.04$ ,  $P < 0.05$ ). При определении расстояния между центрами фолликулов отмечено существенное увеличение сравнимого показателя ( $436.57 \pm 8.49$ ,  $P < 0.05$ ) относительно интактных животных. Это увеличение обусловлено повышением клеточности красной пульпы как за счет эритроидных элементов ( $166.00 \pm 5.43$ ,  $P < 0.05$ ), так и за счет клеток белой крови ( $171.14 \pm 4.16$ ,  $P < 0.05$ ). Выявленность апоптоза клеток лимфоидных фолликулов была существенно выше по сравнению с контролем (АИ:  $1.29 \pm 0.69$ ,  $P < 0.05$ ).

На 5-е сут после кровопотери в подгруппе лабораторных животных, которым была проведена трансплантация ММСК, при определении диаметра лимфоидных фолликулов выявлено значимое увеличение данного показателя ( $368.57 \pm 5.06$ ,  $P < 0.05$ ) по сравнению с контрольной подгруппой. При определении расстояния между центрами фолликулов и подсчете общей клеточности красной пульпы не выявлено достоверного изменения изучаемых показателей относительно контрольной подгруппы. При подсчете эритроцитов в красной пульпе установлено существенное увеличение относительно контрольной подгруппы ( $181.14 \pm 7.02$ ,  $P < 0.05$ ). При этом содержание лейкоцитов в красной пульпе достоверно не отличалось от сравнимого показателя в контрольной подгруппе. Выявленность апоптоза была выше, чем в контроле, но достоверно не отличалась от аналогичного показателя в контрольной подгруппе.

Эти изменения могут быть обусловлены как повышением пролиферативной активности клеток фолликулов селезенки, так и усиленным хоумингом КОЕс в селезенку и последующим усилением экстрамедуллярного кроветворения. Указанные изменения во многом потенцируются трансплантированными ММСК. Таким образом, трансплантированные ММСК в физиологических условиях не приводят к изменению морфометрических показателей селезенки, а при острой постгеморрагической анемии вызывают увеличение размеров фолликулов селезенки, а также повышение содержания эритроидных элементов в красной пульпе.

**СООТНОШЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС.** © А. В. Ельчанинов, Г. Б. Большакова. НИИ морфологии человека РАМН, Москва, elchandreuy@yandex.ru.

У взрослых млекопитающих после резекции печени наряду с активацией пролиферации гепатоцитов отмечается также повышение уровня апоптоза (Chen et al., 2010).

Цель нашей работы — оценить активность пролиферации и апоптоза гепатоцитов регенерирующей фетальной печени крыс.

В исследовании использовали разработанную нами воспроизводимую модель резекции 20 % печени 17-суточных плодов крысы (Ельчанинов, Большакова, 2010). Оперированные и контрольные плоды (неоперированные

однопометные крысята) выводили из опыта через каждые 3 ч в течение 2 сут после резекции печени. Опытные и контрольные группы состояли из 7—10 животных. Всего было исследовано 200 плодов. Печень фиксировали в жидкости Карнуа, далее проводили обычную гистологическую обработку. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для исследования пролиферации гепатоцитов определяли их митотический индекс (МИ) в промилле (%), а также использовали поликлональные антитела к ядерному белку Ki67. Клетки, гибнущие путем апоптоза, выявляли с помощью моноклональных антител к каспазе 3. На препаратах в обоих случаях подсчитывали меченые клетки, затем вычисляли соответствующий индекс как отношение меченых гепатоцитов к общему числу гепатоцитов в процентах (%).

Межгрупповые сравнения митотических индексов, индексов Ki67 и каспазы 3 проводили с использованием z-критерия с помощью программы SigmaStat 3.5.

МИ гепатоцитов через 12 ч и далее, вплоть до 36 ч после операции включительно, а также через 42 ч после операции у подопытных животных был достоверно выше, чем в контроле ( $P < 0.05$ ), через 48 ч различий не было. При этом в митотической активности гепатоцитов регенерирующей печени плода отмечены два пика: через 12 ч ( $14 \pm 0.6$  %) после операции и через 24 ч ( $16.1 \pm 0.6$  %). Индекс Ki67 гепатоцитов регенерирующей печени плода через 12, 15 и 24 ч после операции был статистически значимо выше, чем в контроле ( $P < 0.05$ ). Наибольшего значения индекс Ki67 гепатоцитов в опыте достигал через 15 ч после операции ( $8.4 \pm 0.3$  %). Таким образом, при восстановлении массы фетальной печени пролиферация охватывает большее количество гепатоцитов, чем предполагалось на основании данных о митотической активности. Наличие пиков показателей пролиферации гепатоцитов свидетельствует о высокой активности клеточного размножения.

Как в оперированной, так и в интактной печени определялись лишь единичные, в основном гемопозитические, клетки, меченные с помощью антител к каспазе 3. Это, видимо, отражает процесс угасания кроветворной функции в печени плодов крысы на этом сроке развития (Guo et al., 2009).

Таким образом, ведущим процессом при регенерации фетальной печени крыс является пролиферация гепатоцитов. Гибель гепатоцитов, видимо, не оказывает существенного влияния на процесс регенерации печени крысы в пренатальном онтогенезе.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКОГО СТЕРЖНЯ НА ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ** © А. Н. Емельянов,<sup>1</sup> Е. А. Цой,<sup>2</sup> М. А. Цой,<sup>2</sup> Н. Н. Богданов,<sup>1</sup> Г. П. Пинаев.<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> С.-Петербургская медицинская академия последипломного образования, <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет и <sup>3</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время для восстановления приобретенных или врожденных дефектов тканей человека успешно используются различные типы стволовых клеток. Для исправления крупных дефектов тканей или нарушения структуры органов используют тканевые трансплантаты, например дермальный эквивалент, трансплантаты на основе биодеградируемых полимеров и др. Однако струк-

туру паренхиматозных органов, таких как печень, почки и др., до сих пор воспроизвести не удается.

Существует предположение о том, что структура организма и его органов зависит от закономерностей существования пространственных форм материи и биологических полей (вероятно, электромагнитных), которые, с одной стороны, формируются живой материей, а с другой — сами способствуют ее структурной организации. Влияние формы на органогенез было показано в классических экспериментах по гетеротопной трансплантации разобренных клеток костного мозга мыши под капсулу почки путем помещения клеток на внутреннюю поверхность согнутого миллиметрового фильтра.

Вероятно, так же как и, например, кристаллические неорганические структуры, биологические объекты имеют узловое формообразующие точки. Известно, что многоклеточные животные и высшие растения имеют биологические активные точки (БАТ), схожие по своим электрическим характеристикам с точками акупунктуры (ТА) человека. Основным инструментом воздействия на ТА является тонкий стержень того или иного инертного металла. Однако до сих пор никаких специальных структур в ТА не найдено. Предполагается слабое полевое (вероятно, электромагнитное) воздействие акупунктуры на организм человека через ТА. В то же время известно, что у растений в БАТ находятся клетки камбия. В простейшем случае камбиальная клетка в точке роста, делясь, образует расширяющийся к корню тонкостенный цилиндр камбиальных клеток. Если сделать срез стебля на небольшом расстоянии ниже точки роста, то мы увидим фигуру: в центре будут находиться клетки камбия, также клетки камбия будут образовывать круг на некотором расстоянии от центра. Данная структура, по нашему мнению, является простейшей структурой ТА, где центральная точка — формообразующая.

Для проверки этой гипотезы мы использовали в качестве металлического стержня стандартные китайские акупунктурные иглы из биологически инертного металла 0.3 мм толщиной и 60 мм длиной. Мезенхимные стромальные клетки костного мозга (МСККМ) крысы и человека выделяли и готовили к эксперименту по стандартной методике. Клетки рассеивали в количестве 5—8 тыс./см<sup>2</sup> в чашки Петри площадью 20 см<sup>2</sup>. Сразу после посева клеток в центр чашки перпендикулярно вставлялась акупунктурная игла. Для этого в крышке чашки и крышке «рубашки» предварительно делались соответствующие отверстия. Далее клетки инкубировали в термостате при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в течение от 1 до 6 сут.

Обнаружили, что в течение первых 2 сут инкубации можно наблюдать неравномерное расположение клеток по поверхности чашки. На некотором расстоянии от иглы клетки образуют скопление в виде круга (тор). На более поздних сроках инкубации клетки образуют монослой, и выявленная фигура становится малозаметной. Кроме того, на ранних сроках инкубации (до 2 сут) клетки в опыте по сравнению с клетками в контроле обладали большей пролиферативной активностью, которая по мере удлинения сроков инкубации клеток нивелировалась. Формирование тора было визуально обнаружено также в аналогичных вышеприведенным опытах с суспензионной фракцией мононуклеарных лейкоцитов крови человека.

ПРИМЕНЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ ОБЕЛИНА В ИССЛЕДОВАНИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ КАЛЬЦИЙЗАВИСИ-

МЫХ ПУТЕЙ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ НЕК 293.  
© А. В. Еремеев,<sup>1,2</sup> Н. П. Маликова,<sup>1</sup> Ю. И. Шеина.<sup>2</sup> <sup>1</sup>Институт биофизики СО РАН, Красноярск, и <sup>2</sup>Красноярский центр репродуктивной медицины.

На сегодняшний день биоломинесцентные системы являются одним из инструментов неинвазивного исследования различных процессов *in vivo*, особенно связанных с передачей сигналов. Одни из изученных и уже широко применяемых в различных сферах — акварины, способные к биоломинесцентной реакции при участии целентеразина и индукторов. Это позволило использовать их для изучения кальций-сигнальных путей в клетке. Ранее с помощью сайтнаправленного мутагенеза были получены мутантные формы с заменами аминокислот другого кальцийзависимого фотопротеина — обелина с измененными биоломинесцентными спектрами. Это дало предпосылки для создания систем детекции кальция в различных компартаментах, излучающих в разных диапазонах спектра. Мутанты были клонированы в векторах *pcMV/mito* (F88Y&F119W) для экспрессии обелина в митохондриях и *pcDNA 133+* (I144H) в цитоплазме. Для анализа возможности применения полученных мутантов в изучении кальцийзависимых процессов в клетке в качестве модели исследовали взаимосвязь роли кальция и фосфатазы PP2A в регуляции гистамининдуцированного апоптоза. Поскольку известно, что PP2A имеет кальций-связывающий участок, позитивно влияющий на ее активность, мы предположили, что подавление активности фосфатаз с помощью высокоспецифического ингибитора — оадаевой кислоты (ОА) — должно предотвращать гистамининдуцированный в клетках апоптоз.

Для решения поставленных задач клетки линии НЕК293 трансфицировали *pcMV/mito* F88Y&F119W и *pcDNA 133+* I144H. На следующий день клетки были перенесены в 96-луночные планшеты для биоломинесцентных исследований или слайд-флаконы для последующего иммуноцитохимического анализа. Для изучения роли PP2A в гистамининдуцированном апоптозе клетки инкубировали с гистамином (100—200 мкг/мл) при постоянном присутствии или кратковременном (4 ч) воздействии аналогично с ОА (1нМ). В ряде экспериментов клетки обрабатывали сочетанным воздействием двух факторов. Количество клеток в апоптозе оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. Визуализацию неактивной фосфорилированной формы PP2A определяли иммуноцитохимически. Детекцию кальция с помощью фотопротеинов исследовали после предварительной экспозиции клеток с кофактором целентеразином с последующим воздействием индукторов. Визуализацию свечения проводили с помощью планшетного биоломинометра Berthold Mythras LB940.

На первом этапе было обнаружено, что гистамин индуцирует биоломинесценцию в клетках, трансфицированных вектором для экспрессии обелина в цитозоле и митохондриях. Увеличение свечения (и связанного с этим уровня кальция) в цитоплазме связано, вероятно, с выбросом его из резервуаров (эндоплазматический ретикулум). Возрастание биоломинесцентного сигнала в случае митохондриальных форм фотопротеина свидетельствует о его закачке в органеллы (компенсаторная реакция, направленная на снижение цитоплазматической концентрации ионов кальция). На следующем этапе было установлено, что гистамин индуцирует апоптоз в клетках, в то же время предварительная экспозиция (4 ч) с ОА тормозит

вступление клеток на путь программированной клеточной гибели. При этом иммуноцитохимически выявляется увеличение фосфорилированных по тирозину 307 PP2A. Более того, кратковременная обработка клеток ОА значительно снижает биолюминесценцию фотопротеинов (как цитозольного, так и митохондриального), индуцированную гистамином, что свидетельствует о взаимосвязанной роли кальция и PP2A в регуляции апоптоза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о позитивной роли PP2A в регуляции апоптоза в НЕК293 и о связи активности фосфатазы с внутримитохондриальным и цитоплазматическим содержанием кальция. Результаты этого эксперимента показывают возможность применения разработанной нами системы на основе обелина для изучения кальций-сигнальных путей регуляции с вовлечением ключевых регуляторов жизненного цикла клетки. Данная система может применяться как в исследовательских целях для изучения тех или иных процессов в клетке, так и в качестве скрининговой при тестировании фармсредств.

**ВКЛАД ЦИТОСТИМУЛИРУЮЩИХ МЕХАНИЗМОВ В ГЕРОПРОТЕКТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ L-АРГИНИНА И АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА.** © Г. В. Жиборкин, Н. В. Яковлев, И. В. Гаврилов, В. Н. Мещанинов. ГУЗ СО ИМКТ, ГОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития РФ и ГОУЗ СОКП Госпиталь для ветеранов войн, Екатеринбург.

В литературе имеются данные об альфа-фетопротеине как клеточном стимуляторе (Черешнев, Родионов, 2009). L-аргинин модулирует взаимодействия между стенкой кровеносного сосуда и циркулирующими форменными элементами крови (Салей и др., 2009). Альтернативная коррекция работы клеток организма человека при старении путем введения клеточных стимуляторов, а не собственно стволовых клеток имеет ряд преимуществ. Среди них — относительная дешевизна, методическая простота, гипоаллергенность, неинвазивность (энтеральный прием L-аргинина) и юридическая «облегченность» метода. Целью было изучить героцитопротекторное действие L-аргинина и альфа-фетопротеина в экспериментах *in vivo*, *in vitro* и исследовании на пациенте.

В эксперименте *in vitro* в варианте переживающих органов изучали влияние L-аргинина (конечная концентрация 16.7 мМ) («Вазотон») и альфа-фетопротеина (в концентрации 1 мг на 1 кг ткани) («Профеталь») на показатели переживающего в течение 2 ч при 25 °С гомогената печени и стабилизированной гепарином крови, осмотическую резистентность эритроцитов и гематологические показатели 12 крыс зрелого (8 мес) и 12 крыс старого (20 мес) возраста как модели ускоренного старения клеток и субклеточных структур. В эксперименте *in vivo* крысы (2 группы — старые и молодые крысы, по 30 особей в группе) получали L-аргинин в виде раствора в свободном доступе. Лечение L-аргинином («Вазотон», ООО «Алтайвитамины») по 1 капсуле (500 мг) 3 раза в 1 сут проводили пациентам (по 12 человек в каждой группе), лечение «Профеталем» — курсом 7 инъекций по 75 мкг внутримышечно. Критериями включения в исследуемую группу явилось наличие у пациентов полиорганной патологии. Показатели периферической крови исследовали на гематологическом анализаторе-автомате ERMA PCE 90VET (Walpole, США), биологический возраст — по То-

карь и др. (1992), показатели обмена веществ, перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) — с помощью люминометра-фотометра Lucy 3 (Anthos Labtec Instruments, США) и биохимического анализатора (Chem Well, Awareness Technology, США), «Spinreact» (Испания).

В эксперименте *in vitro* L-аргинин показал себя прооксидантом, снижая осмотическую резистентность эритроцитов (хемилюминесценция увеличивалась на 27 %,  $P < 0.05$ ). *In vivo* L-аргинин у старых животных проявлял цитопротективное действие (увеличение осмотической резистентности эритроцитов на 19 % ( $P = 0.05$ ) за счет нормализации парциального давления кислорода в печени животных и торможения ПОЛ (Салей и др., 2009). Препарат снижал у пациентов кардиопульмональный возраст (на 7 лет,  $P = 0.05$ ), что может быть объяснено действием препарата на сердечно-сосудистую систему (Ястребов, Мещанинов, 2005—2010). Альфа-фетопротеин в экспериментах *in vivo* и *in vitro* проявлял прооксидантную активность. Активация красного ростка крови (ретикулоцитоз) (на 20 %,  $P < 0.05$ ) у пациентов старшей возрастной группы была опосредована активацией анаэробного гликолиза в результате прооксидантного действия препарата. У пациентов зрелого возраста препарат снижал биовозраст, *in vivo* и *in vitro* проявлял антиоксидантную, антигипоксическую и цитопротективную активность, тормозил созревание ретикулоцитов (на 48 %,  $P < 0.05$ ). Таким образом, стимуляции созревания клеток не вносила существенного вклада в геропротекторную активность изучаемых препаратов, а цитопротекторные механизмы вносили вклад в геропротекторную активность только в том случае, когда проявлялись одновременно на моделях *in vivo* и *in vitro* (альфа-фетопротеин).

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЯЗВЕННЫХ ДЕФЕКТОВ КОЖИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ.** © А. Е. Зверева, Ю. В. Каракина, О. Г. Макеев. Институт медицинских клеточных технологий и Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, Екатеринбург.

Затруднение заживления язвенных дефектов при нейротрофических поражениях нижних конечностей у больных сахарным диабетом (СД) обусловлено дефицитом клеток, способных активно пролиферировать и функционировать в тканях.

Неуклонно возрастающее количество пациентов, нуждающихся в оперативном лечении, и неэффективность хирургических методов решения этой проблемы позволили сформулировать цель исследования: оценить целесообразность применения смешанных клеточных культур фибробластов и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) для лечения нейротрофических язв у больных СД.

Исследование проведено у 10 пациентов с СД II типа тяжелой степени в возрасте от 50 до 79 лет. При обследовании у всех пациентов были выявлены язвенные дефекты стоп или голеней с размерами не менее 35×10 и 65×50 мм соответственно.

У всех пациентов под проводниковой анестезией с ягодичной области выполняли эксплантацию кожи и подлежащей подкожно-жировой клетчатки. Дермальные фибробласты и ММСК культивировали по оригинальной

методике. Полученный объем жировой ткани позволил получить воспроизводимые культуры ММСК 3 испытуемых.

