



Nalgene and Nunc Life Science

Moving Science Forward

- Фильтрация
- Продукты для криоконсервации
- Посуда для клеточных культур
- Хранение и транспортировка



ОАО «Институт стволовых клеток человека»

Гемабанк

ООО «Гемафонд» (Украина)

ThermoFisher Scientific

Материалы III Международного Симпозиума «Актуальные вопросы клеточных технологий»

Москва, 27 сентября 2010 г.

Д.И. Андреева, И.М. Газизов,
М.С. Калигин, А.П. Киясов

Участие трансфицированных мононуклеаров пуповинной крови человека в регенерации печени крыс

ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский
университет», Казань, Россия
goober@mail.ru

D.I. Andreeva, I.M. Gazizov, M.S. Kaligin, A.P. Kiyasov

The role of transfected human umbilical cord blood cells in liver regeneration after partial hepatectomy in rats

Цирроз печени занимает первое место среди причин смертности от болезней органов пищеварения. Единственным эффективным методом лечения цирроза на сегодняшний день является трансплантация печени. Однако ее применение весьма ограничено проблемой нехватки донорских органов, а также возможностью отторжения трансплантированного органа и необходимостью пожизненного приема иммуносупрессивных препаратов. В качестве альтернативы трансплантации печени могут быть разработаны и внедрены методы регенеративной медицины и, в частности, трансплантация стволовых/прогениторных клеток. В клеточной медицине возможно применение как аллогенных, так и аутогенных клеток для лечения ряда заболеваний печени. Однако существуют болезни печени, например наследственные метаболические нарушения, в отношении которых применение аутогенных стволовых клеток очень ограничено. В таком случае весьма перспективным направлением станет разработка методов генетической модификации стволовых и прогениторных клеток и трансплантация готовых «генетически вылеченных» клеток таким больным.

Цель исследования: изучить участие генетически модифицированных мононуклеаров пуповинной крови человека в регенерации печени крыс после частичной гепатэктомии.

Материал и методы. Исследование проведено на 15 беспородных крысах-самцах, которым производили операцию частичной гепатэктомии (ЧГ) по методике Хиггенса и Андерсона и интраоперационно внутриселезеночно вводили 1×10^6 ядросодержащих клеток пуповинной крови человека, трансфицированных

геном зеленого флуоресцирующего белка. Трансфекцию мононуклеарной фракции пуповинной крови человека проводили методом электропорации при вольтаже 300, ёмкости 1500 мкф. Животных забивали под эфирным наркозом через 2, 5, 7 сут. после операции, затем органы фиксировали и заливали в парафин по стандартной гистологической методике.

Парафиновые срезы окрашивали иммуногистохимически с моноклональными антителами к зеленому флуоресцентному белку (GFP, разведение 1:800, SIGMA, USA), человеческому лейкоцитарному антигену (HLA-ABC, разведение 1:10, DAKO, Denmark), специфическому антигену гепатоцитов человека (HSA, разведение 1:50, DAKO, Denmark), маркеру гепатобластов и показателю их секреторной активности (α -фетопротейну, разведение 1:200, DAKO, Denmark). Также клетки выявляли на флуоресцентном микроскопе по свечению зеленого флуоресцирующего протеина.

Результаты. Установлено, что трансплантированные генетически модифицированные клетки пуповинной крови человека довольно быстро попадают в печень: на всех исследованных сроках по результатам флуоресцентной микроскопии было выявлено свечение зеленого флуоресцирующего протеина в этом органе. Для определения морфологии этих клеток провели дополнительное окрашивание срезов печени антителами к GFP и выявили присутствие зеленого флуоресцентного белка в гепатоцитах, синусоидных клетках и холангиоцитах уже на ранних экспериментальных сроках. В это же время мы наблюдали в печени экспрессию HLA-ABC — антигена главного комплекса гистосовместимости, широко представленного всеми ядросодержащими клетками человека. Уже на 2 сут. данный маркер клеток человека присутствовал в синусоидных клетках и гепатоцитах. На 5 сут. были выявлены также небольшие HLA-ABC позитивные клетки, находящиеся в структуре портальных трактов, вблизи желчных протоков. Более того, на 7 сут. HLA-ABC позитивные холангиоциты появлялись в структуре мелких новообразующихся протоков.

