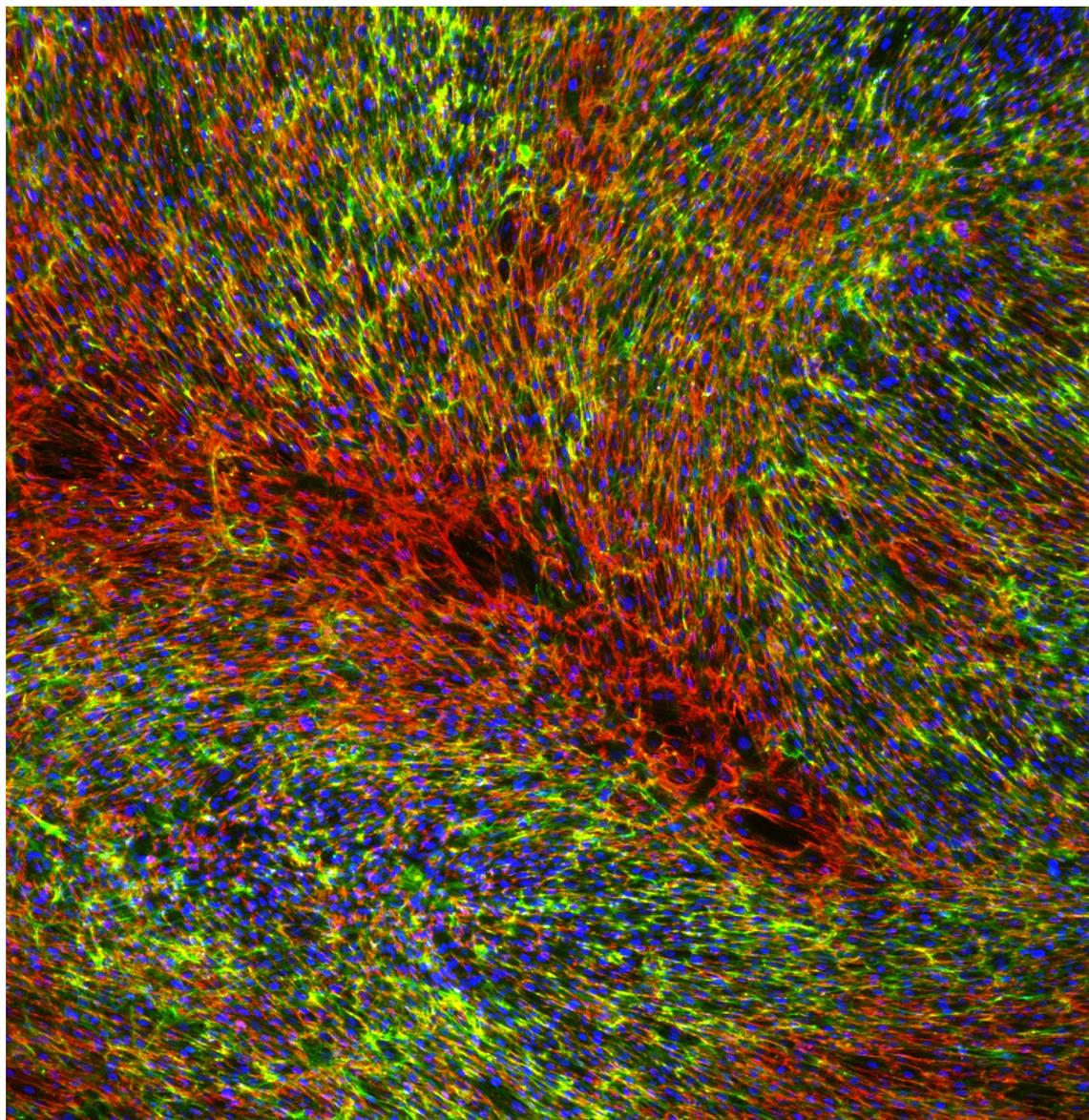


ISSN 2313-1829

Том XIV, Приложение, 2019

Гены & Клетки

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



**МАТЕРИАЛЫ IV НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА
ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ**