При проведении испытаний было предпринято обогащение культур дермальных фибробластов ММСК в аутогенном варианте. При этом доля Stro-1-позитивных клеток в смешанных культурах возрастала десятикратно — до 0.6 %. Для фиксации клеток на поверхности язвы использовали аутологичную фибриновую подложку, обогащенную тромбоцитами, и специальную повязку, обеспечивающую «влажное» заживление раны. Заживление язвы отслеживали в динамике на протяжении 26 нед.

По прошествии 1-й нед после трансплантации сокращение язвенной поверхности в среднем на 45 % наблюдалось у половины пациентов, а с трансплантацией культур, обогащенных ММСК, — в среднем на 70 %. Среди пациентов, для которых использовали смешанные культуры, к концу 3-й нед в одном случае зафиксировано полное заживление язвы, а у 2 других пациентов спустя 4—6 нед. У пациентов с применением монокультур к этому сроку наблюдалось закрытие дефектов от 58 до 80 % раневой поверхности. К 11-й нед у 4 пациентов этой группы зафиксировано полное закрытие раневых дефектов, еще 2 находились на завершающем этапе заживления. Окончательная эпителизация при лечении монокультурами была подтверждена у 6 из 7 пациентов к 21-й нед наблюдения. У 1 пациентки на этом сроке наблюдалось 75 % заживления. Полной эпителизации язвенного дефекта у данной испытуемой не было достигнуто в связи с нарушением рекомендованной методики (использование для закрытия раневой поверхности сорбирующей марлевой повязки).

Средняя продолжительность закрытия язвенных дефектов монокультурами с момента трансплантации аутофибробластов до эпителизации раны при локализации язвы на стопе составила 9.5 нед, при локализации на голени — 19.3 нед. При этом срок заживления с использованием обогащенных ММСК культур в аутогенном варианте составил  $4.5 \pm 1.5$  нед.

Полученные результаты позволяют сделать выводы о целесообразности применения аутогенных культивированных клеток для лечения нейротрофических язв нижних конечностей с большей эффективностью применения обогащенных ММСК культур.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СКОРОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЕРВИЧНО-ТРИПСИНИЗИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ПЭК ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ.**  
© Ю. М. Кириллова, Э. М. Плотникова, Е. Ю. Хамзина.  
ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», Казань.

Сохранение эталонных клеточных линий является одной из самых важных проблем клеточной технологии. Известно, что культуры клеток *in vitro* генетически нестабильны. При их длительном культивировании накапливаются изменения, которые могут привести к утрате специфических особенностей данной культуры. Криоконсервация является наиболее эффективным методом длительного хранения клеток, широко используемым в практике коллекций и банков клеточных культур. Как известно, приготовление первичных клеточных культур и субкультур нередко затруднено отсутствием необходимых тканей для трипсинизации. Поэтому на сегодняшний день актуальной проблемой остается оптимизация усло-

вий криоконсервации и восстановления после первично-трипсинизированных культур клеток животных и человека. Данная работа направлена на исследование жизнеспособности и скорости восстановления после криоконсервации клеток первично-трипсинизированной культуры ПЭК с целью дальнейшего усовершенствования условий их сохранения.

На первом этапе исследований первично-трипсинизированную культуру клеток ПЭК, полученную по стандартной методике (Дьяконов, 2009), замораживали в концентрации  $(1.9 \pm 1.1) \cdot 10^6$  кл./мл. После размораживания и окрашивания трипановым синим установлено, что концентрация живых клеток составляла  $63 \pm 2.81$  % от общего числа замороженных. В работе применяли комплекс методов цитологических исследований, предусматривающих изучение не только структурной целостности клеток после замораживания—оттаивания, но и начальной адгезии, способности к пролиферации, скорости и качества формирования монослоя и митотического режима. Наиболее достоверную оценку жизнеспособности культивируемых клеток и восстановленных после криоконсервации может дать учет интенсивности роста при высеве в культуральные сосуды. Количество адгезированных клеток считали на 2, 4, 6, 24, 48 и 72 ч культивирования. Установлено, что на 2, 4 и 6 ч число прикрепившихся клеток находилось на одном уровне и составляло  $(0.54 \pm \pm 0.1) \cdot 10^5$  кл./мл, что соответствовало  $20 \pm 1.3$  % от общего числа размороженных. Через 24 ч инкубации число клеток было незначительно, ниже  $-(0.49 \pm 0.1) \cdot 10^5$  кл./мл и соответствовало  $18.6 \pm 2.18$  %. Так как в течение 24 ч количество адгезированных клеток находилось примерно на одном уровне, вероятно, что седиментация и адгезия клеток происходят уже через 2 ч культивирования, однако окончательный процесс прикрепления наступает к 24 ч, и, таким образом, истинная доля жизнеспособных клеток равна  $18.6 \pm 2.18$  % кл./мл. Через 48 ч инкубации число клеток увеличивалось в 2.6 раза, что свидетельствует о начале интенсивного деления клеток и подтверждается значениями митотического индекса (МИ). На 3-е сут число клеток возрастало до  $(3.09 \pm 0.9) \cdot 10^5$  кл./мл. Конфлюэнтный монослой формировался на 5-е сут. По результатам исследования митотического режима показано, что через 24 ч МИ был равен  $-21.33 \pm 1.1$  %, однако  $93.8 \pm 2.1$  % из них составляла патологическая форма митоза (ПФМ). Через 48 ч культивирования значение МИ соответствовало  $-29.6 \pm 1.12$  %, но уровень ПФМ был значительно ниже ( $42.6 \pm 2.2$  %). Через 72 ч МИ был равен  $60 \pm 0.9$  %, а процентное значение ПФМ оставалось по-прежнему высоким —  $49 \pm 1.85$  %. Среди ПФМ преобладал амитоз, который, как известно, сопутствует компенсаторным процессам, протекающим в тканях (например, при функциональных перегрузках, голодании, после отравления или денервации). Обычно амитоз наблюдается в тканях со сниженной митотической активностью. Что подтверждается нашими данными.

В целом полученные данные свидетельствуют о возможности успешной криоконсервации и декриоконсервации первично-трипсинизированной культуры клеток ПЭК.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ И ОТДАЛЕННЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ.** © А. Г. Конопляников,<sup>1</sup> Л. В. Курсова,<sup>1</sup> О. В. Терехов,<sup>1</sup> М. А. Конопляников.<sup>2</sup> <sup>1</sup> ФГБУ Меди-

цинский радиологический научный центр, Обнинск, и <sup>2</sup> Российский государственный медицинский университет, Москва.

Для лечения тяжелых форм острой лучевой болезни обычно принято использовать трансплантации костного мозга или концентратов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), выделяемых из периферической крови, а в последние годы для их замены некоторые авторы также рекомендуют использовать клеточные концентраты из пуповинной крови. Трудности в реализации этих методов связаны с необходимостью получения иммунологически совместимых с организмом реципиента донорских ГСК, а также с тем, что для трансплантации требуется достаточно большое количество ГСК, которое часто не может быть достигнуто при использовании всех вышеперечисленных их источников, а размножение ГСК в клеточной культуре — достаточно сложный и длительный процесс. В последнее время в наших экспериментальных работах удалось показать, что при летальном общем облучении мышей и крыс можно достигнуть достаточно высокого уровня 30-дневной выживаемости, если животным различными способами после облучения вводили выращенные в клеточной культуре аутологичные или аллогенные мезенхимные стволовые клетки (МСК) или продукты их жизнедеятельности в форме кондиционной среды (КС) из-под культур МСК. Механизм такого противолучевого действия МСК и выделяемых ими в культуральную среду паракринных факторов можно объяснить тем, что МСК не замещают погибшие после облучения ГСК, а способствуют своеобразному «спасению» небольшой доли ГСК, оставшихся неповрежденными после облучения (оценивается на уровне менее 1 % от исходных размеров пула) от воспаления и других деструктивных процессов, которые способны привести к гибели выжившую после облучения фракцию ГСК. Эта «спасенная» фракция ГСК за счет последующей быстрой пролиферации и дифференцировки восстанавливает гематопоз и обеспечивает выживание облученных животных. Эту гипотезу предложили и подкрепили данными об отсутствии размножения трансплантированных МСК в облученном организме Ланге и соавторы (Lange, 2010), а нам удалось выявить повышение выхода селезеночных эндоклонов у сублетально и летально облученных мышей, если им после облучения внутривенно или внутрибрюшинно вводили  $(0.5—1) \cdot 10^6$  МСК или внутрибрюшинно 0.2 мл КС из-под культур аутологичных, аллогенных и даже ксеногенных МСК. Результаты данных исследований открывают новые возможности для терапии нарушений гематопоза, вызванных действием ионизирующей радиации отдельно и в сочетании с химиопрепаратами, которые широко применяются при лечении онкологических больных.

В ФГБУ МРНЦ в течение последних лет также начаты клинические исследования по использованию трансплантаций МСК у больных с поздними лучевыми поражениями, развившимися после лучевой терапии злокачественных новообразований. Было показано, что проведение одной или нескольких системных (внутривенных) трансплантаций аутологичных или аллогенных МСК (150—200 млн клеток, суспендированных в 200 мл физиологического раствора) ослабляет проявления лучевых пневмофиброзов, ректитов и циститов. При терапии двух последних типов поражений у ряда пациентов использовали также инсталляции 20—30 мл КС из-под культур человеческих МСК в полости поврежденной облуче-

нием прямой кишки и мочевого пузыря. Накопленный клинический опыт свидетельствует о перспективности использования МСК и КС при лечении поздних лучевых поражений различных органов и тканей человека, хотя для широкого внедрения этого метода в широкую медицинскую практику несомненно необходимы дальнейшее изучение механизмов лечебного эффекта МСК и КС и разработка оптимальных схем такой терапии.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДАПТИВНОГО ПЕРЕНОСА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ВОЗРАСТНОЙ ИНВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМА. © К. А. Коньшев, С. В. Сазонов. ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург. [IMCT@yandex.ru](mailto:IMCT@yandex.ru).

Способность лимфоцитов стимулировать пролиферативные процессы в тканях изучали в системе адаптивного переноса (Бабаева и др., 1997). В качестве доноров спленоцитов использовали животных из разных возрастных групп, подвергавшихся односторонней нефрэктомии. Донорский интервал составлял 19 ч после выполнения операции. Для иммуногистохимических исследований применяли моноклональные антитела и визуализационную систему для проведения пероксидазно-антипероксидазной (ПАП) методики (ДАКО, США), выполняемой на автостейнере ДАКО (США).

Состояние пролиферативных процессов оценивали с помощью комплекса методов. Кроме определения величины митотического индекса (МИ) рассчитывали продолжительность митоза (Дондуа, 1990) и с помощью проточного цитометра (ЛЮАМ-ГОИ) определяли количество ДНК (Розанов, 1988) в ядрах клеток с одновременным распределением анализируемой клеточной популяции по плоидности и фазам клеточного цикла. Рассчитывали временные параметры митотического цикла (Givan, 1992). Активность синтеза ДНК в клетках определяли по включению <sup>3</sup>H-тимидина методом жидкостной сцинтилляции, вычисляли долю клеток, находящихся в S-фазе.

При морфометрическом исследовании ткани почки старых животных было обнаружено усиление их инфильтрации по сравнению с органами более молодых животных. Иммуногистохимическое изучение фенотипа лимфоцитов позволило нам идентифицировать их как Т-клетки (CD45+, CD45RO+, CD3+ и CD8-).

Изучение морфогенетических свойств лимфоцитов изучали с использованием клеток селезенки нефрэктомированных животных из разных возрастных групп в системе адаптивного переноса. При трансплантации спленоцитов, полученных от старых доноров, старым реципиентам не обнаружено стимуляции пролиферативных процессов в эпителии канальцев почек последних. Подобные изменения в системе адаптивного переноса могут происходить как за счет изменения морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так и за счет изменения пролиферативных потенциалов клеток почечного эпителия (или за счет наличия обеих причин одновременно). Однако перенос этих же спленоцитов зрелым донорам сопровождается проявлением их морфогенетической функции. При этом активность пролиферативных процессов в почках реципиентов оказалась выражена не меньше чем в контрольной группе. Трансплантация спленоцитов от зрелых доноров старым реципиентам также приводит к проявлению морфогенетических свойств лимфоидных клеток. Однако

уровень активности пролиферативных процессов в почках реципиентов оказался значительно ниже, чем в контрольной группе.

Анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать основной вывод: при старении организма снижение уровня пролиферативных процессов не связано с ослаблением морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так как последние в полной мере проявляются в организме молодых животных, хотя значительно снижены у старых. Однако при старении в организме подвскаются выраженному уменьшению пролиферативные потенции тканей, что проявляется в торможении реализации морфогенетических свойств лимфоцитов зрелых животных непосредственно в паренхиме (одноименного с удаленным) органа у старых животных.

**СОЗДАНИЕ ТРЕХМЕРНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НА ОСНОВЕ ФИБРИНОВОГО СГУСТКА ДЛЯ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.** © В. С. Костюнина, К. В. Жур, Н. В. Гончарова, С. М. Космачева, М. П. Потаннев, Н. В. Петёвка. РНПЦ гематологии и трансфузиологии, Минск, Белоруссия.

Цель работы — создание трехмерной конструкции-носителя стволовых клеток человека на основе искусственного фибринового сгустка для репарации поврежденной хрящевой ткани и изучение хондрогенного потенциала клеток в данном микроокружении.

Конструкцию получали при использовании компонентов гемостатического препарата «Фибриностаг» — фибриногена и тромбина производства ГУ РНПЦ ГТ — и культур клеток человека. Культуру мультипотентных мезенхимных стволовых клеток костного мозга (ММСК КМ) получали методом центрифугирования на градиенте плотности фикола, клетки-предшественники хондроцитов (КПХ) — методом высева из эксплантов послеоперационной хрящевой ткани. Проводили анализ экспрессии специфических маркеров хондродифференцировки — генов коллагена II типа и агрекана — методом ПЦР в реальном времени. Были выявлены различия между используемыми культурами клеток по экспрессии этих генов, в то время как по фенотипическим маркерам CD45, CD34, CD105 и CD90 значительных различий не обнаружено.

Тестировали конструкции различной плотности фибринового геля (2 и 8 мг/мл фибриногена), содержащие ММСК КМ человека 1-го пассажа и КПХ 4—5-го пассажей. Хондрогенную дифференцировку ММСК КМ и КПХ в составе искусственного фибринового сгустка проводили тремя различными протоколами с использованием TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_3$ , и BMP6 в качестве факторов дифференцировки. Степень дифференцировки оценивали по удержанию конструкциями специфических красителей, связывающих протеогликаны, гликозаминогликаны и кислые муцины, как визуально, так и спектрофотометрически после экстракции красителей.

Клетки в составе искусственных конструкций сохраняли жизнеспособность, наблюдался высеv клеток из геля аналогично высеvu из эксплантов хрящевой ткани.

Наибольшую разницу между опытными и контрольными образцами по экспрессии протеогликанов, гликозаминогликанов и кислых муцинов наблюдали при использовании сочетания дифференцировочных факторов

TGF- $\beta_3$  и BMP6 как для ММСК КМ, так и для КПХ. Показано, что TGF- $\beta_3$  более эффективен, чем TGF- $\beta_1$ , при индукции хондрогенеза в фибриновом геле.

КПХ в составе конструкций связывали в 2.5—3 раза больше красителя как в опыте, так и в контроле по сравнению с ММСК КМ, что свидетельствует об их прекоммитированности в хондрогенном направлении.

Заключенные в конструкции большей плотности (8 мг/мл фибриногена) клеточки сохраняли хондроцит-подобную морфологию и сильнее связывали толуидиновый синий и альциановый синий в процессе дифференцировки, что указывает на большую продукцию гликозаминогликанов и кислых муцинов по сравнению с таковой в конструкциях меньшей плотности геля (2 мг/мл фибриногена).

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность использования гемостатического препарата «Фибриностаг» для получения трехмерных конструкций — носителей клеток-предшественников и дифференцировки их в хондрогенном направлении.

**EX VIVO ЭКСПАНСИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С МЕЗЕНХИМНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ.** © О. В. Кулемина, Р. И. Дмитриева, И. Р. Минуллина, А. Ю. Зарицкой. С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова и НИЛ стволовых клеток ФГУ ФЦСКЭ им. акад. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) используется с целью восстановления гемопоэза при различных онкогематологических заболеваниях после использования сублетальных доз химиотерапевтических препаратов. Эффективность трансплантации зависит от количества введенных ГСК, характеризующихся как CD34+CD38-. В качестве источника ГСК используют кровь, костный мозг (КМ) и пуповинную кровь. In vivo пролиферация ГСК происходит в тесном контакте со стромальными (мезенхимными) клетками. Сокультивирование ГСК с мезенхимными стволовыми клетками (МСК) КМ является упрощенной моделью исследования межклеточных взаимодействий в гемопоэтической нише, и исследование экспансии ГСК в разных условиях может привести к выявлению путей ex vivo экспансии субпопуляций ГСК. Цель исследования: выявление вклада МСК в ex vivo экспансию CD34+ гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови (ПК) и КМ. Мононуклеарные клетки были выделены из образцов ПК и КМ и отсортированы с помощью магнитного сортирования (MACS) по CD34-маркеру на колонках 25 MS. Получение культур МСК проводили по стандартным методикам. Стимуляцию дифференцировок МСК в адипоцитарном и остеогенном направлениях производили со стандартным набором индукторов. Сокультивирование МСК и CD34 ГСК проводили в течение 4—8 сут в гемопоэтической среде Stem Span в присутствии IL-3, Flt-3L и SCF. Иммунофенотипирование выполнено с помощью проточной цитометрии (FACS Calibur), выбранные флуорохромы: CD34PE, CD45FITC, CD38PCP5.1. В результате 6-суточного сокультивирования МСК донора и CD34+клеток ПК общее количество ГСК увеличилось в 22 раза, популяция клеток-CD34+CD38- — в 47 раз, а к 8-м сут общее количество

во ГСК и CD34+CD38– ГСК увеличились в 56 и 44 раза соответственно. В результате 4-суточного сокультивирования МСК донора и CD34+-клеток костного мозга общее количество ГСК увеличилось в 6.3 раза, CD34+CD38– ГСК — в 6.6 раза. На 5-е сут аналогичного сокультивирования общее количество клеток увеличилось в 5.5 раза, популяции CD34+CD38– ГСК — в 11.4 раза. МСК, дифференцированные в адипоцитарном (адипо) и остеогенном (остео) направлениях, поддерживали экспансию CD34+-популяции как ПК, так и КМ. При этом экспансия ГСК ПК была существенно выше (КМ: МСК — Адипо 5.7 раза; МСК — Остео 6.7 раза; ПК: МСК — Адипо 32 раза, МСК — Остео 53 раза). Однако МСК — Адипо и МСК — Остео не поддерживали экспансию CD34+CD38– фракции КМ, тогда как прирост ГСК в этой фракции в ГСК ПК при сокультивировании с дифференцированными МСК также был существенным: Адипо 6.1 раза; Остео 11.2 раза. Показано, что мезенхимные клетки совместно с ростовыми факторами приводят к более выраженной экспансии ГСК, чем ростовые факторы отдельно. МСК, дифференцированные в адипоциты и остеогенные клетки, не были способны поддерживать экспансию ГСК КМ. Экспансия ГСК ПК не зависела от направления дифференцировки МСК.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 14.740.11.0004.