Полученные нами экспериментальные данные не оставляют сомнений, что генетически модифицированные стволовые клетки пуповинной крови человека мигрируют в печень и дифференцируются в паренхиматозные и непаренхиматозные клетки печени. Но являются ли эти клетки функционально активными или

они лишь фенотипически подобны тем или иным клеткам печени крыс? Для того, чтобы ответить на этот вопрос мы провели окрашивание антителами к HSA — специфическому антигену гепатоцитов человека и АФП человека — маркеру гепатобластов человека и показателю их секреторной активности. И обнаружили экспрессию обоих маркеров клетками печени крыс на всех исследованных сроках, что свидетельствует не только об их происхождении из трансплантированных клеток пуповинной крови, но и говорит о зрелости этих клеток и их функциональной активности.

Заключение. Трансфекция не изменяет биологических свойств стволовых клеток и их способности дифференцироваться в основные клеточные типы печени. Трансплантированные клетки пуповинной крови, трансфицированные геном GFP, мигрируют из селезенки в печень, сохраняют способность к экспрессии клонированного гена и участвуют в регенерации печени.

Таким образом, полученные результаты позволяют на основе разработанных нами методических подходов выработать принципиально новую схему клеточной и генотерапии наследственных заболеваний (таких как болезнь Вильсона — Коновалова, дефицит α 1-антитрипсина, гемохроматоз, гликогенозы и т.д.), связанных с нарушением экспрессии генов в печени, когда в качестве материала для трансплантации будут использованы аутогенные генетически «вылеченные» стволовые клетки пуповинной крови.

Л.А. Бабийчук, В.И. Грищенко, П.М. Zubov,
О.Л. Zubova, В.В. Рязанцев, Л.В. Бабийчук,
О.В. Кудокотцева, С.А. Любич

Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядродержащих клеток пуповинной крови после криоконсервирования*

*Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков, Украина*

L.A. Babyichuk, V.I. Grishchenko, P.M. Zubov, O.L. Zubova,
V.V. Ryazantsev, L.V. Babyichuk, O.V. Kudokovtseva,
S.A. Lyubich

The structure, functions and viability of the umbilical cord blood nuclear cells after cryoconservation

Разработаны новые эффективные методы выделения и криоконсервирования ядродержащих клеток из пуповинной крови, которые позволяют сохранять количественный и качественный состав ядродержащих клеток (в том числе и стволовых гемопоэтических) после выделения, и демонстрируют достаточно высокий уровень сохранности структурно-функциональных свойств и жизнеспособности CD45⁺ и CD34⁺ клеток после криоконсервирования.

* Статья опубликована полностью в рубрике «Оригинальные исследования».

Н.Л. Блатт¹, М.Э. Ялвач², А.К. Шафигуллина³,
И.И. Салафутдинов¹, А.П. Киясов³, А.А. Ризванов^{1, 2, 3}

Влияние Плуроника Р85 на экспрессию мРНК гена остеонектина при остеогенной дифференцировке мезенхимных стволовых клеток человека in vitro

¹ ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

² Департамент генетики и биоинженерии,
Университет Едиптепе, г. Стамбул, Турция

³ ГОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет», Казань, Россия
nblatt@mail.ru

N.L. Blatt¹, M.E. Yalvac², A.K. Shafigullina³, I.I. Salafutdinov¹,
A.P. Kiyasov³, A.A. Rizvanov^{1, 2, 3}

Effect of Pluronic P85 on osteonectin mRNA expression level during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro

Полимерные наночастицы привлекают внимание исследователей в качестве векторов для доставки лекарственных средств. Один из перспективных классов полимеров — неионные полиэфирные блок-сополимеры (Плуроники). Достигнут значительный прогресс в области применения Плуроники для доставки лекарственных средств. Известно, что Плуроники обладают широким спектром биологического действия. Один из перспективных полимерных наночастиц — Плуроник Р85, триблок-сополимер этилен оксида (ЕО) и пропилен оксида (РО) ЕО26-РО40-ЕО26. Показано, что Плуроник Р85 ингибируют механизмы множественной лекарственной резистентности (MDR), повышая эффективность противораковой терапии. Кроме того, недавно было показано, что внутримышечное введение мышам Плуроника Р85 совместно с плазмидной ДНК существенно повышало эффективность прямой генной терапии.

Несмотря на достигнутый прогресс, влияние Плуроники на биологические свойства стволовых клеток человека остается малоизученным. Взаимодействие Плуроники в составе разрабатываемых лекарственных препаратов со стволовыми клетками организма может оказывать опосредованное влияние на регенерационный потенциал организма.

Цель работы: исследовать влияние неионного блок-сополимера (Плуроника) Р85 на экспрессию мРНК гена остеонектина при остеогенной дифференцировке мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) человека in vitro.

Материал и методы. ММСК выделили из третьего моляра человека (зуб мудрости). Непрорезавшиеся третьи моляры человека (3 шт.) удалили хирургическим методом у здоровой пациентки (20 лет) в профилактических целях. Пульпу зуба извлекли в асептических условиях, разрезали на мелкие кусочки стерильным скальпелем и поместили в культуральную среду α MEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров, пенициллина-стрептомицина. После 10 сут. инкубации при +37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂, клетки образовывали монослой. Культуральную среду меняли каждые 2 сут. В экспериментах использовали клетки 4–5 пассажа.

Для остеогенной дифференцировки клетки высевали на 6-луночные плашки в концентрации 3000 клеток/см². На следующий день к клеткам добавляли Плуроник Р85 (BASF) в конечной концентрации 0,01% (вес/объем). После инкубации в течение 24 ч культуральную

среду заменили на дифференцировочную среду. Через 7 сут. дифференцировки выделяли общую РНК из клеток, синтезировали кДНК и проводили количественный анализ экспрессии мРНК гена остеонектина с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Результаты и обсуждение. Известно, что остеонектин — гликопротеин, секретируемый остеобластами и участвующий в минерализации костной ткани. Таким образом, повышение экспрессии мРНК гена остеонектина свидетельствует о повышении дифференцировки ММСК в остеогенном направлении. ММСК — мультипотентные клетки, способные к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях. Нами показано, что обработка ММСК Плуронином Р85 статистически значимо повышала уровень экспрессии мРНК гена остеонектина. Полученные данные могут быть применены в тканевой инженерии при экспансии ММСК *in vitro* с последующей дифференцировкой в остеогенном направлении.

В.Г. Богдан¹, М.М. Зафранская², Ю.М. Гаин²,
Ю.Е. Демидчик²

**Композиционные биоматрицы
с желатиновым матриксом и мультипотентными
мезенхимальными стромальными клетками
жировой ткани**

¹ Военно-медицинский факультет в УО «Белорусский
государственный медицинский университет»

² УО «Белорусская медицинская академия

последипломного образования»,

Минск, Беларусь

bogdan-5@mail.ru

V.G. Bogdan, M.M. Zafranskaya, Y.M. Gain, Y.E. Demidchik

**Comparative descriptoin of composition biomatrises
with three-dimensional gelatinous matrix and adipose
derived multipotent mesenchymal stromal cells
(adMMSC)**

Цель исследования: провести сравнительный анализ эффективности культивирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК ЖТ) крысы в трёхмерном желатиновом матриксе на различных вариантах опорных матриц, которые представлены хирургическими сетками «Prolene», «Vypro», «Ultrapro», «Vicryl» и «Proceed», ориентированными на их дальнейшее использование в качестве пластического материала для восстановления каркасной функции брюшной стенки.