Москва, 20–23 ноября 2019 года

www.genescells.ru

ИНСТИТУТ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

ИЗМЕНЕНИЯ В ФУНКЦИЯХ МИТОХОНДРИЙ, ПРОДУКЦИИ АФК И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ММСК ПРИ СТАРЕНИИ

Егор Юрьевич Плотников^{1,2}, **Денис Николаевич Силачев**^{1,3}, **Кирилл Владимирович Горюнов**², **Татьяна Игоревна Данилина**¹, **Любава Дмитриевна Зорова**¹, **Ирина Борисовна Певзнер**¹, **Геннадий Тихонович Сухих**², **Дмитрий Борисович Зоров**^{1,2}

¹ НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

plotnikov@belozersky.msu.ru

Возрастная структура заболеваемости для многих социально-значимых патологий предполагает лечение прежде всего пожилых пациентов. Используемые в этом случае терапевтические подходы должны учитывать особенности физиологии возрастных пациентов. Это напрямую касается и клеточных технологий, в частности наиболее часто используемых для терапии аутологичных мезенхимальные мультиморфных стромальных клеток (ММСК).

Целью работы было изучение функциональных особенностей старых ММСК, в первую очередь относящихся к энергетическому метаболизму, функционированию митохондрий и развитию окислительного стресса.

Эксперименты проводили на клетках, полученных из костного мозга эмбрионов крыс и взрослых животных (16–18 мес.). Полученные на животных закономерности затем проверялись на ММСК человека, полученных из перинатальных тканей и у взрослых людей. В клетках анализировали продукцию активных форм кислорода (АФК), количество митохондрий и величину митохондриального трансмембранного потенциала, скорость пролиферации и проявления признаков клеточного сенесценса. Одним из ключевых проанализированных параметров была терапевтическая эффективность ММСК из доноров разного возраста, которую изучали при введении животным после моделирования у них черепно-мозговой травмы.

Мы показали, что ММСК от взрослых животных имеют более низкую скорость пролиферации, чем фекальные ММСК, а также повышенную продукцию АФК. Причем повышенная продукция АФК происходит в основном в митохондриях, что доказано применением специфического зонда MitoSOX. Это указывает на возможность повреждения митохондрий стволовых клеток по мере их старения.

Обнаружена аккумуляция в ММСК маркера клеточного старения липофусцина и ассоциированной со старением β-галактозидазы. Важно, что еще более выраженным накоплением этих маркеров было при длительном (более 8 пассажей) культивировании ММСК.

Выявлено, что клетки от взрослых животных обладали значительно меньшей нейропротекторной эффективностью по сравнению с молодыми ММСК в модели черепно-мозговой травмы.

Таким образом, мы показали, что у ММСК из взрослых доноров наблюдается ряд негативных физиологических изменений, которые могут серьезно ограничивать применение аутологичных ММСК для клеточных технологий у возрастных пациентов.

Работа поддержана грантом Президента РФ МД-2065.2018.4.

ЭФФЕКТ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ИБС, КОТОРЫМ ПРОВОДИЛАСЬ ТРАНСМИОКАРДИАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ В СОЧЕТАНИИ С ИМПЛАНТАЦИЕЙ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАННЫХ ЭРИТРОПОЭТИНОМ КЛЕТОК АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА

Ольга Владимировна Повещенко^{1,2}, **Мария Александровна Суровцева**^{1,2}, **Александр Петрович Лыков**^{1,2}, **Ирина Иннокентьевна Ким**^{1,2}, **Наталья Анатольевна Бондаренко**^{1,2}, **Евгения Викторовна Янкайте**¹, **Александр Михайлович Чернявский**², **Алексей Вячеславович Фомичев**²

¹ НИИКЭЛ филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

poveschenkoov@yandex.ru

Функциональная активность трансплантированных клеток зависит от влияния на них биологически активных веществ, как продуцируемых резидентными клетками в области образования новых сосудов, так и клетками, участвующими в неоваскулогенезе. Известно, что эритропоэтин способен влиять на различные типы клеток.