**СЛИЯНИЕ НЕЙРОНОВ И ПОЛУЧЕНИЕ МНОГОЯДЕРНЫХ КЛЕТОК МОЛЛЮСКА.** © А. А. Лактионова. Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

Двухядерные нервные клетки впервые были обнаружены Ремаком в 1837 г. С тех пор они сотни раз исследовались многочисленными гистологами (Ранвье, Штер, Догель, Шпильмаер, Бильшовский, Келикер, Альцгеймер и др.). Двухядерные нейроны обнаружены в различных центральных и периферических отделах нервной системы у человека, обезьяны, лошади, свиньи, овцы, кролика, кошки, собаки, крысы, мыши, морской свинки, лягушки, сельди и других животных как в норме, так и при патологии.

Вопрос о двухядерных и многоядерных нервных клетках затрагивает фундаментальную проблему синцитиальной связи в нервной системе и вопрос неделимости высокодифференцированных нейронов. Дискутируется механизм формирования многоядерности путем слияния нейронов или их amitotического деления.

В наших исследованиях нейроны освобождали от соединительноканальной капсулы ганглия и сателлитной глии с помощью протеолитической обработки. Затем клетки помещали в культуральную среду и с помощью центрифугирования (3000 об./мин в течение 15 мин) агрегировали и сохраняли в таком виде в культуральной среде в течение 2 сут. Затем с помощью стандартной трансмиссионной электронной микроскопии исследовали ультраструктуру границ контактирующих нейронов. При этих условиях живые нейроны образуют парные или многоклеточные агрегаты. Контактующие тела нейронов формируют 8-образные структуры, которые отделяются вакуолоподобными образованиями, образующимися путем значительных локальных расширений межклеточных щелей.

На полутонких срезах вдоль контактирующих границ нейронов удается обнаружить формирование множественных выпячиваний (цитоплазматических мостиков). Чередующиеся мостики и вакуолоподобные образования располагаются четко по границам клеток и могут служить достоверным ориентиром этих границ под световым микроскопом. Мостики представляют собой синцитиальные связи, объединяющие цитоплазму смежных клеток.

С помощью электронного микроскопа показано, что большинство мембран, разграничивающих цитоплазму соседних клеток в области мостиков, оказывается разрушенным. У ряда контактирующих нейронов вместо наружных клеточных мембран, разграничивающих цитоплазму клеток, обнаруживаются только короткие остаточные мембранные фрагменты. В остальных местах нейроплазма непосредственно переходит из одной клетки в другую.

Таким образом, в этих опытах удалось осуществить слияние нейронов и получить многоядерные клетки. Тем самым доказан механизм формирования многоядерности с помощью синцитиального слияния и подтверждены полученные нами ранее данные о том, что в нервной системе помимо химических синапсов и контактной мембранной связи существует третий тип межклеточных коммуникаций — синцитиальная связь.

**ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАНКА ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРИХОМОНИАЗА.** © Л. Ф. Литвинчук,<sup>1</sup> Н. В. Раздольская,<sup>2</sup> О. В. Гаврилова,<sup>2</sup> А. Б. Криворучко,<sup>2</sup> А. М. Иванов.<sup>2</sup> <sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития РФ и <sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург.

Урогенитальный трихомониаз является одним из широко распространенных заболеваний, передаваемых преимущественно половым путем. Его возбудителем является эукариотическое простейшее *Trichomonas vaginalis*. Этот паразит является анаэробной, плохо культивируемой формой. Рекомендуются в настоящее время комплексные питательные среды, включающие в себя сыворотки крови, не позволяют поддерживать вирулентные штаммы (Hobbs et al., 2008). Методы длительного сохранения организмов такого типа несовершенны. Отсутствие доступных референтных штаммов и данных по молекулярному типированию приводит к невозможности анализа эпидемиологии трихомониаза. Проблема создания и поддержания отечественного банка клинических изолятов *T. vaginalis* чрезвычайно актуальна. Охарактеризованные коллекционные модели могут применяться при тестировании фармацевтических препаратов и более углубленном изучении механизмов патогенеза.

Для осуществления долгосрочной криоконсервации *T. vaginalis* были поставлены следующие задачи: подготовка популяции *T. vaginalis* в концентрации не менее  $2.0-3.0 \cdot 10^7-10^8$  кл./мл в условиях *in vitro*, максимально приближенных к естественным условиям, при совместном культивировании с клеточными культурами (в системе паразит—хозяин); оптимизация состава криозащитной среды и подбор минимальной эффективной концентрации ДМСО; оптимизация режима охлаждения для последующего длительного хранения в условиях глубокого замораживания ( $-196$  °C); подготовка проекта паспорта штамма.

В исследование было включено 6 штаммов *T. vaginalis*, выделенных из клинического материала пациентов с острой формой трихомоноза. Изоляты получали на питательной среде ТУМ в течение 3—4 дней при температуре 37 °С. К клеточному монослою, выращенному в культуральном планшете, была добавлена суспензия клеток трихомонад в концентрации  $5.0 \cdot (10^4—10^5)$  кл./мл. После разрушения монослоя (24—48 ч) суспензию переносили в новый планшет. Многократные пассажи с применением антибактериальных и антимикотических препаратов способствовали формированию суспензии с концентрацией паразита, достаточной для криозамораживания.

Из 6 использованных клеточных линий (HEP-2, L-41, MA-104, MDCK, VERO и L-929) наиболее эффективной оказалась линия L-41. В смесь для криозамораживания входили: криозащитная среда для культур клеток (70—75 %), суспензия трихомонад ( $10^7—10^8$  кл./мл), суспензия L-41 и DMSO (5 %), сыворотка КРС (20 %). При консервации в течение 2—3 лет в соответствии с предложенным протоколом все штаммы после размораживания сохраняли подвижность, характерную морфологию и способность к разрушению монослоя в модели *in vitro* за 1 сут (Литвинчук и др., 2011).

В паспорте штамма в качестве объективного критерия вирулентности предлагается использовать скорость разрушения монослоя при инфицировании простейшими в стандартизованных условиях.

#### Список литературы

Hobbs M. M., Sena A. C. et al. 2008. Sex. Transm. Diseases. IV ed. 769—771.

Литвинчук Л. Ф., Раздольская Н. В. и др. 2011. Клеточные культуры. Инф. Бюл. Вып. 27.

**РАЗЛИЧНАЯ СИГНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТОК МЫШИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ.** © Н. В. Лифанцева, О. Ф. Гордеева. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва.

Способность плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) дифференцироваться в производные трех зародышевых листков открывает широкие перспективы для их использования в регенеративной медицине при различных заболеваниях. Однако в настоящий момент клиническое применения ЭСК невозможно из-за риска формирования тератом, так как в процессе дифференцировки ЭСК в культуре сохраняются недифференцированные клетки. Механизмы неполной дифференцировки ЭСК до сих пор остаются неясными, однако существует точка зрения, согласно которой сохраняющиеся недифференцированными ЭСК являются трансформированными клетками. В нашей работе мы исследовали механизмы индуцированной дифференцировки ЭСК и их малигнизированных аналогов — клеток эмбриональной тератокарциномы (ЭТК). Мышьиные ЭСК R1 и ЭТК F9 подвергали воздействию ретиноевой кислоты в течение 10 сут. Наши результаты показали, что к 10 сут воздействия ретиноевой кислотой происходило значительное снижение роста и числа Oct4-позитивных клеток в обеих популяциях, однако в течение последующих 3 сут после отмены ретиноевой кислоты число Oct4-позитивных клеток в попу-

ляции дифференцирующихся ЭСК вновь возрастало, тогда как в популяциях ЭТК их число не изменялось. При трансплантации в иммунодефицитных мышях Nude дифференцирующиеся ЭСК формируют тератомы, а при трансплантации ЭТК опухолей у животных-реципиентов выявлено не было. Для того чтобы прояснить механизмы, регулирующие дифференцировку ЭСК и ЭТК в популяциях дифференцирующихся клеток, был проведен анализ транскрипционных профилей генов-компонентов различных сигнальных путей. Анализ показал, что в процессе дифференцировки ЭСК и ЭТК не происходило значительных изменений в уровне экспрессии рецепторов *Actr1*, *Actr2*, *Bmpr1*, *Tgfb1*, *Fgfr*, *Egfr* и факторов *Tgfb1* и *Bmp4*, тогда как экспрессия факторов *Nodal*, *Lefty1*, *Lefty2* и *Gdf3* постепенно снижалась к 10-м сут дифференцировки и коррелировала с экспрессией фактора *Oct4*. Наиболее существенные различия между ЭСК и ЭТК были выявлены в экспрессии факторов *Fgf2*, *Egf* и *Activin A*. Так, в дифференцирующихся ЭСК возрастал уровень экспрессии фактора *Fgf2*, а экспрессия фактора *Egf* не детектировалась. Напротив, в ходе дифференцировки ЭТК мРНК фактора *Fgf2* не была выявлена, а экспрессия фактора EGF возрастала. Real-time PCR-анализ показал, что в недифференцированных ЭСК экспрессия *Activin A* была в 160 раз выше, чем в недифференцированных ЭТК. К 10-м сут дифференцировки уровень экспрессии возрастал в обеих клеточных популяциях, но динамика этого процесса была различна для ЭСК и ЭТК. В ЭСК экспрессия *Activin A* практически не изменялась до 5-х сут дифференцировки и возрастала в 7.7 раза к 10-м сут. Напротив, в ЭТК экспрессия *Activin A* значительно увеличивалась с 3-х сут воздействия, и к 10-м сут уровень экспрессии возрастал более чем в 1000 раз. На основании полученных результатов мы предполагаем, что различная динамика дифференцировки ЭСК и ЭТК может быть обусловлена различной активностью сигнальных путей, активируемых факторами *Activin A*, *Fgf2* и *Egf*.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01307 и 11-04-00379).

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФЕТАЛЬНЫХ НЕЙРОКЛЕТОК — ПРЕКУРСОРОВ (НКП).** © Л. Д. Любич. ДУ «Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова АМН Украины», Киев.

В связи с перспективой использования культур нейрогенных стволовых клеток и клеток-предшественников для трансплантации при ряде нейродегенеративных заболеваний ЦНС возникает необходимость изучения динамики их роста и дифференцировки с подбором оптимальных условий культивирования. Целью исследования было изучение иммунобиологических свойств культивируемых фетальных НКП.

Материалом для исследования служили НКП фетального мозга крысы (E12-16) и НКП человека из нативного абортного материала (5—12 нед гестации). НКП культивировали в бессывороточной среде DMEM/F12 (Sigma, Германия) с добавлением препаратов инсулин-трансферрин-селенит (ИТС) (PanEco Ltd., Россия), ретинола ацетата, FGF, EGF и ретиноевой кислоты (Sigma, Германия). В процессе культивирования НКП проводили цитологи-

ческие, иммуногистохимические, иммуноцитофлуориметрические и ПЦР-исследования.

В контрольных культурах в течение всего периода наблюдения (до 22 сут) НКП сохраняли шаровидную форму без признаков дифференцировки. В опытах с добавлением в культуры НКП ретинола ацетата на 15-е сут наблюдения формировались многоклеточные шаровидные агрегаты — нейросферы. При сочетанном последовательном добавлении инсулина и ретинола ацетата в этот срок в культурах появлялись униполярные клетки грушевидной формы с короткими конусовидными отростками (доля таких клеток составляла 8,5 %). При добавлении в культуральную среду ретиноевой кислоты среди округленных недифференцированных клеток появлялись отростчатые клетки с обильной цитоплазмой и наличием отростков — коротких конусовидных, а также длинных, хорошо выраженных, с признаками ветвления. В ядрах 20—30 % нейроцитов треугольной формы выявлялись четко выраженные крупные ядрышки, характерные для нейробластных форм. С увеличением срока культивирования возрастала доля НКП, экспрессирующих виментин — маркер стволовых/прогениторных клеток, — с 25 до 80—85 %. Количество клеток, экспрессирующих GFAP — маркер глиобластов и астроцитов, — увеличивалось с 60 до 80 %.

Как известно, уровень экспрессии нейроцитами антигенов гистосовместимости обуславливает их распознавание иммунокомпетентными клетками при трансплантации, а также индукцию специфического ответа иммунной системы и последующее приживание или отторжение *in vivo*. Установлено, что доля HLA-A,B,C- и HLA-DR-экспрессирующих нейроцитов в условиях культивирования была наименьшей среди НКП человека 5-й нед гестации и повышалась при культивировании НКП 8—9-й нед гестации. При этом экспрессия исследованных аллелей мРНК HLA-A1, особенно HLA-DRa1, возрастала от полного отсутствия или незначительного уровня в НКП человека 5—9-й нед гестации до выраженной экспрессии в нейроцитах зрелого мозга. При культивировании НКП человека 5—9-й нед гестации в среде DMEM+ретинола ацетат наблюдалось снижение количества клеток, экспрессирующих антигены HLA I и II классов как на протеиновом уровне, так и на уровне мРНК, тогда как присутствие в питательной среде FGF способствовало сохранению их количества, а наличие EGF — их нарастанию.

Таким образом, подбор условий культивирования позволяет получить культуры НКП с заданными свойствами: обогащенные виментином + нейрогенными предшественниками, с отсутствием экспрессии антигенов гистосовместимости, сохраняющие свою полипотентность и способность к дифференцировке в нейрональном и глиальном направлениях.

**ПОЛУЧЕНИЕ БЕСКЛЕТОЧНЫХ МАТРИЦ-НОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ НАТИВНЫХ ТКАНЕЙ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ И МИОКАРДА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА.** © М. В. Егорова, Э. Ф. Муслимова, Ю. В. Роговская, С. А. Афанасьев, Ш. Д. Ахмедов. НИИ кардиологии СО РАМН, Томск.

В настоящее время быстрое прогрессирование сердечно-сосудистой хирургии во многом связано с успехами кардиоваскулярной тканевой инженерии, в частности с разработкой трансплантатов на основе соединительно-

тканых каркасов, соответствующих функциональным особенностям нативных тканей.

Цель работы — разработка методики получения бесклеточных матриц-носителей на основе нативных тканей кровеносных сосудов и миокарда лабораторных животных и человека.

Работу проводили на 40 взрослых крысах линии Вистар и 20 интраоперационных биоптатах сосудов человека с использованием реактивов фирмы Sigma (США). Морфологический контроль состояния биологического материала проводили с использованием стандартной световой микроскопии.

Обработку оптимальных режимов получения бесклеточных матриц-носителей проводили на сосудах лабораторных животных (крысы линии Вистар). Проведение пробных отмывок сосудов от клеточных элементов по опубликованному в литературе протоколу показало, что сосуды не выдерживали перфузию в течение 16—48 ч агрессивными растворами детергентов и трипсина. Вследствие этого суммарная обработка была сведена до 4—5 ч, с морфологическим контролем при каждой смене растворов.

Мы провели сравнительный анализ влияния различных растворов на состояние сосуда при его перфузии этими растворами. Результаты показали, что наиболее эффективным и малотравматичным является использование растворов детергентов SDS и TritonX-100. Далее эксперименты были направлены на уменьшение времени воздействия детергентов на сосуды с сохранением эффективности децеллюляризации. В результате нами был разработан универсальный протокол децеллюляризации.

У крысы под эфирным наркозом выделяли единым органокомплексом сердце и брюшную аорту. Органы помещали в дистиллированную воду, препарировали и отсекали аорту. Биоптаты сосудов человека были получены при проведении сосудистых операций. Аорту крысы и сосуд человека (а. *mammaria* или а. *radialis*) после очистки от сопутствующих тканей помещали в перфузионную систему, где при комнатной температуре подвергали децеллюляризации. Сосуд 10—15 мин отмывали от крови дистиллированной водой, затем обрабатывали 1%-ным водным раствором SDS в течение 1 ч, прокачивая раствор перистальтическим насосом со скоростью 20 мл/мин. Далее раствор SDS заменяли на 1%-ный водный раствор Triton X-100 и перфузировали 1 ч. После этого в течение 10—15 мин сосуд отмывали от детергентов дистиллированной водой, затем 10—15 мин физиологическим раствором. При необходимости сосуд обрабатывали раствором, содержащим по 20 мкг/мл ДНКазы и РНКазы, приготовленным на основе физиологического раствора, pH 7.4. Раствор прокачивали через сосуд 1 ч при 37 °С, затем сосуд отмывали охлажденным физиологическим раствором.

Таким образом, по разработанной нами методике суммарное время обработки сосуда, начиная с отмывания его от крови и заканчивая этапом хранения, составляет не более 4 ч. Гистологические исследования, проведенные после выполнения описанной технологии, подтвердили ее универсальность для сосудов животных и человека. Разработанный протокол оказался эффективным и для децеллюляризации целого сердца крысы.

**ВЫЯВЛЕНИЕ IN VITRO ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ГЛАЗА У НИЗШИХ И ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ.**

© Ю. П. Новикова, Ю. В. Маркитантова, Э. Н. Григорян. Институт биологии развития РАН, Москва.

Для изучения поведения клеток сетчатки глаза в условиях повреждения, а также поиска факторов, поддерживающих жизнеспособность клеток и их взаимодействия, нужны адекватные модели «*in vivo-like in vitro*». Такие модели крайне необходимы, в том числе и для поиска и характеристики малодифференцированных клеток — источников регенерации сетчатки, а также факторов, активирующих эти источники у низших и высших позвоночных.