Материал и методы. В планшет с сетками, покрытыми желатиновым матриксом и без него, засеивали ММСК ЖТ крысы второго пассажа в количестве 2×10^4 клеток/см² в 1 мл питательной среды. Инкубировали 3-е сут. По окончании проводили окраску флуоресцентными красителями, после чего микроскопировали в режиме эпифлуоресценции, с последующей трипсинизацией и подсчётом количества прикрепленных к сетке клеток в камере Горяева.

Результаты. При проведении люминесцентной микроскопии на сетках «Vicryl», «Vypro», «Ultrapro», «Prolene», покрытых желатином, а также на образцах сеток «Vicryl», не покрытых желатином, были обнаружены многочисленные группы распластанных живых клеток. При этом на хирургических сетках «Vypro», «Ultrapro», «Prolene» без желатинового матрикса выявлено большое количество одиночно расположенных живых клеток. В лунках со всеми образцами многослойной неадгезивной сетки «Proceed» реакция среды

была кислой, все клетки погибли, и не прикрепилась к матричной основе. Распределение клеток на синтетических материалах было неоднородным, со скоплениями их в участках переплетения нитей и узлах.

Результаты подсчёта числа клеток на 1 см² различных вариантов хирургических сеток, проведенного после трипсинизации, показали достоверное преобладание количества ММСК ЖТ на сетчатом эндопротезе «Vicryl» как с желатиновым матриксом, так и без него ($p=0,0023$ и $p=0,0001$, соответственно). При парном сравнении достоверно установлено, что среди исследованных образцов сеток без желатинового матрикса наибольшей способностью обеспечивать адгезию и рост клеток обладает полностью рассасывающаяся сетка «Vicryl», как по отношению к частично рассасывающимся облегченным композиционным сетчатым имплантатам «Vypro» ($p=0,008$) и «Ultrapro» ($p=0,004$), так и в сравнении с нерассасывающимся материалом «Prolene» ($p=0,0008$). Интактные образцы хирургических сеток «Vypro» и «Ultrapro» в качестве опорной матрицы для МСК ЖТ имеют схожие показатели ($p=0,337$), превосходя «Prolene» ($p=0,002$ и $p=0,028$, соответственно).

Обработка желатином повышает способность сеток обеспечивать адгезию ММСК ЖТ. Выявлено достоверное увеличение количества прикрепленных к сетке жизнеспособных ММСК ЖТ при исследовании всех изучаемых вариантов хирургических имплантатов: «Vicryl» ($p=0,03$), «Vypro» ($p=0,04$), «Ultrapro» ($p=0,04$) и «Prolene» ($p=0,03$). Проведенное парное сравнение образцов сеток, содержащих нерассасывающиеся мононити, покрытых желатином, не выявило достоверных различий между ними («Vypro» — «Ultrapro» $p=0,631$; «Vypro» — «Prolene» $p=0,128$ и «Ultrapro» — «Prolene» $p=0,262$, соответственно) и позволило сделать предположение о том, что желатиновое покрытие в определённой степени нивелирует значение состава опорной матрицы для адгезии и роста ММСК ЖТ, при сохраняющемся достоверно более высоком количестве клеток на сетке «Vicryl» без полипропилена ($p=0,004$). При покрытии этой сетки желатином вместе с ней можно трансплантировать порядка 10 тысяч ММСК ЖТ/см².

Выводы:

1. В условиях эксперимента *in vitro* впервые выполнено сравнительное исследование эффективности культивирования ММСК ЖТ крысы в трёхмерном желатиновом матриксе на различных вариантах опорных матриц, которые представлены хирургическими сетками «Prolene», «Vypro», «Ultrapro», «Vicryl» и «Proceed». Доказано, что трёхмерный желатиновый матрикс достоверно повышает способность композиционных биоматриц на основе хирургических сеток обеспечивать адгезию и рост ММСК ЖТ.