Цель работы: исследование паракринного взаимодействия биологически активных веществ, секретируемых в культуральную среду эндотелиальных клеток и мононуклеарных клеток костного мозга (МНК-КМ) пациентов с ИБС. Оценивали пролиферацию и миграцию клеток в режиме реального времени на приборе xCELLigence System. Для сравнительного исследования при культивировании использовали VEGF и Epo. Показано, что паракринные стимулы кондиционной среды от клеток EA.hy 926 (клетки эндотелиоцитов артерий) не оказывают влияния на пролиферативный потенциал МНК-КМ. В тоже время, кондиционная среда от клеток EA.hy 926 усиливает пролиферацию МНК-КМ, подвергшихся преинкубации с эритропоэтином. Кроме этого, кондиционные среды от МНК-КМ после преколонизации с эритропоэтином приводят к значимому усилению миграции клеток EA.hy926 в направлении к градиенту плотности ростовых факторов. Преколонизация с эритропоэтином способствует значимому усилению продукции МНК-КМ эритропоэтина и снижению уровней продукции PDGF, и не оказывает существенного влияния на продукцию IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, IGF, TGF-β, NO. Таким образом, МНК-КМ и эндотелиальные клетки оказывают взаимовлияние, а обработка клеток эритропоэтином способствует повышению функционального состояния суммарного секреторного продукта МНК-КМ пациентов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ММСК IN VITRO ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Анна Григорьевна Полешко,
Игорь Дмитриевич Волотовский

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

renovacio888@yandex.ru

Мультиморфные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) — один из наиболее востребованных

В случае более короткой временной точки ингибирования DDX3 *in vivo* наблюдаемые изменения имеют больше корреляций с данными, полученными для клеточной линии, тогда как после 13 дней ингибирования появляются признаки воспалительного процесса и меняется профиль биологических процессов в печени.

Финансирование исследования: РФФ 19-74-00119.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК MALAT1, СВЯЗАННОЙ С НЕЙРОГЕНЕЗОМ, В ПЯТИ ОТДЕЛАХ МОЗГА МЫШЕЙ В МОДЕЛИ СТРЕССА ВЫЯВИЛА ЗНАЧИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИПОТАЛАМУСЕ

**Иван Алексеевич Сидоренко,
Владимир Николаевич Бабенко**

Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

vanyasidorenko22@gmail.com

Большое количество длинных некодирующих РНК (lncRNA) экспрессируются в нейрогенезе и в ряде злокачественных опухолей. Мы исследовали одну из наиболее известных lncRNA *Malat1* по данным полнотранскриптомного анализа в мозге мыши, используя модель стресса. Данная lncRNA служит индикатором и медиатором масштабного изменения профиля экспрессии генома, участвуя (влияя) в таких процессах, как транскрипция, сплайсинг и ремоделинг хроматина. На основе анализа профилей экспрессии *Malat1* и ряда ее аннотированных партнеров в пяти областях мозга (гиппокамп, гипоталамус, стриатум, ВТА, МРН) мы выяснили, что данные lncRNA наиболее интенсивно экспрессируются в стриатуме, что подчеркивает его интенсивный энергетический метаболизм по сравнению с другими отделами. Другое примечательное наблюдение состоит в том, что в гипоталамусе существенно снижается экспрессия основных генов комплекса у стрессированных мышей по сравнению с контролем. На основе проведенного анализа можно считать, что уменьшение экспрессии гена нейрогенеза *Malat1* в связи со стрессом может воздействовать, как показано в публикациях, на иммунную систему, меняя экспрессионную активность множества генов по сравнению с контролем, что приводит к злокачественным образованиям.

ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ ПРОГРАММЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

**Любовь Сергеевна Сидорович,
Наталья Аркадьевна Михайлова,
Михаил Георгиевич Хотин**

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Isidorovich96@gmail.com

Ключевой задачей системы GMP (good manufacture practice) при производстве биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) является обеспечение качества, а значит и безопасности конечного продукта. При производстве БМКП используют асептические технологии, чистые помещения и стерильные материалы, а также регулярно производят мониторинг микробиологической чистоты производства. Микробиологический мониторинг производственной среды осуществляется с целью гарантии стабильности асептических условий производства, выявления начальных отклонений и выработке корректирующих действий

до возникновения ситуаций, приводящих к появлению нестерильной продукции. При введении программы микробиологического мониторинга окружающей среды ключевыми задачами являются: выбор методов и приборов для проведения исследований, выбор точек отбора проб с последующим составлением планов отбора проб, установление уровней тревоги и действия. Группой контроля качества опытного производства биомедицинских клеточных продуктов ИИЦ РАН внедрена программа микробиологического мониторинга производственной среды на основании санитарных правил, «Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами», методических рекомендаций МУ 44-11 Б «Асептическое производство медицинских иммунобиологических препаратов», утвержденных МЗ России 19.05.97 г., а также рекомендаций «World Health Organization». Для выявления микроорганизмов были выбраны следующие методы.

Ударное действие воздушной струи для определения количества микроорганизмов в воздухе.

Седиментационная чашка для определения микроорганизмов в воздухе во время проведения асептических процессов.

Контактная чашка/отпечаток пальцев для выявления микроорганизмов на поверхностях рабочих зон, оборудования, одежды.

Смывы ватными тампонами для взятия образцов с ограниченных поверхностей.

Точками отбора проб были выбраны: место попадания сырья в чистую зону; место работы оператора с продуктом; места контакта сырья и поверхностей; места схождения воздушных потоков. Утвержден календарный план отбора проб в соответствии с нуждами производственной среды и установлены критические значения количества микроорганизмов в окружающей среде (уровни действия и тревоги).

В результате внедрения программы микробиологического мониторинга были обеспечены асептические производственные условия, снижена общая биологическая нагрузка контролируемой среды, утверждены корректирующие действия, направленные на избежание последующей контаминации производственной среды.

ВЛИЯНИЕ МСК И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МСК, НА КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ

Денис Николаевич Силачев^{1,2}, Кирилл Владимирович Горюнов¹, Маргарита Александровна Шпилюк¹, Ольга Сергеевна Безнощенко¹, Наталья Яковлена Морозова¹, Елизавета Евгеньевна Краева¹, Василий Андреевич Попков^{1,2}, Ирина Борисовна Певзнер^{1,2}, Любава Дмитриевна Зорова^{1,2}, Екатерина Алексеевна Евтушенко², Наталья Леонидовна Стародубцева¹, Алексей Сергеевич Кононихин¹, Анна Евгеньевна Бугрова¹, Евгений Геннадиевич Евтушенко², Егор Юрьевич Плотников^{1,2}, Дмитрий Борисович Зоров^{1,2}, Геннадий Тихонович Сухих¹

¹ ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

d_silachev@oparina4.ru

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) используются в качестве мощного терапевтического инструмента для лечения ряда патологий,

включая иммунные патологии. Однако в литературе имелись сообщения о нежелательном влиянии МСК на свертываемость крови, что побудило нас исследовать прокоагулянтные свойства МСК человека, выделенные из послеродовой пуповины. Мы выявили сильные прокоагулянтные эффекты МСК на кровь человека и плазму, свободную от тромбоцитов, с использованием ротационной тромбоэластометрии и тромбодинамических тестов. Подобное потенцирование свертывания было продемонстрировано для внеклеточных везикул (ВВ), полученных из кондиционированной среды от МСК. Чтобы предложить подходы, позволяющие избежать нежелательных эффектов в клинике, мы изучили влияние гепарина на прокоагуляционные свойства МСК. Исследования *in vitro* показали, что МСК сохраняли прокоагулянтную активность в отношении крови у детей, получающих терапевтическую дозу нефракционированного гепарина. Анализ механизмов, ответственных за прокоагулянтный эффект МСК/ВВ, выявил присутствие тканевого фактора и других белков, участвующих в связанных с коагуляцией путях. Кроме того, мы обнаружили, что некоторые МСК и ВВ были положительными на аннексин V, что подразумевает присутствие фосфатидилсерина на их поверхностях, который может запускать прокоагулянтные пути. Таким образом, мы выявили прокоагулянтную активность МСК/ВВ, связанную с присутствием фосфатидилсерина и тканевого фактора. В этой связи необходимо дальнейшее детальное изучение молекулярных механизмов опосредованной МСК коагуляции для предотвращения нежелательных побочных эффектов терапии МСК.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ КОЛЛАГЕН-ЛАМИНИНОВЫХ МАТРИЦ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИГУАНИДИН, ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ РАНЕВЫХ ДЕФЕКТОВ