Нам удалось разработать способ 3D-роллерного культивирования изолированных тканей глаза и их комплексов, обеспечивающий не только длительное выживание, но и восстановление тканей. При этом методе культивирования благодаря постоянной ротации образцы тканей глаза взрослых животных, находясь в обновляемой среде и не взаимодействуя с субстратом, образуют замкнутые структуры, внутри которых поддерживаются тканевая организация и межклеточные взаимодействия. Это в свою очередь позволяет наблюдать за изменениями клеточного поведения *ex vivo* на протяжении 30 сут и более. К настоящему времени таким способом нам удалось культивировать нейральную сетчатку и комплекс «пигментный эпителий + сосудистая оболочка (хороид) + склеральная оболочка» взрослых тритонов (половозрелые *Pl. waltl*) и крыс-альбиносов (2 мес, линия Вистар).

При органотипическом культивировании *in vitro* сетчатки тритона и крысы образовывали замкнутые шаровидные структуры (сфероиды), внутри которых обнаруживалась ДНК-синтезирующая и митотическая активность всех способных к этому клеток. В случае амфибий BrdU и PCNA позитивные клетки и картины митозов выявлялись как в ростовой зоне сетчатки (*ora serrata*), так и в ее ядерных слоях. Это приводило к образованию внутри сфероида большого пула малодифференцированных клеток, способных к делениям, миграции и замещению погибших клеток, в том числе фоторецепторов. Сетчатка крыс демонстрировала активные клеточные перемещения или транслокацию тел нейронов наружного ядерного слоя вовнутрь, а также митотическую активность глиальных клеток Мюллера и резидентных макрофагов. При этом случаев дедифференцировки и(или) изменений фенотипа клеток в сетчатке крыс зарегистрировано не было.

При культивировании комплекса «пигментный эпителий + хороид + склера», выделенного из глаз тритонов, пигментный эпителий не претерпевал существенных морфологических изменений, быстро закрывался наплывающими клетками склеры, но в открытых участках проявлял способность экспрессировать пан-нейральный белок (НФ-200). В условиях, направленных на предотвращение закрытия эпителия фибробластами склеры, он претерпевал трансдифференцировку и образовывал ранний регенерат сетчатки сходным с *in vivo* способом. При культивировании без склеральной оболочки клетки пигментного эпителия активно включали предшественник синтеза ДНК BrdU, но при этом одна часть клеток превращалась в меланофаги, другая формировала структуру, напоминающую лентоид — аналог хрусталика. Клетки пигментного эпителия крыс, культивированного в составе задней стенки глаза, в редких случаях также входили в фазу М митотического цикла, вымещались из слоя, претерпевали фенотипические изменения и экспрессировали макрофагальный антиген. В отсутствие взаимодействия с

сетчаткой, вымещаясь или сохраняясь в слое, они проявляли свойства фагоцитов. Эти события, происходящие с клетками пигментного эпителия крысы в условиях культивирования *in vitro*, сходны с теми, что наблюдаются при различных патологиях сетчатки *in vivo* у животных и человека. В настоящее время мы разрабатываем подходы для направленного изменения поведения клеток сетчатки и пигментного эпителия глаза с помощью манипулирования со средней культивирования.

Для подтверждения данных, полученных морфологически и иммунохимически, было проведено молекулярно-биологическое исследование профиля генов, кодирующих маркерные специфические и регуляторные белки в нативных тканях глаза и при роллерном культивировании в течение 14 сут.

Полученные нами данные в целом свидетельствуют о том, что обнаруженная морфологически и с помощью иммунохимических маркеров активация клеток-предшественников для регенерации сетчатки тритонов в условиях *in vitro* находит подтверждение и в экспрессии ряда генов. Полученные нами данные позволяют надеяться на успешное применение разработанного метода *in vitro* для решения вопросов, связанных с поиском клеток источников регенерации сетчатки и с усилением регенерационных ответов клеток глаза взрослых позвоночных и человека.

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК.** © Р. Я. Подчерняева,<sup>1</sup> Г. Р. Михайлова,<sup>1</sup> И. А. Суетина,<sup>1</sup> О. А. Лопатина,<sup>1</sup> И. И. Бобринецкий,<sup>2</sup> Р. А. Морозов,<sup>2</sup> А. С. Селезнев.<sup>2</sup> <sup>1</sup>ФГУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздравсоцразвития РФ, Москва, и <sup>2</sup> Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный институт электронной техники (технический университет)».

Применение углеродных нанотрубок является одним из перспективных направлений нанотехнологии. Углеродные нанотрубки (УНТ) могут быть использованы для культивирования клеточных линий в качестве каркасного материала, который создает микроокружение клеток, обеспечивающее их пролиферацию, активность и жизнеспособность.

Целью данной работы являлось исследование биологической совместимости перевиваемых культур клеток и УНТ отечественного производства.

Для экспериментов по культивированию из Коллекции клеточных культур Института вирусологии были выбраны нормальные клетки фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ), клетки почки зеленой марышки (*Vero*) и опухольевые клетки глиобластомы человека (GL6).

В качестве каркасообразующего материала были использованы однослойные углеродные нанотрубки (ОСНТ) и многослойные углеродные нанотрубки (МСНТ) от 3 крупнейших российских производителей: ОСНТ — от Института проблем химической физики РАН, образец МСНТ № 1 — от ООО НТЦ «ГраНаТ» и образец МСНТ № 2 — от ООО «НаноТехЦентр».

Клеточные линии в посевной дозе 10<sup>5</sup> кл./мл культивировали на покровных стеклах с нанесенным на них слоем УНТ в среде Игла MEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «НПО «ПанЭко», Москва) в термостате при 37 °С в течение 72 ч. Для изу-

чения морфологии клетки фиксировали и окрашивали азур-эозином по Романовскому по стандартной методике.

При использовании клеточной линии Vero отмечен более активный рост клеток с образованием густого клеточного монослоя на стеклах, покрытых ОСНТ, в отличие от стекол с МСНТ. Подобную морфологическую картину также отмечали при использовании изучаемых видов нанотрубок для культивирования клеток ФЭЧ.

Культуральная линия GL6 на покровных стеклах, покрытых ОСНТ и МСНТ, создавала структуру монослоя с беспорядочным расположением и формой клеток.

Основной причиной цитотоксичности нанотрубок считается сильное взаимодействие нанотрубок с клеточной мембраной, связанное с последующим прохождением нанотрубок через мембрану и движением внутри цитоплазмы. При этом существенна роль размера нанотрубок и их агрегационного состояния: более короткие, находящиеся в растворе УНТ могут проникать в клетку, тогда как длинные нанотрубки, закрепленные на носителе, из-за сильного Ван-дер-Ваальсового взаимодействия практически неподвижны.

Таким образом, следует ожидать меньший токсический эффект со стороны ОСНТ на носителе по сравнению с МСНТ, что коррелирует с результатами по снижению жизнеспособности и пролиферативной активности на МСНТ опухолевых клеток глиобластомы человека.

На основании проведенных исследований изученные образцы УНТ отечественного производства были малотоксичны для всех клеточных линий и в дальнейшем могут быть использованы для культивирования перевиваемых культур клеток.

**ИНГИБИТОРЫ HDAC ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ В E1A+RAS-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ, НЕ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БЕЛОК GADD45 $\alpha$ .**  
© А. К. Пожидаева, М. В. Абрамова, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, leff0308@mail.ru.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDAC) способны подавлять пролиферацию опухолевых клеток, индуцируя апоптоз и(или) остановку клеточного деления. Благодаря этому в настоящее время большое внимание уделяется ингибиторам HDAC как новому многообещающему классу противоопухолевых препаратов. Выбор антипролиферативного эффекта — апоптоз или остановка клеточного цикла — зависит от типа трансформации и клеточного контекста. Однако точные механизмы антипролиферативного действия ингибиторов HDAC остаются невыясненными.

Мы исследовали роль белка Gadd45 $\alpha$  в антипролиферативном эффекте ингибиторов HDAC бутирата натрия (NaB) и трихостатина А (TSA) в эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras. Gadd45 $\alpha$  известен как белок, индуцируемый различными ДНК-повреждающими факторами и стрессами, которые сопровождаются блоком пролиферации. Ранее была установлена роль Gadd45 $\alpha$  в таких клеточных процессах, как пролиферация, репарация ДНК, контроль клеточного цикла и апоптоз.

Отсутствие в клетках белка Gadd45? (клетки Gadd-/-) не приводит к исчезновению индуцированного ингибиторами HDAC блока клеточного цикла, характерного для исходных трансформантов (клетки MERas). Однако в

отличие клеток MERas, где продолжительная обработка ингибиторами HDAC индуцирует преждевременное клеточное старение, клетки Gadd-/- подвергаются апоптотической гибели при действии NaB и TSA.

Исследовали активность антиапоптотического транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в экспериментах по трансфекции репортерного вектора 3\*kB-luc, кодирующего люциферазу под контролем NF- $\kappa$ B-регулируемого промотора. Оказалось, что в отличие от трансформантов MERas, где ингибиторы HDAC активируют NF- $\kappa$ B в десятки раз, в клетках Gadd45-/- наблюдается небольшое повышение активности NF- $\kappa$ B-регулируемого промотора (в 2 раза) на короткое время (24 ч). При дальнейшем воздействии ингибиторами HDAC (48—72 ч) активность падает до уровня, ниже базального. Методом иммуноблоттинга мы показали, что в клетках Gadd45-/- при воздействии бутирата натрия накапливаются расщепленные формы каспазы 3, что говорит об активации этой протеазы в клетках. Далее эти данные были подтверждены в экспериментах по расщеплению каспазой 3 синтетического колориметрического субстрата. Было показано, что активность каспазы 3 при воздействии NaB в неэкспрессирующих Gadd45 $\alpha$  клетках возрастает в 10 раз, тогда как в контрольных трансформантах NaB вызывал снижение активности каспазы 3 в отношении синтетического субстрата.

Известно, что MAP-киназы p38 и JNK, принимающие участие в программах старения и апоптоза, являются мишенями Gadd45 $\alpha$ . В связи с этим методом иммуноблоттинга исследовали динамику содержания этих белков в клетках MERas и Gadd45-/- при воздействии ингибитором HDAC. Мы не показали увеличения количества фосфорилированных форм p38 и JNK после обработки бутиратом натрия в неэкспрессирующих Gadd45 $\alpha$  фибробластах, в то время как в исходных E1A+Ras-трансформантах происходило существенное накопление данных стресс-киназ после 72 ч воздействия. Следовательно, по-видимому, отсутствие в клетках Gadd45 $\alpha$  блокирует запуск данных киназных каскадов.

Таким образом, мы показали, что апоптоз в фибробластах Gadd45-/-, вызываемый действием ингибиторов HDAC, опосредуется активацией в клетках каспаз и ингибированием активности антиапоптотического фактора NF $\kappa$ B, а также модулированием активности сигнальных каскадов с участием p38 и JNK.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00466) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ТКАНИ ЯИЧНИКОВ ЧЕЛОВЕКА.**  
© А. М. Полстяной,<sup>1</sup> А. В. Еремеев,<sup>1,2</sup> Ю. И. Шеина,<sup>1</sup> Г. Н. Полстяная,<sup>1</sup> А. В. Светлаков.<sup>1,1</sup> ООО «Красноярский центр репродуктивной медицины» и <sup>2</sup> Институт биофизики СО РАН, Красноярск.

Исследования в области репродуктивной биологии, посвященные возможности восстановления функции яичников, стали одними из самых интересных за последнее десятилетие. В экспериментах исследователи добились определенных успехов — выделена культура клеток из яичников взрослых мышей и показана возможность вос-

становления фертильности при введении данной культуры в яичники стерильных самок. Было выдвинуто предположение о наличии подобных клеток в ткани яичников человека. Однако результаты работ противоречивы и не позволяют однозначно заключить о наличии или отсутствии клеток-предшественников в ткани яичника человека и их возможной роли в нео-оогенезе.

Целью нашего исследования стало выделение культуры клеток-предшественников половых из ткани яичника женщин в репродуктивном возрасте.

Для работы использовали образцы ткани яичников после гинекологических оперативных вмешательств у 5 пациенток с их письменного согласия. Белочную оболочку фрагментировали, высаживали в культуральную среду DMEM/F12 с 10 % ЭТС и добавлением аминокислот, витаминов или же в среду mTeSR с заместителем сыворотки. Культуры выращивали на 48-луночных плашках в гумидных условиях, со сменой среды 1 раз в 3—4 сут. Поверхность лунок покрывали желатином или Матригелем. Полученные культуры были характеризованы иммуноцитохимически по маркерам SSEA3-4, c-kit, tra-80, CD30 и klf-4 — маркерам стволовых клеток, а также сут-19, CD90 и CD105. Метод ПЦР для выявления маркеров половых клеток — ZP3 (один из компонентов блестящей оболочки яйцеклетки) и STELLA (маркер ранних половых клеток).

В результате проведенных экспериментов из всех 5 образцов ткани яичника были получены различные по составу культуры. Тип клеток, пролиферирующих в культуре, во многом зависел от условий культивирования. В культурах, выращенных на среде DMEM/F12, обогащенной ЭТС, в основном пролиферировали клетки, экспрессирующие маркеры соединительной ткани (CD105+ и CD90+). Основную массу клеток составляли фибробластоподобные клетки с достаточно высокой пролиферативной активностью. Однако к 3—5-му пассажу отмечались признаки старения в этой культуре, и клетки дегенерировали. Других маркеров в данных культурах выявить не удалось. Маркеров женских половых клеток методом ПЦР выявить не удалось.

В культурах, выращенных на среде mTeSR, обогащенной заместителем сыворотки, были получены клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для стволовых клеток. Клетки (от 20 до 40 мкм) были сгруппированы в колонии. Они имели округлую форму с небольшим количеством коротких отростков, крупное ядро и небольшое количество цитоплазмы, отличались достаточно высокой пролиферативной способностью. Культура пережила более 30 пассажей, затем была криоконсервирована. После разморозки культура прошла 10 пассажей без изменения морфологии. При переводе этой культуры на среду DMEM/F12 с ЭТС данные клетки экспрессировали SSEA3-4, c-kit, tra-80, cd30 и klf-4, а также была выявлена экспрессия CD90 и CD105. Цитогенетический анализ показал нормальный кариотип 46, XX. Методом ПЦР была выявлена экспрессия генов ZP3 и STELLA.

В результате проведенной экспериментальной работы была получена культура клеток, которые, вероятнее всего, являются предшественниками женских гамет. Культура имеет высокий потенциал к самовоспроизведению без нарушения морфологии клеток и с сохранением интактного кариотипа. Можно предположить, что клетки полученной культуры при определенных условиях культивирования могут дифференцироваться в зрелые половые клетки. Более того, высока вероятность того, что необхо-

димые условия могут быть получены при трансплантации культуры в яичник, где физиологически существует необходимая ниша для дифференцировки клеток-предшественников.

Дальнейшие исследования в этом направлении позволят расширить представления о репродуктивной биологии человека. Результаты этой работы могут лечь в основу медицинских протоколов лечения различных форм женского бесплодия.

**КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМАТОГОНИЙ ТИПА А ХРЯКА.** © М. В. Полякова, И. П. Савченкова. Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко РАСХН, Москва.

В настоящее время успешно разрабатываются методы длительного культивирования стволовых сперматогиальных клеток (СПСК) млекопитающих. Криоконсервация сперматогионий представляет интерес с точки зрения регенерации тканевых систем в целом. Предварительная изоляция СПСК из биоптатов семенников перед химиотерапией пациентов и их криоконсервация являются актуальными. Способность СПСК сохранять жизнеспособность после криоконсервации и пролиферировать в культуре открывает новые возможности для генной и клеточной терапии мужского бесплодия, коррекции наследуемых генетических нарушений, создания трансгенных животных, а также сохранения редких и исчезающих видов. Целью наших исследований было разработать наиболее эффективный способ для сохранения этого ценного материала и оценить жизнеспособность сперматогионий типа А хряка после криоконсервации в жидком азоте (–196 °С). Для получения культур сперматогенных клеток использовали семенники от неполовозрелых помесных хряков 60-суточного возраста. После декапсуляции тестикулы подвергались механической, а затем ферментативной обработке. Очистку сперматогионий от соматических клеток проводили по адгезии. Средой для замораживания была среда DMEM с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л). Клетки замораживали в концентрациях  $1 \cdot 10^6$  кл./мл. Изучали влияние объема сыворотки крови плодов коров (СПК) фирмы NuClone и криопротектора ДМСО (ПанЭко) в среде для замораживания на жизнеспособность сперматогионий типа А хряка. Для этого клетки замораживали в криопротекторных средах, которые содержали 20 и 40 % СПК и 5, 10 и 15 % ДМСО соответственно. Жизнеспособность клеток после оттаивания оценивали по окраске трипановым синим (0.1%-ного раствор). Для подтверждения жизнеспособности сперматогионий использовали кратковременное культивирование их на фидерных слоях. Оценка проводилась визуально, с помощью программы AxioVision Rel. 4.8 и микроскопа Carl Zeiss. Ранее проведенные нами гистологические исследования показали, что оптимальным сроком для получения обогащенной культуры сперматогионий типа А являются 60—80 сут после рождения хряка. Результаты проведенных исследований показали, что криопротекторная среда, содержащая 15 % ДМСО и 40 % СПК, обеспечивает наиболее высокий выход живых клеток (86 %) по сравнению с другими комбинациями, которые использовались в наших экспериментах. Однако при переносе сперматогионий на фидерные слои наблюдали их остановку в росте. Увеличение концентрации СПК в среде для заморозки способствовало увеличению числа жизнеспособных сперматогионий хря-

ка. Наилучшие результаты были получены при замораживании клеток в криосреде, которая содержала 50 % ДМЕМ, 40 % СПК и 10 % ДМСО. Число жизнеспособных клеток от общего числа составляло 68 % сразу после оттаивания, а при посеве их на фидерный слой эти клетки сохраняли способность к размножению. Таким образом, нами было показано, что сперматогонии типа А хряка можно сохранить, подвергнув их криоконсервации. Учитывая высокую степень консервативности сперматогонеза млекопитающих, можно предположить, что разработанные нами условия для сохранения сперматогоний хряка будут полезны для других видов животных и человека. Дальнейшая работа направлена на изучение сохранения сперматогониями своих функций после размораживания по способности возобновлять экзогенный сперматогенез.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА И БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ХРЯЦА.** © А. С. Пономарева,<sup>1,2</sup> В. А. Сургучева,<sup>2,3</sup> Н. П. Можейко,<sup>3</sup> И. М. Ильинский,<sup>3</sup> В. И. Севастьянов.<sup>2,3</sup> <sup>1</sup>Московский физико-технический институт (Государственный университет), <sup>2</sup>АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» и <sup>3</sup>ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва.