2. Установлено, что желатиновое покрытие нивелирует значение состава опорной матрицы для адгезии ММСК ЖТ среди образцов хирургических сеток, содержащих нерассасывающиеся мононити: «Prolene», «Vypro» и «Ultrapro». При этом сохраняется достоверно большее количество клеток на хирургической сетке «Vicryl», в состав которой не включён полипропилен.

3. Для повышения эффективности трансплантации ММСК ЖТ на хирургических сетках необходимо проведение дальнейших исследований, направленных на поиск новых дополнительных компонентов биотрансплантатов.

С.А. Борзенко¹, А.В. Васильев², А.В. Шипунова¹,
Э.Б. Дашинимаяев², Ю.А. Комах¹, Е.В. Ковшун¹

**Результаты конструирования
биокератопротезного комплекса
с использованием аутофибробластов
кожи реципиента**

¹ ФГУ «МНТК «Микрохирургии глаза»
им. акад. С.Н. Федорова», Москва, Россия

² НИИ Биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия

S.A. Borzenok, A.V. Vasiliev, A.V. Shipunova, E.B. Dashinimaev,
Yu.A. Komakh, E.V. Kovshun

**The results of engineering a biokeratoprosthesis
complex with a recipient skin autofibroblasts**

В настоящее время единственным эффективным методом восстановления зрения пациентам с тяжелыми осложненными бельмами является кератопротезирование. Однако риск отторжения кератопротезов остается очень высоким (до 75% и более) в связи с керато-маляцией иммуновоспалительного генеза. Распространенным подходом в инжиниринге тканей является создание биопротезов, содержащих аллогенные фибробласты в комбинации с полимерными матрицами, интегрированными в организм реципиента. По нашему мнению, использование аутофибробластов для конструирования биокератопротезного комплекса является более перспективным направлением с точки зрения профилактики развития посттрансплантационных реакций.

Цель исследования: разработка технологии изготовления конструкции биокератопротезного комплекса на основе аллогенного роговичного матрикса и прокультивированных аутофибробластов кожи реципиента для лечения осложненных бельм.

Материал и методы. В эксперименте *in vitro* использовались кадаверные роговицы человека, модифицированные рибофлавином и ультрафиолетовым облучением для увеличения прочностных свойств коллагеновых волокон. В качестве клеточных элементов биокератопротезного комплекса применялись выделенные и прокультивированные аутофибробласты кожи человека на коллагеновых микроносителях. Исследования проводились с использованием культуральных, морфологических и иммуноцитохимических методов исследований.

Результаты и обсуждение. Полученная конструкция биокератопротезного комплекса состоит из фотохимически стабилизированной роговицы, в интрастромальный карман которой введены титановая опорная пластина кератопротеза модели Федорова-Зуева и аутофибробласты, прокультивированные на коллагеновых микроносителях.

Фотохимически модифицированная донорская аллогенная роговица является естественной биологической матрицей для аутофибробластов реципиентов. Ее стромальный каркас имеет параллельные коллагеновые пластины с межпластинчатыми щелями, что способствует оптимальной инвазии пролиферирующих фибробластов.

Пролиферация и миграция фибробластов в интрастромальном кармане способствовала образованию фибриллярного синцития и интеграции коллагена микроносителей в строму роговицы. Далее отмечалась выраженная адгезия аутофибробластов к опорной титановой пластине кератопротеза с формированием на ее поверхности клеточного монослоя.

Результаты конструирования биокератопротезного комплекса в эксперименте *in vitro* позволяют считать предложенную конструкцию пригодной для проведения дальнейших экспериментов *in vivo*.