Татьяна Юрьевна Синицына¹, Марина Николаевна Парасковой¹, Арюна Пурбодоржиевна Цыбденова², Юрий Содномович Балханов², Олег Сергеевич Очиров³, Эрдэм Баирович Даширмаев⁴

¹ ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова», Улан-Удэ, Россия;

² МИП «Байкальский центр биотехнологий», Улан-Удэ, Россия;

³ Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Россия;

⁴ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

sint96@inbox.ru

Актуальность. Раневые инфекции, несмотря на большое количество разработок и применения новых материалов в лечении повреждений мягких тканей, остаются довольно распространёнными осложнениями ранозаживления. Одним из перспективных подходов к улучшению результатов лечения ран является создание средств, ускоряющих эпителизацию дефекта, при этом обладающих антисептической активностью и свойствами биосовместимости.

Целью нашей работы являлось: оценить эффективность децеллюляризованных коллаген-ламининовых матриц, содержащих гидрогель на основе полигуанидина, при репарации моделированных лоскутных ран крыс.

Материалы и методы. При сочетании методик экстрагирования коллагена из сухожилий хвостов крыс, получения коллагеновых подложек, культивирования кератиноцитов линии HaCaT на коллагеновой матрице с последующим децеллюлированием создан композитный материал, содержащий коллаген I типа и ламинин. Для модификации полученной тканеинженерной конструкции предлагается гидрогель основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, полученный путём сшивания концевых аминогрупп полимера формальдегидом.

Исследования по ранозаживлению выполнены на крысах-самцах линии Wistar. На модели раневого дефекта, полученные путем иссечения кожно-фасциального лоскута с предотвращением раневой контракции с помощью фиксации края раны шовным материалом, накладывали аппликации полимерного композитного материала и закрывали перевязочным материалом.

Результаты. С помощью гистологических методов через 21 день на участках повреждения отмечены сформированные эпителиальные пласты, на уровне дермы молодые незрелые коллагеновые волокна, расположенные упорядоченно, плотно, преимущественно параллельными рядами. Полученные патоморфологические данные по восстановлению целостности кожного покрова позволяют рассматривать коллаген-ламининовый матрикс в сочетании с полигуанидином перспективным ранозаживляющим материалом.

Выводы.

1. Получен модифицированный биodeградируемый композитный материал, обладающий выраженным стимулирующим влиянием на заживление ран и антисептическими свойствами.

2. Показано восстановление целостности кожного покрова и снижение воспалительного процесса в ране, благодаря применению созданной репаративной тканеинженерной композиции на основе децеллюляризованной коллаген-ламининовой подложки, модифицированной полигуанидином.

Исследования выполнены при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «У.М.Н.И.К.».

СПОСОБ СОЗДАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ОСТЕОПОРОЗА

Сергей Владимирович Сирак, Евгений Вячеславович Щетинин, Николай Николаевич Диденко, Алла Григорьевна Сирак, Мария Олеговна Диденко

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия;

dr.maria.didenko@gmail.com

Создание модели остеопороза в эксперименте на крупных животных продиктовано необходимостью прогнозирования течения и возможных исходов различных патологических состояний организма на фоне сопутствующего остеопороза.

Цель исследования: разработать способ создания экспериментальной модели остеопороза, позволяющей исключить летальность подопытных субъектов, получив при этом полноценную и необратимую модель остеопороза с большим объемом тканей, доступных для исследования.

Материалы и методы. Исследование проведено на 10 трехлетних овцах Северо-Кавказской породы.

В основной группе (6 животных) под общим наркозом (Zoletil 50) выполняли двухстороннюю овариоэктомию,