Использование тканеинженерных конструкций (ТИК), представляющих собой сочетание биостабильного или биодеградируемого матрикса (каркаса, носителя) на основе материалов различной природы и нативных биологических структур, позволяет в той или иной степени компенсировать функции поврежденных или утраченных органов и тканей. Для создания ТИК необходимо выбрать источник получения клеток и биосовместимый матрикс, способный выполнять функции субстрата для клеточных культур и обеспечивать их жизнедеятельность. В качестве клеточной компоненты ТИК использовали мезенхимные стромальные клетки (МСК) из жировой ткани человека (Егорова и др., 2009). Матриксами для клеток служили биополимерные имплантаты (производитель ЗАО «БИОМИР сервис», Краснознаменск): композиция гетерогенного имплантируемого геля *Сферо*®ГЕЛЬ на основе компонентов внеклеточного матрикса сельскохозяйственных животных и мембрана имплантируемая биополимерная *ЭластоПОБ*®-3D, представляющая собой трехмерный пористый матрикс из нанокompозитного материала на основе бактериального сополимера поли(оксибутират-со-оксивалерат)а. Выбранные имплантаты обладают высокими биосовместимыми и биостимулирующими свойствами и разрешены к клиническому применению (Севастьянов, 2009). Для исследования способности МСК дифференцироваться в хондрогенном направлении 10 мкл суспензии клеток в концентрации  $16 \cdot 10^6$  кл./мл помещали в хондрогенную среду и культивировали 14 сут. Для изучения дифференцировки МСК на поверхности *Сферо*®ГЕЛЬ  $9 \cdot 10^5$  клеток смешивали с 0,5 мл геля и культивировали в хондрогенной среде 28 сут. Поверхность *ЭластоПОБ*®-3D засеивали суспензией МСК в концентрации  $6,1 \cdot 10^6$  кл./мл и культивировали в хондрогенной среде 28 сут. На 2—3-и сут после индукции хондрогенной дифференцировки в культуре МСК образовывали трехмерную структуру в виде непрозрачных микро-

сфер диаметром ~1 мм. При дифференцировке МСК совместно со *Сферо*®ГЕЛЬ наблюдали образование непрозрачных трехмерных структур размером ~6 мм. Результаты экспериментов оценивали гистологически. Все гистологические срезы давали окрашивание альциановым синим на гликозаминогликаны, которые являются одним из основных компонентов внеклеточного матрикса хрящевой ткани. Анализ гистологической картины срезов показал наличие структур, характерных для нормальной хрящевой ткани. В препаратах также отсутствовали признаки трансформации хондроцитов в фибробласты. В работе показана эффективность получения хрящеподобных структур из МСК подкожно-жировой клетчатки человека в культуре и на основе биополимерных матриксов *Сферо*®ГЕЛЬ и *ЭластоПОБ*®-3D.

### Список литературы

Егорова В. А., Пономарева А. С., Богданова Н. Б., Абрамов В. Ю., Севастьянов В. И. 2009. Характеристика фенотипа мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека методом проточной цитометрии, Технологии живых систем. 6 (5) : 40—46.

Севастьянов В. И. 2009. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия. В кн.: Вестник трансплантологии и искусственных органов. 11 (3) : 69—80.

**ИНАКТИВАЦИЯ РНК-ХЕЛИКАЗЫ p68 (ddx5) ТОРМОЗИТ ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ.** © Н. В. Пономарцев, М. А. Лисковых, Е. Н. Толкунова, Н. И. Енукашвили. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, natella@mail.cytspb.rssi.ru

Исследование механизма регуляции пролиферации клеток является важной частью процесса поиска новых решений в терапии различных заболеваний. Белок p68 (ddx5) относится к семейству белков DEAD-бокс-содержащих РНК-хеликаз. Показано, что он играет важную роль во многих процессах клетки. Предполагается, что этот белок участвует в процессинге рибосомальной РНК, дифференцировке клеток и клеточном делении.

Целью нашей работы являлось изучение влияния инактивации транскрипта ddx5 на пролиферативную активность клеток.

В эксперименте использовалась моноцитоподобная клеточная линия Jurkat, полученная из периферической крови больного лейкемией. Клетки трансфицировались лентивирусной конструкцией, которая содержала в транскрибируемой области последовательность для инактивации транскрипта ddx5; аналогичной конструкцией, где последовательность анти-ddx5 была заменена на ген белка GFP для подбора условий трансфекции и оценки ее эффективности. Через 48 и 72 ч после внесения вируса в культуральную среду клетки (не трансфицированные GFP) окрашивали красителем CFDA для определения пролиферативной активности клеток. Стадию клеточного цикла клеток, отрицательных по p68, определяли методом двойной окраски клеток антителами к p68 и йодистым пропидием. Данные анализировали на проточном цитометре.

В отличие от клеток, трансфицированных GFP-содержащим лентивирусом, 60 % анти-p68-трансфицированных клеток, отрицательных по окраске на p68, располагается в фазе G<sub>1</sub>, в контрольных (ничем не трансфицированных) клетках в G<sub>1</sub> попадало всего 24 % клеток. При этом в

контрольной группе половина клеток в G<sub>1</sub>-фазе (12.6 % от общего числа клеток) также была отрицательной по ddx5, что дополнительно подтверждает результаты трансфекции. Окрашивание клеток CFDA показало, что у 57 % трансфицированных клеток скорость пролиферации падала. В контрольных клетках только 14 % имели низкую скорость пролиферации.

Таким образом, мы предполагаем, что белок DDX5 (p68 РНК-хеликаза) принимает участие в переходе клетки от фазы G<sub>1</sub> к фазе S и играет важную роль в клеточной пролиферации.

**РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕКТИНОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ БИОПОЛИМЕРНО-КЛЕТОЧНЫХ ИМПЛАНТАТОВ.** © П. А. Попкова,<sup>1,2</sup> Н. Е. Зюмченко,<sup>2</sup> А. В. Щерблыкина,<sup>1</sup> Н. П. Токмакова,<sup>2</sup> И. А. Кирсанова,<sup>2</sup> Ю. С. Хотимченко,<sup>1,2</sup> А. П. Анисимов,<sup>2</sup> В. В. Ковалев,<sup>1</sup> Е. А. Коленченко,<sup>1</sup> В. В. Кумейко<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН и <sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет, Владивосток.

Пектины — углеводы внеклеточного матрикса растений, которые могут быть использованы в качестве фармакологически активных субстанций, обладают относительно низкой скоростью биодegradации в организмах млекопитающих, что обеспечивает пролонгированное действие и эффективность препарата. По уже имеющимся первичным данным можно судить о том, что низкомолекулярные производные пектинов могут способствовать подавлению канцерогенеза в некоторых модельных системах. Однако нет сведений о том, каковы должны быть степень полимеризации, мономерный состав и пространственная организация пектиновых веществ для более эффективного проявления их антипролиферативных свойств. Исследования процессов получения и выявления физиологической активности низкомолекулярных производных растительных углеводов могут быть перспективными в том числе для создания композиционных матриксных материалов, применение которых в составе биополимерно-клеточных имплантатов является одной из интригующих задач современной области биомедицинских технологий. В этой связи они могут представлять интерес как иммунологически инертные, нетоксичные, но эффективные регуляторы, сдерживающие активную пролиферацию коммитированных клеток в составе имплантата, ограничивая тем самым возможность канцерогенеза.

Цель настоящей работы — разработка различных препаратов низкомолекулярных пектинов как перспективных антипролиферативных агентов и проведение первичной оценки их свойств на культурах нейральных стволовых клеток эмбрионального мозга крыс, применяемых в качестве модели при исследовании материалов для реконструктивной терапии травм центральной нервной системы.

Разработан способ получения низкомолекулярных производных пектина цитрусовых методом ограниченного кислотного гидролиза, позволяющий получать различные по качественному составу и молекулярной массе продукты. Установлено, что при определенных условиях в процессе гидролиза на первых этапах происходит отщепление гомогалактуронанового и рамногалактуронанового фрагментов, которые распадаются далее на короткие

фрагменты с мол. массой 5.8—0.3 кДа, представленные в том числе и различными по составу метастабильными производными. В ходе работ получены отдельные препараты различных производных пектина.

Другой задачей настоящего исследования являлась первичная оценка антипролиферативных свойств полученных препаратов на культуре стволовых клеток эмбрионального мозга крыс. Для проведения такой оценки на данном этапе работ был использован комплексный препарат низкомолекулярных пектинов с мол. массой 0.3—1 кДа, который включал в себя различные по составу низкомолекулярные производные пектина цитрусовых.

Установлено, что суммарный препарат, состоящий из низкомолекулярных производных пектина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл, способен проявлять антипролиферативные свойства, уменьшая в 8—12 раз количество активно пролиферирующих нейросфер в культуре стволовых клеток эмбрионального мозга крыс.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что низкомолекулярные пектины могут быть действительно перспективными субстанциями для создания препаратов антипролиферативного действия и могут быть использованы в качестве компонента биодegradируемых композиционных матриксных материалов, сдерживающего активную пролиферацию стволовых клеток в очаге имплантации, облегчая их выход на дифференцировку под воздействием индукторных молекул биополимерно-клеточного имплантата.

**КЛЕТОЧНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИН — НОВЫЙ СТАНДАРТ В ИННОВАЦИОННОЙ ЗАЩИТЕ ОТ ВИРУСНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ.** © Л. Ф. Литвинчук, М. В. Потанчук, О. В. Гашинская, Л. М. Цыбалова. ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург.

По данным ВОЗ (Глобальная система надзора за гриппом GISN) грипп и ОРВИ составляют 95 % от всех инфекционных заболеваний. Ежегодно гриппом заболевает каждый 5-й житель планеты. Из-за гриппа и его осложнений госпитализация возрастает в 2—5 раз и погибает до 500 000 человек. Особо опасны пандемические вирусы, борьба с которыми на этапе их возникновения трудна или даже невозможна. Пандемии, развившиеся в 1918, 1957 и в 1968 гг., стоили жизни миллионам людей во всем мире. Беспрецедентной по своей драматичности «испанкой» переболело более 200 млн человек и от 20 до 50 млн погибло — больше, чем унесла жизнью первая мировая война. Грипп является трудно контролируемой инфекцией, источник которой не удается нейтрализовать. Вакцинопрофилактика стала одним из основных оправданных способов сдерживания распространения гриппа. Более десятилетия, включая Россию, производят вакцины против гриппа. Единственной схемой накопления вирусной биомассы на протяжении 60 лет было выращивание вируса в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. Нестандартность, аллергический компонент, возможная контаминация ретровирусами и другими агентами, невозможность быстрого наращивания производства сделали субстрат из куриных эмбрионов не соответствующим современным требованиям. В профилактике гриппа, по рекомендациям ВОЗ, именно совершенствование вакцин получило приоритет. В случае угрозы пандемии, которая в особых случаях может быть приравнена к инфекционной биокатаст-

рофе, была обоснована необходимость быстрого 10-кратного увеличения объема производства вакцин. Создание и производство вакцин — предмет национальной безопасности страны. Высокопатогенные вирусы гриппа человека могут быть использованы в качестве агента биотерроризма. На совещании ВОЗ «Клеточные культуры как субстрат для производства гриппозных вакцин» (1995 г.) была предложена стратегия, поддерживаемая правительствами многих стран, — увеличение иммунной прослойки в группах риска до 70 %. Была сформулирована задача перехода на новую клеточную технологию и снят запрет на использование трансформированных клеток в производстве МИБП. Преимущества «клеточных» вакцин были определены как следующие: высокая степень унификации клеточного субстрата; уменьшение риска эндогенных и экзогенных контаминантов; возможность временного маневрирования в приготовлении нужного количества доз вакцин (продолгация или остановка биореакторного процесса); возможность оперативного реагирования на появление нового штамма; чистота получаемых вирусных антигенов; возможность прямого инфицирования без генетических модификаций вируса (в отличие от куриных эмбрионов, требующих соответствующих генетических изменений в вирусной структуре).

Под эгидой ВОЗ разработаны стандарты производства и контроля вакцин на основе клеток млекопитающих. Сформулированы требования к аттестации клеточных моделей и порядок их лицензирования. На современном рынке представлены вакцины, изготовленные с использованием клеток Vero и MDCK. Конкурентоспособность вакцин нового поколения по отношению к эмбриональным определяется возможностью в кратчайшие сроки увеличить производство вакцин как минимум в 10 раз и сохранением генетических кодирующих мутаций у вирусных вакцинных штаммов. Первой зарегистрированной вакциной на основе клеточной технологии была Optaflu (Novartis Vaccines, США, 2007 г.). В России 23 июня 2009 г. была зарегистрирована и применяется вакцина Гриппол-НЕО («Петровакс», Россия), приготовленная на основе клеток MDCK и соответствующая международным требованиям. Кроме того, для профилактики гриппа в России используются культуральные вакцины Инфлювак ТС (Solvay Pharma, Нидерланды) и Optaflu (Novartis Vaccines, США).

**ВИРУС ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1 — ПРОБЛЕМА ОСТА-  
ЕТСЯ.** © М. В. Потанчук, Л. Ф. Литвинчук, О. В. Гашиш-  
ская, А. К. Сироткин, И. А. Репко, Л. М. Цыбалова. ФГБУ  
«НИИ гриппа» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург.

Первым реальным доказательством потенциальной опасности вируса гриппа птиц (ВГП) для человека был зафиксированный в 1997 г. случай заражения и гибели 3-летнего ребенка из Гонконга. Тем самым было положено начало распространению ВГП среди людей в 1997 г. Стал очевидным факт преодоления высокопатогенным ВГП межвидового барьера, т. е. заражение человека непосредственно от птиц. ВГП оказался непредсказуемым и социально опасным зоонозом с летальностью 50—80 % и явлениями пантропизма — прямыми поражениями легких, почек и тяжелыми формами энцефалитов. С 2003 г. по 16 марта 2010 г. в мире (15 государств Азии, Африки и Европы) подтверждено около 500 случаев заражения вирусом гриппа Н5N1. В период 1997, 2003 и 2004—2005 гг.

были высказаны самые смелые предположения о грядущей эпидемиологической катастрофе, а именно: при одновременном заражении свиней вирусами гриппа птиц и человека могут сформироваться высокопатогенные реассортанты. Информация, представленная на совещании «Option for the control of influenza VII» (Гонконг, Китай, 2010 г.), свидетельствует о продолжении активной циркуляции ВГП в природных резервуарах и сохранении пандемического потенциала этого вируса. Ситуация по-прежнему находится под пристальным наблюдением ВОЗ. Применение классических методов в работе с гриппом Н5N1 оказалось практически невозможным из-за его высокой патогенности. С разработкой техники обратной генетики, которая позволяет удалить нуклеотидные последовательности, определяющие высокую патогенность вируса, была получена уникальная возможность модифицирования высокопатогенного вируса Н5N1 в непатогенный штамм в короткие сроки (несколько недель).

В настоящей работе изучена репродукция вакцинных штаммов ВГП А/Н5N1, полученных методом обратной генетики — А/AstanaRG/6:2/2009 и А/AstanaRG/5:3/2009. Используются клеточные модели, аттестованные как производственные линии: клетки VeroB (Россия) и интерферонодефицитные, адаптированные к культивированию в бессывороточной среде клетки VeroA (компания Avir Green Hills Biotechnology AG, Vienna, Австрия). Определены наиболее эффективные инициаторы инфекционного процесса (протеолитическое расщепление гемагглютини-на). Для клеток VeroB — комплекс фирмы Sigma 0.25 % Trypsin-EDTA в разведениях 1 : 150—1 : 200. Для клеток VeroA — трипсин в концентрации 1—2 мг/мл. Изучена динамика цитопатогенного действия вирусных штаммов при прижизненных наблюдениях и на окрашенных препаратах. Определены гемагглютинирующая, гемадсорбирующая и инфекционная активности. Проведен анализ влияния множественности инфекции на показатели репродукции. Локализация вирусных антигенов при развитии инфекционного процесса определялась с помощью метода иммуофлуоресценции. Морфология формирующихся вирионов изучалась с помощью электронного микроскопа. Были приготовлены и заложены на хранение около 100 ампул лиофилизированного вирусного материала, в том числе 45 ампул с вирусами А/AstanaRG/6:2/2009 (Н5N1) и А/AstanaRG/5:3/2009 (Н5N1) на клетках VeroA и 30 ампул с вирусом А/AstanaRG/6:2/2009 (Н5N1) на клетках VeroB. Материал охарактеризован по параметрам инфекционной и гемагглютинирующей активности, специфичности, а также стабильности (установлены пределы пассирования). Репродукция на «бессывороточных» клетках VeroA оказалась существенно выше, чем на VeroB, а именно: по гемагглютинирующей активности в 2—4 раза, по инфекционной — на 1.5—2 lg ТЦД50. Таким образом, линия VeroA является более эффективной моделью для исследования вирусов гриппа А/Н5N1 и перспективной моделью для производства.

Работа выполнена в рамках научно-технической программы «Разработка вакцины против гриппа А(Н5N1) для здравоохранения Республики Казахстан на 2008—2010 гг.».

**ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ВОСПРО-  
ИЗВЕДЕНИЯ ВИРУЛЕНТНЫХ ФОРМ ВОЗБУДИТЕЛЯ  
УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРИХОМОНИАЗА.** © Н. В. Раз-

дольская,<sup>1</sup> Л. Ф. Литвинчук,<sup>2</sup> А. М. Иванов, А. Б. Криво-ручко,<sup>1</sup> О. В. Гаврилова.<sup>1</sup> <sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ и <sup>2</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург.

Паразитическое одноклеточное простейшее *Trichomonas vaginalis* является возбудителем урогенитального трихомониаза. Цитоморфологические свойства вирулентных штаммов при культивировании на рекомендуемых сложных питательных средах не сохраняются (Benchimol, 2004). В настоящее время лабораторная диагностика трихомониаза основана на обнаружении исключительно типичных подвижных грушевидных клеток. Известно, что контакт паразита с клетками слизистого эпителия приводит к трансформации *T. vaginalis* в амeboидные формы, лишенные жгутиковой подвижности и, по-видимому, с иным типом питания (Garcia, Bruckner, 1999; Pereira-Neves, Benchimol, 2007). Кроме того, исследователи указывают на возможность существования округлых неподвижных форм трихомонад, не имеющих характерных морфологических особенностей при рутинных методах окраски. Биологический смысл и существование округлых неподвижных форм *T. vaginalis* являются предметом дискуссий, и их принято рассматривать как дегенеративные формы (Дмитриев, 2003). Использование клеточных линий дает возможность воспроизвести инфекционный процесс *in vitro* и описать жизненный цикл паразита.