С.А. Борзенко¹, Н.А. Онищенко², Х.Д. Тонаева¹,
М.Е. Крашенинников², Ю.А. Комах¹, Е.В. Ковшун¹

**Лимбальные мультипотентные мезенхимальные
стромальные клетки: способ выделения
и органного культивирования**

¹ ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза»
им. акад. С.Н. Федорова», Москва, Россия

² ФГУ «ФНЦ трансплантологии и ИО
им. акад. В.И. Шумакова», Москва, Россия

S.A. Borzenok, N.A. Onishchenko, Kh.D. Tonaeva,
M.E. Krashennnikov, Yu.A. Komakh, E.V. Kovshun

**Limbic multipotent mesenchymal stromal cells:
a method of isolation and organ culturing**

В связи с ростом числа повторных пересадок и малой эффективностью медикаментозных средств посттрансплантационной иммуносупрессии в настоящее время пристальное внимание стало уделяться свойствам мезенхимальных/прогениторных стволовых клеток (мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток) (МПСК), способных формировать иммунную толерантность при их сотрансплантации с донорским органом. Это положение актуально и для офтальмологии, так как в связи с развитием «болезни трансплантата роговицы» у пациентов, входящих в группу «кератопластики высокого риска», доля повторных пересадок достаточно высока и составляет 25–37%. Также известно, что в лимбальной зоне глаза локализуются клетки, обладающие фенотипом МПСК, которые могут быть объектом выбора для сотрансплантации с донорской роговицей в качестве клеточных индукторов локальной иммуносупрессии.

Цель исследования: разработка технологии выделения и культивирования аллогенных лимбальных мезенхимальных МПСК человека для сотрансплантации с донорской роговицей при кератопластике высокого риска.

Материал и методы. Из глаз трупов-доноров роговиц с помощью микрохирургической техники из перилимбальной зоны получали тканевые лоскуты с полисадами Фогта размером 0,5×1,0×3,0 мм. Выделение и культивирование осуществлялось согласно отработанному нами протоколу: тканевые лоскуты подвергались обработке 0,03% коллагеназой II типа в течение 4 ч при +4°C, затем в течение 15 мин. — диспазой II при +37°C; далее культивирование осуществлялось с использованием стандартных питательных сред DMEM/F-12, содержащих ряд ростовых факторов. В работе применялись гистологические, иммуноцитохимические, морфометрические методы.

Результаты и обсуждение. В процессе органного культивирования лимбальных лоскутов в течение 6 нед. наблюдалось митотическое деление МПСК в межфибриллярных пространствах с сохранением стволовости молодых клеток, определяемой цитологическими и иммуноцитохимическими методами. Причем прирост МПСК в прокультивированных тканевых лоскутах, определяемый методом темнопольной статистической морфометрии, был значительным и достаточным для сотрансплантации реципиентам при кератопластике высокого риска. Для суждения об их супрессивной

функциональной активности в настоящее время нами проводятся исследования цитокинового статуса *in vitro*.

Таким образом, определены оптимальный режим и номинальный срок (6 нед.) культивирования МПСК по разработанному протоколу для сотрансплантации с донорской роговицей человека при кератопластике высокого риска.

А.Г. Борисов, А.А. Савченко, Ю.Е. Мальчевский,
В.А. Козлов, Е.Р. Черных, С.В. Смирнова,
А.А. Останин

Применение внутривенного введения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани

*НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН,
Красноярск, Россия
НИИ клинической иммунологии СО РАМ,
Новосибирск, Россия*

A.G. Borisov, A.A. Savchenko, Yu.E. Malchevsky, V.A. Kozlov,
E.P. Chernykh, S.V. Smirnova, A.A. Ostanin

Using intravenous introduction of autologous multipotent mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue

Применение стволовых клеток, которые способны усиливать собственную регенеративную деятельность организма, в лечении различных заболеваний привлекает наибольшее внимание. Актуальным является выбор источника получения стволовых клеток. Известно, что потенциал эмбриональных стволовых клеток очень высок, они могут давать начало практически всем типам клеток организма и характеризуются высокой пролиферативной активностью. Однако, использование клеток, выделяемых из человеческого эмбриона, связано со многими проблемами. Поэтому в настоящее время все большее внимание уделяется аутогенным стволовым клеткам (АСК). Чаще всего стволовые клетки получают из костного мозга. Менее травматично получать стволовые клетки из периферической крови и жировой ткани. В связи с этим, целью исследования явилась оценка изменений клинических и лабораторных показателей после внутривенного введения АСК, полученных из жировой ткани.

Материал и методы. Аутогенные стволовые клетки (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки) были выделены стандартно с помощью обработки жировой ткани коллагеназой. Трансплантация АСК проведена четырем добровольцам мужского пола в возрасте от 44 до 65 лет после получения от них информированного согласия. Общеклинические анализы и инструментальные исследования проведены до введения АСК, а также через 10 сут., 1, 6 и 12 мес. после внутривенной трансплантации.

Результаты. Трансплантация АСК не сопровождалась развитием каких-либо побочных реакций. Субъективно все обследуемые уже на второй день после введения отмечали улучшение общего самочувствия, повышение работоспособности. В динамике обследования ухудшения самочувствия ни через месяц, ни через год не выявлено.

Через месяц после введения АСК у всех обследуемых наблюдалось увеличение активности аланинаминотрансферазы и содержание сиаловых кислот с последующим снижением значений до исходных показателей через полгода.

Со стороны иммунной системы, наиболее выраженные изменения исследуемых показателей обнаружены через 1 мес. после введения АСК. Так, у одного пациента через 1 мес. после трансплантации АСК обнаружено снижение содержания лимфоцитов и $CD4^{+}$ -клеток с последующим восстановлением их количества до исходного уровня через 6 мес. Кроме того, через 1 мес. после трансплантации у этого же пациента повысилось количество $CD8^{+}$ - и $CD19^{+}$ -лимфоцитов, а также концентрация IgA и IgG. Причем повышенный уровень концентрации IgG сохраняется и через 6 мес. после введения АСК, что также совпадает с высоким содержанием ЦИК. Значения всех исследуемых иммунологических показателей нормализовались через год.

При обследовании у второго пациента обнаружено, что через 1 мес. после трансплантации АСК понижается содержание $CD4^{+}$ -лимфоцитов и повышается количество $CD8^{+}$ -клеток, соответственно со значительным снижением величины дифференцировочного индекса. Через 6 мес. содержание регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови нормализуется, но при повышении величины дифференцировочного индекса относительно исходного уровня. Кроме того, у обследуемого пациента через 1 мес. после внутривенного введения АСК повышается количество $CD19^{+}$ -лимфоцитов и снижается уровень $CD16/56^{+}$ -клеток. Причем, если через 6 мес. количество $CD19^{+}$ -клеток нормализуется, то содержание $CD16/56^{+}$ -лимфоцитов остается пониженным относительно исходного уровня на 24,1%. Значительные изменения выявляются со стороны показателей гуморального звена иммунной системы. Так, через 1 мес. после трансплантации АСК повышается концентрация IgM в сыворотке крови, с последующим увеличением данного класса иммуноглобулина через 6 мес. В этот же период более чем в 2,5 раза снизилась концентрация IgA. Содержание ЦИК в сыворотке крови у пациента через 1 мес. после внутривенного введения АСК снижается, но уровень нормализуется через 6 мес.

Наибольший интерес вызвали изменения со стороны сердечно-сосудистой системы, выявленные при ультразвуковых исследованиях. Так, у всех обследуемых к 6 мес. уменьшилась масса миокарда. Также при дуплексном сканировании установлено увеличение скорости кровотока нижних конечностей (от 29% до 95%), особенно выражены эти изменения на мелких сосудах. Аналогичные показатели остаются при УЗ исследовании и через год.