В исследовании были использованы клеточные линии: HEp-2 (культура клеток карциномы гортани человека) и L-41 (культура клеток лимфобластоидного происхождения).

При инфицировании клеточного монослоя подвижными грушевидными клетками *T. vaginalis* наблюдали закономерную смену морфотипов. Переход от грушевидных к неподвижным амeboидным формам индуцировался непосредственно после контакта с клетками монослоя. У трихомонад наблюдалась вакуолизация цитоплазмы и частичная редукция аксостилия, формировались псевдоподии, свободные жгутики теряли подвижность. Окрашивание по Май-Грюнвальду—Гимзе выявило увеличение доли делящихся, а также многоядерных *T. vaginalis*, никогда не обнаруживающихся в популяциях грушевидных клеток (Razdolskaya et al., 2007). Деление грушевидных клеток цитологически отличалось от деления амeboидных, последние можно рассматривать как репродуктивные клетки с отложенным цитокинезом. В процессе инфекции амeboидные клетки спонтанно теряли контакт с поверхностью и присутствовали в суспензии в виде неподвижных округлых форм, не образующих псевдоподий. После полной деструкции монослоя происходил переход к типичному грушевидному морфотипу. Полиморфизм *T. vaginalis* в модели инфекции *in vitro* подтверждает тот факт, что наличие округлых форм в клиническом материале свидетельствует о течении активного инфекционного процесса. Для поддержания цитоморфологических свойств вирулентных штаммов рекомендуется проводить пассажи на клеточной линии L-41.

#### Список литературы

- Benchimol M. 2004. Microsc. Microanal. 10 : 528—550.  
Pereira-Neves A., Benchimol M. 2007. Biol. Cell. 99 : 87—101.  
Garcia L. S., Bruckner D. A. 1999. Man. Clin. Microbiol. VII ed. 1329—1335.

Дмитриев Г. А. 2003. Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. М.: Мед книга; Н. Новгород: НГМА.

Razdolskaya N., Gavrilova O. et al. 2007. Protistology. 5 : 66—67.

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОЧНОГО МОНОСЛОЯ Vero-V ПРИ РЕПРОДУКЦИИ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ ПОДТИПА В. © Д. В. Романская, Т. Б. Манин, Б. Л. Манин. Федеральный центр охраны здоровья животных, ФГУ «ВНИИЗЖ».

Репродукция вирусов животных и птиц на чувствительных клеточных линиях является основой получения антигенов для производства вакцин. Исследование взаимодействия вирусов и клеток позволяет изучить этапы и динамику этого процесса, а также получить информацию о вероятных изменениях, происходящих в тканях и клетках при патологических процессах *in vivo*.

Метапневмовирус птиц (РНК-содержащий вирус) поражает альвеолярный эпителий цыплят, вызывая тяжелый патологический синдром, именуемый SHS (или синдром «опухшей головы»). Применение вакцин, полученных на основе культурального вируса, создает полноценный иммунитет от заболевания метапневмовирусной инфекции птиц.

Нами были изучены стадии взаимодействия штамма метапневмовируса подтипа В с клетками Vero-V в процессе получения культурального антигена для производства вакцины против данной инфекции. Цитопатическое действие вируса изучалось с помощью фазово-контрастной микроскопии и цитохимического метода (окрашивание нативных препаратов акридиновым оранжевым и дальнейшее их изучение с помощью люминесцентного микроскопа).

Патологические изменения в клетках Vero-V начинаются через 20—24 часа после заражения вирусом. Основным морфологическим признаком репродукции служит образование многоядерных клеток. Через 36 ч культивирования начинают формироваться симпласты, в которых может находиться до 50 ядер и более. При нормальной репродукции вируса симпласты формируются на 70 % площади монослоя. По морфологическим признакам симпласты на этой стадии имеют неразрушенную наружную мембрану. Внутри симпласта, в цитоплазме, усиливается оранжевое свечение — признак накопления РНК-составляющего компонента. Ядра клеток также имеют неразрушенную оболочку, четкую структуру, в то же время усиливается оранжевое свечение ядрышек. На 3-и сут культивирования в симпластах формируются однородные сферические структуры ярко зеленого цвета размером в 2—3 раза меньше ядер с оранжевой центральной частью. После разрушения симпластов сферические структуры окрашиваются в оранжевый цвет и лизируются только после промораживания. Формирование таких сферических структур коррелирует с высоким титром метапневмовируса. Основная масса сформировавшихся симпластов на конечной стадии репродукции вируса может отслаиваться от субстрата и формировать трехмерные структуры без разрушения общей наружной клеточной мембраны. На начальных стадиях инфекционного процесса (0—10 ч) в клетках Vero-V еще наблюдаются митозы, но уже к концу 1-х сут все клетки вовлекаются в процесс формирования симпластов и репродукции вируса.

Морфологические изменения в клетках при репродукции метапневмовируса птиц аналогичны патологическому процессу воздействия микобактерий на альвеолярный эпителий животных.

Таким образом, в результате изучения репродукции штамма метапневмовируса подтипа В в клетках Vero-V было выявлено, что деструктивные изменения проявляются в слиянии клеток, образовании симпластов и трансформации ядер в сторону сверхспирализации хроматина ДНК. Динамика деструктивных изменений (или цитопатическое действие) находилась в прямой зависимости от инфекционной активности культивируемого вируса и была несколько выше, чем при проведении предыдущих исследований с иными штаммами данного возбудителя.

**КУЛЬТУРА СПЕРМАТОГОНИЙ ТИПА А ХРЯКА: ВЛИЯНИЕ ОЧИСТКИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ИХ РАЗМНОЖЕНИЕ.** © И. П. Савченкова, М. В. Полякова. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко РАСХН, Москва.

Появились сообщения о длительном культивировании стволовых сперматогоний мыши, крысы и хомяка, которые были названы половыми линиями стволовых клеток (GS). Создание линий половых стволовых клеток *in vitro* необходимо в первую очередь для изучения биологии стволовых сперматогонияльных клеток (СпСК), которые обеспечивают непрерывную продукцию спермиев в течение всей жизни млекопитающих. Эти работы позволят выявить закономерности регуляции самообновления и цитодифференцировки СпСК млекопитающих *in vitro* под действием ключевых факторов роста, цитокинов и микроокружения. Целью наших исследований было оценить влияние очистки сперматогоний типа А хряка после выделения на их размножение в культуре. Для получения культур сперматогенных клеток использовали семенники от неполовозрелых помесных хряков 60-суточного возраста. После декапсуляции тестикулы подвергались механической и ферментативной обработкам. Выделенные клетки делили пополам, часть клеток высевали сразу на фидерные слои, представленные клетками STO, а вторую часть предварительно очищали от соматических клеток по адгезии. Для этого выделенные клетки инкубировали в ростовой среде в течение 3 ч, а затем неприкрепившиеся сперматогонии собирали и переносили на фидерные слои. Средой для культивирования сперматогоний была среда ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) и 15 % сыворотки крови плодов коров. Окраску клеток на щелочную фосфатазу проводили с помощью коммерческого набора (Sigma-Aldrich). Клетки фиксировали и затем обрабатывали свежеприготовленным раствором красителя (прочный синий RR и субстрат AS-MX фосфат) по рекомендации фирмы. В результате проведенных исследований было установлено, что культивирование сперматогоний в течение 25 сут на STO в присутствии соматических клеток, которые окружают их в тестикулах, представленных клетками Сертоли, приводит к дифференцировке в направлении сперматогенеза. Так, на 11-е сут в культуре наблюдали формирование первичных сперматоцитов, а на 25-е сут культивирования были выявлены сперматиды. Нами было установлено, что очистка по адгезии позволяет получить клеточную популяцию, на 78 % представленную сперматогониями хряка. Дальнейшее культивирова-

ние очищенных сперматогоний типа А хряка на клетках STO приводило к одновременной пролиферации сперматогоний и их дифференцировке, как в естественных условиях. Так, наряду с круглыми по форме клеточными колониями наблюдали формирование вытянутых цепочкой клонов клеток, соединенных между собой цитоплазматическими мостиками, которые напоминали клональное размножение сперматогенных клеток в тестикулах *in vivo*. Клоны различались как по морфологии, так и по адгезивным способностям. Окраска на щелочную фосфатазу выявила присутствие в обеих экспериментальных группах клеток, которые положительно окрашивались на щелочную фосфатазу, что может свидетельствовать о наличии в культуре СпСК. Это были круглые крупные клетки с узким ободком цитоплазмы. В культуре без предварительной очистки число клеток, окрашенных на щелочную фосфатазу, было в 20 раз меньше по сравнению с предварительно очищенной популяцией. Те клетки, которые меняли морфологию и размножались в виде цепочек, были негативны по щелочной фосфатазе. Клоны, представленные мелкими плотно упакованными клетками, также не окрашивались на щелочную фосфатазу. Наши результаты свидетельствуют о том, что очистка половых клеток от соматических после выделения влияет на поддержание и размножение в культуре сперматогоний типа А хряка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-1471-а).

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОМОЛАЖИВАЮЩЕЙ РЕПАРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.** © А. С. Сапун, О. В. Квитко, И. И. Конева, Я. И. Шейко, Н. А. Балащенко, С. Е. Дромашко. Институт генетики и цитологии НАН Белоруссии, Минск.

Проблема биологического старения является одной из важнейших в биологии, медицине и цивилизации в целом. В результате старения нарушаются восстановительные процессы *in vivo*, а также затрудняется наработка стволовых клеток *in vitro* для их прямого либо опосредованного (при создании искусственных органов) введения в организм.

Культивируемые клетки, как правило, стареют быстрее, чем в организме, что ограничивает наработку клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии. С другой стороны, при неограниченной пролиферации *in vitro* клетки могут трансформироваться в направлении ракового фенотипа.

Поиск средств замедления или ревертирования процессов старения клеток является предпосылкой успешного применения клеточных технологий в медицине. В этом плане представляет интерес возможность того, что эпигенетическое омоложение генома может происходить без дедифференцировки, которая возникает при переносе ядер соматических клеток в цитоплазму яйцеклетки или при получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

В соответствии с развитой теорией омоложения, предложенной О. В. Квитко, в период эмбриогенеза и постнатального роста особый сигнальный механизм репарирует эпигенетические ошибки (эпимутации) и тем самым омолаживает клетки. Вот почему виды с про-

должительными периодами развития и роста обладают и наибольшей продолжительностью жизни, а виды с индетерминированным ростом тела практически не стареют (пренебрежимое старение — *negligible senescence*).

Данный предполагаемый механизм омоложения приводится в действие морфогенетическими белками, которые регулируют развитие и рост, а также плеiotропно (одновременно) стимулируют репарацию эпигенетических ошибок (эпимутаций), представляющих собой, в частности, изменения метилирования цитозина в ДНК и модификации гистонов хроматина. После завершения развития и роста продукция морфогенов затухает, что и приводит к накоплению возрастных нарушений генной экспрессии.

Указанный природой основной способ продления жизни — продолжение развития, которое в случае человека может заключаться не в изменении структуры или увеличении размеров тела, а в совершенствовании информационного процессинга мозга, сопровождающегося генерацией нервных импульсов, стимулирующих продукцию морфогенов прямой иннервацией тканей либо опосредованно, путем эндокринной модуляции.

При поиске средств омоложения культивируемых клеток целесообразно апробировать воздействия сигналами, обладающими специфическими параметрами (амплитуда, частота и фрактальность). В связи с этим представляется интерес использование электромагнитных полей, параметры которых можно варьировать в большей степени, чем в случае «вещественных» воздействий (Zhao et al., 2005). Имеются данные, демонстрирующие возможность транзиторной индукции омолаживающей импульсации, приводящей к восстановлению спектра геномной активности и теломерной ДНК в тканях взрослого организма и культурах клеток.

Для поиска воздействий, индуцирующих процессы эпигенетического омоложения, целесообразно использовать видеомикроскопию живых клеточных культур, позволяющую отслеживать судьбу единичных клеток и их клонов. Данный подход продемонстрирован нами при получении постоянной линии клеток из фолликулов волос человека. Эта клеточная линия обладала способностью к нейтральной дифференцировке при пониженной температуре культивирования.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ МЕТОДА БИОТЕРАПИИ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.** © В. М. Семёнова, Л. Н. Бельская, Н. И. Лисяный, В. Д. Розуменко, Л. П. Стайно. ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова АМН Украины», Киев.

Лечение нейроонкологических больных с глиомами головного мозга представляет нерешенную медико-социальную проблему в связи с инфильтративным ростом и резистентностью к химиолучевой терапии большинства из них. Перспективным направлением повышения эффективности лечения этих больных является разработка технологий биотерапии, в частности с использованием фетальных тканей и их фракций. С этой целью наряду с изучением возможности применения нейроклеток фетоплацентарного комплекса рассматривается вариант использования тканевых регуляторных пептидов с противоопухолевыми и иммуномоделирующими свойствами в

связи с наличием нарушений в звеньях противоопухолевого иммунитета у нейроонкологических больных.

Цель работы — исследовать прямое влияние пептидов, выделенных из эмбрионального мозга (ПЭМ) крыс (E17), на жизнеспособность клеток внутримозговых глиом человека и лимфоцитов их периферической крови в суспензионных и первичных культурах.

В работе использовали биоптаты 27 глиом, удаленных при нейрохирургических операциях, гепаринизированную кровь этих больных и 5 условно здоровых доноров. Гистологически среди глиом диагностированы 18 астроцитом II—III степени анаплазии и 9 глиобластом (IV степень анаплазии). Суспензию опухолей получали путем механической диссоциации. Лимфоциты периферической крови выделяли в градиенте фиколла/верографина. Лимфоциты фенотипировали с помощью моноклональных антител непрямым иммунофлуоресцентным методом с определением CD25<sup>+</sup> (R IL-2) и CD95<sup>+</sup> (FASR). ПЭМ выделяли из эмбрионального мозга крыс по оригинальной методике путем ее химической обработки с последующим диализом надосадочной жидкости и ее высушиванием. Стандартизацию ПЭМ проводили по количеству белка (Лисяный и др., 1986). Влияние ПЭМ (10 и 100 мг/мл) на опухолевые клетки и лимфоциты оценивали в суспензионной культуре после 24-часовой инкубации с препаратом, а также в первичных культурах глиом после 24- и 48-часовой инкубации с препаратом.

Установлено, что в цитотоксическом тесте через 24 ч инкубации опухолевых клеток астроцитом с ПЭМ (10 мкг/мл) выявляется слабое влияние препарата на их жизнеспособность в отличие от эффекта воздействия концентрации 100 мкг/мл, которая снижает этот показатель на 35—40%. Менее выраженное токсическое действие эта концентрация ПЭМ оказала на клетки глиобластомы (цитотоксический индекс составил 16.5 + 5.2%). В тканевых культурах астроцитом 24-часовая инкубация с ПЭМ индуцировала появление округленных клеток с липидной и гидропической трансформацией цитоплазмы. При удлинении инкубации культур с ПЭМ до 48 ч доля поврежденных клеток нарастала на фоне разрежения зоны роста культур за счет десквамации части погибших клеток. В культурах глиобластом, инкубированных с ПЭМ в течение 24 и 48 ч, по сравнению с культурами астроцитом выявлялась меньшая степень повреждаемости опухолевых клеток при сохранении общей структуры зоны роста. Воздействие ПЭМ (100 мкг/мл) на лимфоциты периферической крови нейроонкологических больных повышает экспрессию CD25<sup>+</sup>-антигена и снижает вдвое экспрессию CD95<sup>+</sup>-антигена, что отражает проапоптотическое влияние препарата.

Показано, что пептиды, полученные из эмбрионального мозга крыс E17, дозозависимо проявляют как противоопухолевое действие на опухолевые клетки культивируемых глиом человека, так и иммуномоделирующую активность. Эти данные могут быть учтены при разработке новых подходов в комплексном лечении опухолей ЦНС.

**ЛЕЧЕНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ МИОКАРДА КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.** © Д. С. Сергеевичев, П. М. Ларионов, А. И. Субботовская, Д. В. Субботин. ФГУ «ННИИПК им. акад. Е. Н. Мещалкина» Минздравсоцразвития РФ, Новосибирск.

Использование прогениторных клеток в качестве «биологического шунтирования» миокарда как альтернативный вариант прямым методам реваскуляризации предложено уже более 15 лет назад. К настоящему времени для клеточной терапии используются различные источники эндотелиальных клеток-предшественников. Нами разработан способ фракционирования моноклеарных клеток костного мозга (МНК) с эндотелиальной направленностью дифференцировки за счет различной скорости адгезии клеток к пластику. На модели хронической ишемической болезни сердца (ХИБС) у собаки спустя 4 нед после трансэпикардиальной инъекции этих клеток в лазерные каналы мы наблюдали морфологически значимое усиление процессов ангиогенеза в зонах ишемии миокарда без признаков оссификации. Цель работы — показать отсутствие побочных эффектов после имплантации неприлипающих МНК в миокард для лечения ишемического поражения.

Все эксперименты с животными проводили согласно требованиям Европейской конвенции по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Экспериментальная группа состояла из 9 собак обоего пола в возрасте 1.5—2 года массой 15—20 кг. ХИБС формировали всем животным в условиях наркоза и искусственной вентиляции легких путем перевязки передней межжелудочковой артерии и коллатеральных ветвей первой диагональной артерии. Спустя 3 мес из тазовых костей пункцией получали образцы костного мозга. МНК выделяли с помощью Histopaque-1077, отмывали и инкубировали в питательной среде в культуральных флаконах 30 мин. В дальнейшем всем животным перифокально области инфаркта формировали трансэпикардиальные лазерные каналы. При этом 6 из них в каналы вводили не успевшие прилипнуть МНК, а остальным — отмывые МНК. Оставшиеся клетки использовали для иммунофенотипирования, а также анализа уровня экспрессии мРНК генов остеопонтина и вазоэндотелиальных факторов роста. Через 4 нед животных выводили из эксперимента и забирали образцы для гистологического анализа.

С помощью полуколичественной ОТ-ПЦР в клетках неприлипающей фракции была обнаружена повышенная экспрессия мРНК генов VEGF-D и -B, в меньшей степени — VEGF-A. В МНК был значительно повышен уровень экспрессии мРНК генов VEGF-C и остеопонтина. Иммунофенотипирование обеих групп показало преобладание клеток с фенотипом кроветворного ростка и зрелых клеток крови. Однако при анализе значимые различия были установлены только для клеток фракций CD34<sup>+</sup>/45<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>/45<sup>+</sup>. Морфологическим проявлением имплантации отмывтых МНК была распространенная оссификация эпикардиального и субэпикардиального слоев миокарда. Небольшие костные балки отличались значительной гетерогенностью и располагались в фиброзированной соединительной ткани. Они могли окутываться многоядерными остеокластными клетками и подвергаться частичной резорбции. В зонах имплантации неприлипающих МНК не было зафиксировано вышеописанных событий. Значимыми морфологическими изменениями были проявления распространенного ангиоматоза, ориентированного на зоны воздействия, и образование структур по типу «сосуд в сосуде». Анализ порядка 800—1200 сосудов с диаметром до 40 мкм показал значения плотности 2970 и 2120 сосудов/мм<sup>2</sup> в зонах имплантации неприлипающих и отмывтых МНК соответственно.

Таким образом, нам удалось показать безопасность использования неприлипающих МНК при лечении ишемического поражения миокарда. Мы получили важные гистологические данные о проявлениях ангиогенеза после имплантации клеток костного мозга в миокард.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ В КУЛЬТУРЕ ПЕРВИЧНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НИХ IL-17. © А. Г. Соболева,<sup>1</sup> В. В. Соболев,<sup>1</sup> Н. Л. Стародубцева,<sup>2</sup> Ан. Л. Пирузян,<sup>3</sup> С. А. Брускин.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, <sup>2</sup> Московский физико-технический институт (Государственный университет) и <sup>3</sup> Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва.

Псориаз — системная, иммуноопосредованная, многофакторная, генетически обусловленная патология. При псориазе, как при воспалении, в коже происходит активация резидентных Т-клеток и дендритных клеток, что в свою очередь приводит к изменению профилей воспалительных цитокинов, привлечению макрофагов и нейтрофилов, ускоренной пролиферации кератиноцитов и их aberrантной дифференцировке. Активация воспалительных клеток в совокупности с провоспалительными цитокинами приводит к развитию очага воспаления и формированию псориазных бляшек.

Используя программный продукт MetaCore компании GeneGo Inc, нами была построена сеть генных взаимодействий при передаче сигнала от IL-17 при взаимодействии с его рецепторами, которая через ассоциированные с псориазом транскрипционные факторы приводит к активации экспрессии матриксных металлопротеаз у больных псориазом.

При псориазе происходит гиперплазия эпидермальных кератиноцитов, выделяющих иммуноактивные молекулы. Показано, что одной из функций ММП является регуляция активности воспалительных медиаторов — цитокинов и хемокинов — в процессе развития воспаления. Также известно, что повышенная экспрессия ММП-12 помогает макрофагам расщеплять компоненты базальной мембраны и проникать в эпидермис во время воспалительного процесса при псориазе. На основании вышеизложенного мы решили изучить изменение уровня экспрессии генов матриксных металлопротеаз ММП-1, ММП-2, ММП-9 и ММП-12 в культуре первичных кератиноцитов человека при действии на них интерлейкина-17.

Известно, что Т-клетки больных псориазом секретируют интерферон- $\gamma$  и интерлейкин-17, являющиеся мощными провоспалительными цитокинами. В опыте использовали первичные кератиноциты человека, выделенные из кожи пациента косметологического кабинета. Клетки первичных кератиноцитов индуцировали рекомбинантным IL-17 в концентрации 50 нг/мл в течение 24 часов. Затем, используя метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, определили содержание мРНК генов четырех матриксных металлопротеаз: ММП-1, ММП-2, ММП-9, ММП-12.

Анализ показал, что индукция первичных кератиноцитов цитокином IL-17 способствовала повышению содержания уровня мРНК матриксных металлопротеаз ММП-1, ММП-9 и ММП-12 по отношению к контролю в 4.4, 1.2 и 5.2 раза соответственно. Уровень экспрессии ММП-2 достоверно не отличался от контроля.

Уровень экспрессии *MMP-1* и *MMP-12* значительно возрос при давлении в состав питательной среды для первичных кератиноцитов цитокина IL-17, что совпадает с результатами анализа уровня экспрессии этих металлопротеаз в пораженной псориазом коже по сравнению с непораженной. Данный факт является основанием для предположения о возможной ключевой роли *MMP-1* и *MMP-12* в патогенезе псориаза.

Работа выполнена при поддержке ГК-1309 «Кадры» и программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине».

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЯДЕРНОГО БЕЛКА Piwi В ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ. © О. А. Соколова, М. С. Кленов, Е. Ю. Якушев, Е. А. Михалева, В. А. Гвоздев. Институт молекулярной генетики РАН, Москва.

Белки, принадлежащие к семейству Piwi, участвуют в формировании и самообновлении стволовых клеток зародышевого пути, а также в подавлении экспрессии генов по механизму РНК-интерференции (сайленсингу) у различных животных, включая млекопитающих. В ходе сайленсинга короткие РНК в составе рибонуклеопротеиновых комплексов способны узнавать комплементарные последовательности РНК в клетке и катализировать их разрезание, что приводит к деградации РНК или транскрипционной репрессии гена в ядре. Белки Piwi связывают короткие РНК особого типа, которые были названы Piwi-interacting RNA (piRNA). piRNA в основном комплементарны мобильным элементам (транспозонам) и повторенным последовательностям генома. Таким образом, белки семейства Piwi осуществляют репрессию мобильных элементов, обеспечивая целостность генома и защиту от транспозиций.

*Drosophila melanogaster* обладает тремя белками, относящимися к семейству Piwi (Piwi, Aub и Ago3), один из которых (собственно Piwi) локализуется в ядрах клеток яичников, тогда как два других (Aub и Ago3) — в цитоплазме. Отсутствие любого из этих белков приводит к резкому увеличению экспрессии мобильных генетических элементов. Мухи, содержащие нуль-мутацию в гене *piwi*, имеют, кроме того, неразвитые яичники вследствие дефектов в процессах деления герминальных стволовых клеток. В этой работе мы исследовали мутантный белок Piwi (PiwiNt), в котором сохранены домены, осуществляющие связывание коротких РНК и расщепление РНК-мишени, однако отсутствует N-конец, предположительно содержащий сигнал ядерной локализации. Мы показали, что PiwiNt локализуется не в ядре, а в цитоплазме герминальных клеток яичников. У *piwiNt*-мутантных мух мы обнаружили значительную дерепрессию различных ретротранспозонов, аналогичную эффекту нуль-мутаций в гене *piwi*, причем накопление транскриптов мобильных элементов происходило как в ядрах, так и в цитоплазме. Таким образом, транспорт белка Piwi в ядро необходим для нормального функционирования системы сайленсинга транспозонов с помощью piRNA. Интересно, что в отличие от нуль-мутаций гена *piwi* *piwiNt*-мутанты не имеют нарушения деления герминальных стволовых клеток. Таким образом, мы предполагаем, что функция белка Piwi в процессе поддержания стволовых клеток не связана с сайленсингом транспозонов.

ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОЛЕВКИ *MICROTUS ROSSIAEMERIDIONALIS*, ВИДА, НЕПЕРМИССИВНОГО К ПОДДЕРЖАНИЮ ПЛЮРИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ IN VITRO. © М. А. Сорокин. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Получение плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) животных необходимо в первую очередь для создания трансгенных организмов. В области медицины эти организмы позволяют моделировать заболевания человека, а крупные животные могут давать гистосовместимый материал для клеточных и органных трансплантаций. Известно, что у мыши линии C57BL/6 полноценные ПСК можно получить репрограммированием дифференцированных клеток путем экспрессии четырех транскрипционных факторов — Oct4, Sox2, Klf4 и Msc. Эти белки являются частью «молекулярной машины» поддержания плюрипотентности, устройство которой сходно у всех млекопитающих. Однако, несмотря на это сходство, соматические клетки большинства видов животных до сих пор не поддаются прямому репрограммированию, так же как их плюрипотентные клетки не поддаются выделению и культивированию in vitro. К этим так называемым «непермиссивным» видам относится, в частности, восточно-европейская полевка *Microtus rossiaemeridionalis*.

Трудности репрограммирования клеток полевки, вероятно, в какой-то мере связаны с неэффективностью активации ключевых генов плюрипотентности — Oct4 и Nanog, а также с неэффективным поддержанием плюрипотентного состояния. Мы предположили, что ключевым шагом к успеху репрограммирования является правильный выбор исходного типа клеток, наиболее предрасположенных к активации генов Oct4 и Nanog. Состояние активности гена напрямую коррелирует со степенью метилирования ДНК его 5'-регуляторных областей, в первую очередь минимального промотора и энхансеров. Мы секвенировали 5'-области генов Oct4 и Nanog полевки и сравнили их с гомологичными последовательностями мыши. В результате мы обнаружили у полевки гомологи регуляторных элементов генов Oct4 и Nanog и определили мишени для анализа метилирования ДНК. Затем при помощи бисульфитного секвенирования мы сравнили метилирование генов Oct4 и Nanog в четырех типах клеток полевки: в трофобластных стволовых клетках, стволовых клетках экстраэмбриональной энтодермы (XEN-клетки), эмбриональных фибробластах и в образцах печени взрослых полевок. Мы обнаружили, что минимальные промоторы обоих генов гиперметилированы во всех изученных клетках и в образцах печени, что согласуется с отсутствием или низким уровнем экспрессии Oct4 и Nanog в неплюрипотентных клетках. Однако, интересно, что дистальный энхансер гена Oct4 был гипометилирован в клетках экстраэмбриональных линий, особенно в XEN-клетках, в которых уровень метилирования составил всего 7 % против 50 % в эмбриональных фибробластах. ОТ-ПЦР показал низкоуровневую экспрессию гена Oct4 в XEN-клетках, но не в эмбриональных фибробластах. Эти данные были подтверждены при помощи ПЦР в реальном времени. Предрасположенность XEN-клеток полевки к экспрессии гена Oct4, вероятно, связана с их происхождением из гипобласта. Известно, что в предимплантационном эмбрионе мыши разделение эпибласта и гипобласта сопровождается пиком экспрессии Oct4 в гипобласте, после чего экспрессия Oct4 в нем резко снижается.

Таким образом, по эпигенетическому статусу локуса *Oct4* стволовые клетки экстраэмбриональной энтодермы полевки наиболее близки к плюрипотентным клеткам. Целесообразно у полевки именно эти клетки использовать в качестве исходного материала для прямого репрограммирования.

**ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КРЫСЫ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.** © А. Е. Стекленева,<sup>1-3</sup> Е. А. Васькова,<sup>1-3</sup> А. И. Шевченко,<sup>1-3</sup> А. Г. Шилов,<sup>1,3</sup> С. П. Медведев,<sup>1-3</sup> С. М. Закиян.<sup>1-4</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, <sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, <sup>3</sup>ФГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени акад. Е. Н. Мешалкина» Минздрава России, <sup>4</sup>Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск.

Для подробного изучения заболеваний человека и разработки эффективных методов их лечения требуется моделирование соответствующих заболеваний на животных. Лабораторная крыса *Rattus norvegicus* является одним из модельных объектов, на котором проводится широкий спектр фундаментальных и клинических исследований. Технология получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) крысы, основанная на введении в дифференцированные клетки определенных факторов для репрограммирования до состояния плюрипотентности, может создать перспективную базу по исследованию возможностей и безопасности применения заместительной клеточной терапии в лечении заболеваний.

Поддержание самообновления плюрипотентных стволовых клеток крысы требует условий, отличных от таковых для мыши и человека. Многочисленные попытки получения эмбриональных стволовых клеток и ИПСК крысы свидетельствуют о том, что, возможно, оптимальные условия еще не подобраны. Поэтому испытание новых или модифицированных методов является актуальным на настоящий момент.

В качестве исходной линии были выбраны нейральные клетки, полученные из мозга эмбриона самки крысы линии Вистар.

Для проведения репрограммирования использовали управляемую доксициклином лентивирусную систему транскрипции генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Анализ репрограммированных клеток показал наличие маркеров плюрипотентности: активность щелочной фосфатазы и экспрессию эндогенных *Nanog* и *Rex1*. При этом реактивации X-хромосомы не происходило: анализ полученных клеток крысы показал наличие маркеров неактивного хроматина на X-хромосоме. При дифференцировке ИПСК в эмбриональные тельца наблюдали экспрессию маркеров энто- и мезодермы: *Gata6*, *Sox17* и *T (Brachyury)*, что говорит о дифференцировке в разные зародышевые листки и, следовательно, о прохождении этих клеток через стадию плюрипотентности.

Таким образом, полученные клетки в дальнейшем могут быть использованы для биомедицинских исследований в области заместительной клеточной терапии при моделируемых на крысе заболеваниях человека.

**РЕАКЦИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК MDBK НА ВНЕСЕНИЕ В РОСТОВУЮ СРЕДУ АДРЕНАЛИНА.** © Е. Ю. Хамзина, Э. М. Плотникова, Ю. М. Кириллова. ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных — ВНИВИ», Казань, lenahamzina@yandex.ru.

Рост и деление клеток как *in vivo*, так и *in vitro* зависят от влияния биологически активных веществ. Частота деления клеток *in vivo* находится под контролем репрессорных гормонов (кейлонов), вырабатываемых в митотических клетках, но активно действовать они могут только при соединении с адреналином (Зайко и др., 1996). *In vitro* высокие дозы адреналина вызывают снижение митотического индекса первичных клеток в культуре (Concz et al., 1999; Djelić et al., 2008). При этом отмечается уменьшение размеров клеток (Tripathi, 1984). Однако нет данных о влиянии физиологических доз адреналина на рост перевиваемых линий клеток. Цель данной работы — определить влияние физиологической дозы адреналина (1 мкг/мл) на морфофункциональные показатели клеток перевиваемой линии MDBK. Через 24, 48 и 72 ч культивирования в термостате при 37 °C индексы пролиферации (ИП) перевиваемой линии клеток MDBK в контроле и опыте закономерно увеличивались и достоверно друг от друга не отличались. Количество митозов в контроле и в опыте через 24 ч значительно друг от друга не отличались. К 48 ч произошло удвоение числа митозов как в контроле ( $P \leq 0.005$ ), так и в опыте ( $P \leq 0.005$ ) по сравнению с 24 ч, при этом достоверных различий между ними не было. Через 72 ч произошло недостоверное уменьшение числа митозов в контроле и опыте. Размер клеток MDBK через 24, 48 и 72 ч культивирования в опыте был достоверно меньше соответствующего контроля ( $P \leq 0.005$ ). Таким образом, нами установлено, что адреналин в физиологической дозе практически не оказывает влияния на ИП и количество митозов в перевиваемой линии клеток MDBK в течение 72 ч. Однако эта концентрация адреналина вызывает достоверное уменьшение размеров клеток уже после 24 ч сокультивирования ( $P \leq 0.005$ ). Данная тенденция сохраняется на протяжении 72 ч культивирования. Этот факт, безусловно, свидетельствует об участии адреналина в метаболизме, процессах роста и деления клеток *in vitro*.

**ХАРАКТЕР ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ С6 И ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ НАПРАВЛЕНИЯ РАВНОДЕЙСТВУЮЩЕЙ СИЛЫ.** © М. О. Роева (Хотянович). Институт физиологии НАН Белоруссии, Национальная академия наук Белоруссии, Минск.

Известно, что на развитие клеток в условиях *in vivo* и *in vitro* оказывает влияние множество различных по своей природе факторов. Отмечены сдвиги на клеточном уровне, происходящие в условиях изменения направления равнодействующей силы, но противоречивость полученных данных не позволяет в настоящее время сформулировать общие закономерности этого воздействия. Полученные данные свидетельствуют о чувствительности клеток к сдвигам направления равнодействующей силы, которые вызывают как структурные изменения, так и изменения функциональной активности клеток.

Целью работы явился анализ пролиферативной активности клеток F1 и С6 после изменения направления равнодействующей силы.

Клетки культивировали (концентрация  $1.3 \cdot 10^5$  кл./мл) во флаконах 25 мл в среде Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10 %-ной эмбриональной бычьей сыворотки и  $10^{-4}$  г/мл раствора сульфата гентамицина. Флаконы размещали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 5 %  $\text{CO}_2$  и 37 °С.

В экспериментах на культуре клеток глиомы С6 и фибробластов человека изменяли на 60° положение флаконов относительно горизонтальной плоскости. Поворот осуществляли через 40—48 ч после достижения конfluence около 70 %.

Сопоставляли результаты наблюдений пролиферативной активности клеток во флаконах, один из которых на протяжении всего эксперимента находился в горизонтальном положении (серия 1), другой располагался под углом 60° (серия 2). Всего было два флакона в первой серии и два флакона — во второй. Мониторинг аналоговых событий на протяжении 20 ч осуществляли с помощью микроскопа Opton ISM-405 при увеличении объектива 16×, видеокамеры Leica DC 300F и накапливали в цифровой форме на компьютере с интервалом в 10 мин.

Выяснено, что после поворота флаконов на 60° в сравнении с горизонтально расположенными клетками глиомы С6 пролиферативная активность клеток снижается на 52 % через 20 ч наблюдения.

Итак, изменение направления равнодействующей силы оказывает ингибирующий эффект на глиальные клетки глиомы С6. Следовательно, сдвиг данного фактора отражается на пролиферативной активности патологически измененных клеток, изменяя их развитие. Этот факт интересен для развития в будущем способов ингибирования роста злокачественных опухолей.

Определено, что после изменения направления равнодействующей силы усиливается пролиферативная активность фибробластов. Этот факт важен для понимания процессов, происходящих в развивающемся организме в различные периоды онтогенеза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при изменении направления равнодействующей силы наблюдается трансформация пролиферативной активности клеток. В культуре опухолевых клеток процессы пролиферации ингибируются. Фибробласты, наоборот, увеличивают пролиферативную активность.

**ПОЛУЧЕНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ИЗ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ IN VITRO.** © А. А. Худяков, А. Б. Малашичева. ФГУ ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург.

В настоящее время заболевания сердца являются основной причиной смерти в развитых странах, также порядка 1 % новорожденных имеют те или иные пороки сердца.

В основе патогенеза многих сердечно-сосудистых заболеваний лежит изменение функций клеток, составляющих сердечно-сосудистую систему, поэтому для изучения таких патологий необходимо существование удобной и надежной системы, на которой было бы возможно моделирование того или иного заболевания. В настоящее время существует множество протоколов получения кардио-

миоцитов и кардиомиоцит-подобных клеток, из которых исследователю необходимо выбрать подходящий и работающий в условиях данной лаборатории вариант.

Целью данной работы являлась разработка метода получения культуры кардиомиоцитов для дальнейшего применения в исследованиях, посвященных патогенезу ряда врожденных пороков сердца.

Поскольку наша лаборатория имеет прямой доступ к операционному материалу, нами был выбран метод получения культуры кардиомиоцитов из резидентных стволовых клеток-предшественников, присутствующих в миокарде. Клетки-предшественники кардиомиоцитов выделяли из ткани миокарда человека путем ферментативной диссоциации коллагеназой А. Клетки выращивали в клональном посеве и затем дифференцировали при помощи специфических факторов.

Были получены и охарактеризованы клетки-предшественники кардиомиоцитов. Показана возможность дифференцировки клеток-предшественников в кардиомиоцит-подобные клетки, экспрессирующие специфические для кардиомиоцитов маркеры, широко используемые лабораториями для характеристики кардиомиоцитов. Таковыми маркерами являются саркомерные белки  $\alpha$ -актинин и тропонин I (выявлены с помощью иммуноцитохимической окраски клеток), а также сердечный актин, тропонин T, GATA-4 и Nkx2.5 (экспрессия оценивалась с помощью метода обратной ПЦР).

Получено и охарактеризовано несколько клеточных линий-предшественников кардиомиоцитов. Разработаны метод введения в культуру предшественников кардиомиоцитов и их последующая дифференцировка.

В дальнейшей работе планируются применение других методов получения кардиомиоцитов и сравнение их с имеющимся и выбор наиболее эффективного. Планируется использовать недавно открытое явление трансдифференцировки, позволяющее получать индуцированные плюрипотентные клетки из соматических клеток взрослого организма, «возвращая» их в эмбриональное состояние. Предполагается впервые в качестве источника индуцированных плюрипотентных клеток использовать мезенхимные клетки жировой ткани, что поможет использовать ориентированный на пациента подход в дальнейших исследованиях.

**УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ ПРИ АППЛИКАЦИИ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ НА КЛЕТКИ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ.** © А. Н. Чернов. Институт физиологии НАН Белоруссии, Минск, a1.chernov@mail.ru.

В структуре детских онкозаболеваний доминирующее положение занимают медуллобластомы (40 %) — злокачественные новообразования мозжечка и(или) задней черепной ямки. Средний возраст пациентов с данным типом патологии — 6.9 года (Талабаев, Конопля, 2009). Общая выживаемость, страдающих этим недугом составляет 32 % (Ziegler et al., 2006). На сегодняшний день основными методами лечения интракраниальных опухолей мозга остаются хирургическая резекция, лучевая и химиотерапия. Их эффективность в отношении медуллобластом невысока, поэтому для их лечения перспективно раскрытие молекулярных механизмов канцерогенеза, так же как и поиск антинеопластических агентов. В качестве

таковых могут рассматриваться ростовые факторы, в частности фактор роста нервов (ФРН) и интерлейкин-6 (ИЛ-6). Поиск новых агентов с учетом этических норм может проводиться лишь в условиях *in vitro*. Этим требованиям отвечают результаты исследований на первичных культурах медуллобластом. Цель работы — изучить действие ФРН и уровни ИЛ-6 на первичных культурах медуллобластомы человека.

Кусочки биопсийного материала подвергали механической и ферментативной обработке трипсином и переносили в чашки Петри с полноценной средой, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Спустя 2 сут в культуру добавляли 7S-форму рекомбинантного ФРН (100 нг/мл). На следующие сутки оценивали жизнеспособность клеток медуллобластомы по результатам цифровой фотосъемки с помощью программ AnalySIS getIT и Image J. Уровни ИЛ-6 определяли с использованием человеческого набора ИЛ-6 для иммуноферментного анализа.

Внесение в культуральную среду 7S-формы ФРН достоверно ( $P < 0.05$ ) увеличивало гибель клеток до  $45.7 \pm 7.9$  % по отношению к контролю  $26.4 \pm 2.8$  % ( $n = 7$ ). Их отмирание происходило по апоптотическому типу, о чем свидетельствует уменьшение клеточных размеров с  $6.3 \pm 0.5$  мкм в контроле до  $2.9 \pm 0.4$  мкм ( $P < 0.0001$ ) под действием ФРН, наличием на цифровых фотографиях апоптотических тел и фрагментов клеток. Согласно данным литературы (Li et al., 2010), к программированной смерти клеток медуллобластомы приводит активация сигнальных путей JNK и Delta/Notch.

С другой стороны, уровни белка ИЛ-6 в образцах кондиционированной клетками медуллобластомы среды статистически значимо ( $P < 0.05$ ) уменьшались с  $481.7 \pm 63.6$  пг/мл в контроле до  $86.5 \pm 2.3$  пг/мл под действием ФРН. Эти результаты свидетельствуют о том, что ИЛ-6 в культуре медуллобластомы может выступать как митогенный фактор, ингибирующий апоптоз. Из литературы известно (Liu et al., 2010), что ИЛ-6 активирует сигнальные пути JAK/STAT и  $\beta$ -кадгерин/Wnt, последний из которых может стимулировать экспрессию онкогена *c-myc*.

Таким образом, одним из путей реализации ингибирующего влияния фактора роста нервов на рост клеток нейроэпителиальных опухолей человека *in vitro* может быть ИЛ-6, редукция уровня которого в культуре ассоциируется с увеличением гибели опухолевых клеток.

### Список литературы

- Талабаев М. В., Конопля Н. Е. 2009. Радикальность нейрохирургического вмешательства в лечении нейроэпителиальных опухолей задней черепной ямки. Мед. панорама. 3 : 10—15.
- Ziegler D. S., Cohn R., McCowage G., Alvaro F., Oswald C., Mrongovius R., White L. 2006. Efficacy of vincristine and etoposide with escalating cyclophosphamide in poor-prognosis pediatric brain tumors. *Neuro-Oncology*. 8 : 53—59.
- Li C., Macdonald Ji., Hryciw T., Meakin S. O. 2010. Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells. *J. Neurochem*. 112 (4) : 882—899.
- Liu Q., Li G., Li R., Shen J., He Q., Deng L., Zhang C., Zhang J. 2010. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *J. Neurooncol*. 100 (2) : 165—176.

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОБЛАСТОИДНОЙ ЛИНИИ NAMALVA. © О. А. Шаикова, М. П. Самойлович, А. А. Пиневиц, Н. Л. Вартамян, Л. Н. Киселева, В. Б. Климович. ФГУ РНЦ радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) способны угнетать или стимулировать размножение трансформированных клеток в зависимости от гистогенеза последних, уровня их дифференцировки и(или) условий культивирования.

Задача работы состояла в изучении влияния МСК жировой ткани на пролиферацию лимфобластоидных клеток линии Namalva при разных условиях культивирования.

МСК выделяли из подкожной жировой ткани, полученной от пациентов в ходе выполнения плановых хирургических операций. Ткань измельчали и переваривали коллагеназой. Полученную взвесь клеток засевали в культуральные флаконы, через 1 сут удаляли фракцию клеток, не прилипающих к пластику. Лимфобластоидная линия Namalva была получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки того и другого типов культивировали в атмосфере с 5 %  $\text{CO}_2$  и 5 или 20 %  $\text{O}_2$  (гипоксия или нормоксия соответственно). Использовали среду DMEM/F12 с 5 % сыворотки эмбрионов коров. Дефицит ростовых факторов создавали за счет уменьшения содержания сыворотки до 2.5 % или использования серий сыворотки со сниженной ростостимулирующей активностью.

Действие МСК на клетки Namalva исследовали с помощью метода контактного сокультивирования. МСК рассевали по 5 тыс. клеток на  $1 \text{ см}^2$ , через 1 сут вносили клетки Namalva в концентрации от 5 до 50 тыс. клеток в 1 мл. Культивировали в течение 5 сут, после чего клетки Namalva отделяли от МСК и подсчитывали на кондуктометрическом счетчике. Исследовали также влияние на пролиферацию клеток Namalva ростовой среды, кондиционированной МСК. Контролем служили клетки Namalva, культивируемые без МСК или кондиционированной ими среды. С помощью проточной цитометрии установлено, что выделенные от пациентов клетки по фенотипу соответствуют МСК жировой ткани.

При сокультивировании наблюдали образование тесных контактов между клетками Namalva и МСК. Численность популяции клеток Namalva увеличивалась по сравнению с контролем в 1.5—2.5 раза. Усиление пролиферации в присутствии МСК было наиболее выражено при низких посевных дозах лимфобластоидных клеток. Среда, кондиционированная МСК, частично воспроизводила этот эффект при высокой плотности посева клеток Namalva. При дефиците сывороточных ростовых факторов сокультивирование с МСК обеспечивало выживание клеток Namalva, а также способствовало их пролиферации. Количество клеток по сравнению с контролем при этом увеличивалось в 2—20 раз в зависимости от посевной дозы лимфобластоидных клеток.

Культивирование в условиях гипоксии не влияло на жизнеспособность клеток Namalva и стимулировало их пролиферацию. Количество клеток возрастало в 1.5—3.5 раза по сравнению с условиями нормоксии как при сокультивировании с МСК, так и в контроле.

Таким образом, МСК из жировой ткани обеспечивают выживание и пролиферацию трансформированных В-лимфобластоидных клеток линии Namalva в условиях дефицита ростовых факторов.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ЖЕНСКИХ ГАМЕТ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © Ю. И. Шеина, А. В. Еремеев, А. М. Полстяной, А. В. Светлаков. «ООО Красноярский центр репродуктивной медицины».

Синдром раннего истощения яичника является одним из неизлечимых форм женского бесплодия, которое на сегодняшний день преодолевается только при использовании донорских яйцеклеток. Тем не менее недавние исследования в области клеточной биологии по получению половых клеток из эмбриональных стволовых клеток дают шанс в будущем таким женщинам забеременеть с помощью своих, полученных *de novo* яйцеклеток. Для разработки метода получения женских половых клеток, пригодных для дальнейшего использования в клеточной терапии, необходим подбор условий для их дифференцировки, исключающий содержание в культуральной среде иммуногенных агентов, таких как эмбриональная бычья сыворотка и питательный слой из эмбриональных фибробластов мыши. В связи с этим целью данной работы была разработка метода получения женских гамет из эмбриональных стволовых клеток человека в условиях отсутствия компонентов животного происхождения.

Для проведения работы была взята линия эмбриональных стволовых клеток человека ESM-01. Нарращивание биомассы клеток для дальнейшего использования в эксперименте производили в среде M-TesR1 на коммерческой подложке Matrigel (Stem cells technology). Первые 7 сут эксперимента ЭСК человека культивировали в среде, содержащей в своем составе морфогенный белок 4 (BMP4). На 8-е сут культуры переводили на среду, содержащую ретиноевую кислоту. На 14-е сут к предыдущему составу среды добавляли фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны. Каждые 3 сут в ходе эксперимента производил забор клеток для проведения ОТ-ПЦР на гены-маркеры гаметогенеза *oct4*, *blimp1*, *dppa3*, *ifitm3*, *stra8* и *zp3*. Кроме того, перед переводом культуры на среду с новым фактором дифференцировки часть колоний фиксировали для проведения иммуноцитохимического анализа на экспрессию генов *oct4* и *zp3*.

В ходе работы было выявлено, что на ранних этапах дифференцировки наблюдалась высокая активность гена *blimp1*. Уровень его экспрессии снижался и полностью исчезал после добавления к культуре клеток гормонов. Такая же картина по уровню экспрессии наблюдалась и с *oct4*. Ген *dppa3* начинал активно экспрессироваться в ходе инкубации клеток с ретиноевой кислотой и в присутствии гормонов. Высокий уровень экспрессии гена *Ifitm3* наблюдался на всех этапах дифференцировки. При добавлении в культуру гормонов появлялась экспрессия гена *stra8*. Кроме того, в присутствии ретиноевой кислоты и далее при добавлении в культуру лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов наблюдалась слабая экспрессия гена *zp3*. Полученные данные по присутствию экспрессии гена *zp3* в культуре клеток подтверждаются и иммуноцитохимическим методом, при котором было выявлено присутствие белка ZP3 в культуре клеток, инкубированных с фолликулостимулирующим и лютеинизирующим гормонами.

По результатам данной работы можно сделать вывод о том, что поэтапное добавление в культуру факторов гаметогенеза способствует прохождению клетками всех стадий образования половых клеток до образования ооцитоподобных структур, несущих в своем составе белок

*zona pellucida*. Кроме того, результаты анализа экспрессии генов-маркеров гаметогенеза показывают, что полученная культура клеток является неоднородной и на разных стадиях дифференцировки одновременно в культуре присутствуют как клетки раннего гаметогенеза, так и уже созревающие ооциты, что говорит о необходимости доработки метода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ИШЕМИИ МИОКАРДА. © Е. А. Шуман, А. В. Коротков, О. Г. Макеев. ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий и ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, Екатеринбург.

В настоящее время в качестве альтернативного подхода к лечению пациентов с сосудистой недостаточностью миокарда является путь, предусматривающий генетическую модификацию стволовых клеток с целью повышения эффективности их применения за счет сочетания генной и клеточной терапии.

В нашем исследовании для генетической модификации прогениторных клеток кролика был использован плазмидный вектор, несущий ДНК гена фактора роста эндотелиоцитов, последний образуется в клетках после их трансфекции и обуславливает новообразование капилляров

Прогениторные клетки выделяли из жировой ткани кролика с применением методики, разработанной N. S. Hwang. Полученные клетки трансфицировали плазмидой с ДНК гена фактора роста эндотелиоцитов (VEGF) или плазмидой гена зеленого флуоресцирующего белка (EGFP).

Эксперименты проводили на кроликах породы шиншилла (массой 2,8—3,2 кг). Неполная окклюзия (80 %) левой передней нисходящей артерии достигалась путем перевязки на мадрене. В ходе вмешательства в зону ишемии миокарда вводили трансфицированные VEGF или EGFP прогениторные клетки ( $1,0 \cdot 10^6$  кл./см<sup>2</sup>). Экспериментальной группе животных ( $n = 5$ ) вводили прогениторные клетки, трансфицированные плазмидой, экспрессирующей VEGF, контрольной группе ( $n = 5$ ) — клетки с EGFP.

Показатели ангиогенеза оценивали спустя 30 сут после вмешательства методами микроскопии и микрометрии. В образцах ткани определяли число капилляров и средний диаметр капилляра. Величину парциального давления кислорода (pO<sub>2</sub>) в миокарде определяли методом полярографии.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что спустя 30 сут после развития неполной окклюзии артерии в опытной группе животных плотность капиллярной сети в зоне ишемии была выше, чем в областях миокарда с перфузией. В поврежденной области отмечалась тенденция к образованию разветвленных анастомозов. Одновременно в контрольной группе плотность сосудистого русла была менее выражена, чем в соседних, не затронутых ишемией участках миокарда.

Морфометрический анализ показал, что хотя средний диаметр капилляров в опытной и контрольной группах существенно не различался (разница контроль/опыт составила 7,2 %,  $P > 0,1$ ), общее число функционирующих капилляров в опытной группе существенно превышал

аналогичный параметр группы контрольных животных (на 224.2 %,  $P < 0.05$ ). Средняя плотность капиллярной сети, суммарная площадь поверхности и парциальное давление кислорода в опыте оказались также выше аналогичных показателей, зарегистрированных в контроле, на 350.1 % ( $P < 0.01$ ), 245.4 % ( $P < 0.01$ ) и 282 % ( $P < 0.01$ ) соответственно.

Таким образом, полученные данные подтверждают перспективность применения прогениторных клеток, сверхэкспрессирующих VEGF, для стимуляции ангиогенеза в области ишемии.

**РАЗРАБОТКА БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСНЫХ ИМПЛАНТАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ТРАВМ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ.** © А. В. Щеблыкина,<sup>1,3</sup> И. В. Дюйзен,<sup>1</sup> А. А. Астахова,<sup>1</sup> Е. В. Демиденко,<sup>1</sup> Ю. С. Хотимченко,<sup>1,2</sup> В. В. Кумейко.<sup>1-3</sup> <sup>1</sup>Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, <sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет и <sup>3</sup> Общество с ограниченной ответственностью «Биоплантекс-Восток», Владивосток.

В настоящий момент значительное количество исследований направлено на разработку гидрогелей, имитирующих внеклеточный матрикс, как основы биополимерно-клеточных имплантатов для лечения различных заболеваний и травм нервной системы. Мы предлагаем использовать в качестве основного вещества гидрогелей оригинальный полисахаридный комплекс (МПК).

Разработана схема получения однокомпонентного углеводного гидрогеля (состоящего только из МПК) и исследована возможность применения его в качестве имплантата на модели острой травмы спинного мозга крыс. Имплантация гелей на основе МПК крысам с травмой

спинного мозга оказывала выраженный антинейропатический эффект: в 100 % случаев у животных экспериментальных групп отсутствовали признаки аутономии, характерные для животных контрольной группы. Однако восстановления двигательной активности в задних конечностях не наблюдали у животных обеих групп.

Следующим этапом в разработке биополимерного матрикса, способствующего регенерации спинного мозга, стало создание композитного гидрогеля, в состав которого входят три компонента — углеводный (МПК), фибриллярный (модифицированная форма коллагена I типа) и нейроиндукторный.

Имплантация композитного гидрогеля способствовала восстановлению двигательных функций задних конечностей крыс. Через 3 мес после операции значительное количество животных опытной группы проявляло способность к самостоятельному передвижению с использованием подошвенных поверхностей обеих задних лап и с периодической координацией их с передними. Приблизительно у 20 % крыс обе задние лапы использовались для ходьбы, хотя при этом вес не удерживался подошвенными поверхностями лап. У некоторых животных опытной группы признаки восстановления двигательной функции были отмечены лишь для одной из задних конечностей. Таким образом, полученный композитный материал кроме антинейропатического действия проявляет нейрорепаративные эффекты, способствуя восстановлению двигательных функций крыс после острой травмы спинного мозга.

Разработанный матрикс на основе композитного биодеградируемого гидрогеля в настоящий момент проходит испытания для создания трехмерных биополимерно-клеточных имплантатов, перспективных для реконструктивной терапии травм нервной системы.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

---