Выводы. Таким образом, после внутривенного введения АСК выявляется динамическая перестройка иммунной системы, выражающаяся в изменениях величин показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Наиболее выраженные изменения исследуемых величин показателей иммунного статуса выявляются через 1 мес. после трансплантации АСК. Через 6 мес. — большинство параметров иммунного статуса нормализуется до исходного уровня. У обследуемых пациентов направленность и уровень изменения величин показателей иммунного статуса не совпадает, что определяется исходным состоянием самого иммунитета и, вероятно, разным уровнем реактивности регуляторных гомеостатических систем. Также выявляется изменение величин ряда общеклинических показателей, характеризующих процессы состояния сердечно-сосудистой системы (уменьшение массы миокарда и усиления скорости кровотока).

А.Н. Бронников

Активные фармакологические субстанции пуповинной крови, перспективы и сложности

ООО «АССПАР», Санкт-Петербург, Россия

anbronnikov@mail.ru

A.N. Bronnikov

Active pharmacologic substances of the umbilical cord blood: perspectives and difficulties

Аутогенная трансплантация стволовых клеток пуповинной крови ведет отсчет, как минимум, с 1988 г., когда ребенку, страдавшему анемией Фанкони, была успешно проведена данная операция. С тех пор методика и ее полезность не вызывают сомнений и подтверждены многочисленной практикой, хорошо известной специалистам в этой области. При аутогенной и аллогенной трансплантации обычно используются стволовые клетки, полученные из пуповинной крови. Учение о криоповреждении и криозащите клеточных структур, физиологических процессах, протекающих при замораживании-оттаивании растворов и биологических суспензий, достигли достаточно высокого уровня. Появление промышленного оборудования позволило создавать гемабанки. Стандарты GMP (Гост Р ИСО 52249-2004, Приложение 14,18 и др.) стандартизировали требования по производству и качеству стволовых клеток и активных фармакологических субстанций (АФС). Достижения молекулярной генетики в области рекомбинантных РНК позволили пролить свет на стартовые этапы генетических программ эмбрионального развития. Они оказались одинаковыми для всего живого, как растительного, так и животного мира. Это чем-то напоминает WINDOWS и работающие под ним программы. Все различие — в наборе прикладных программ, определяющих развитие организма по тому или иному виду. Исследования в области вирусологии показали, что в организме животного и растительного мира рекомбинация вириона происходит в виде полимerviруса, который в последующем претерпевает ферментативное расщепление на отдельные субъединицы. Нарушение ферментативного процесса расщепления приводит к образованию субъединиц, получивших клиническое название — онковирус. Стволовые клетки пуповинной крови способны синтезировать АФС, блокирующие эмбриональное развитие, и таким образом прерывать работу abortивных генетических онковиральных программ. Во взрослом организме стволовые клетки сохраняют способность вырабатывать аналогичные АФС, но значительно уступают в этом стволовым клеткам пуповинной крови и имеют возрастную зависимость, высокую чувствительность к свободнорадикальным соединениям. Радиация, загрязнение окружающей среды, переутомление, хронический стресс ухудшают условия. Вирусы гепатита В, С, Е и др. разновидности дают первично-хронические формы, которые в возрасте после 40 лет могут образовывать онковирусы и проявлять себя как: доброкачественные опухоли головного мозга, первичный рак печени, способны вызывать онкопоражение костного мозга. Получение АФС из стволовых клеток пуповинной крови является весьма трудоемкой, дорогостоящей, требующей длительной и упорной работы, но перспективной задачей. К тому же АФС такого рода, по всей вероятности, в связи с тем, что она относится к гормонам, управляющим работой генома, может иметь индивидуальную специфичность, подобную групповой крови или HLA-системе,

что может быть определяющим в активности субстанции. Разработка последнего вопроса находится на начальной стадии. Криогенное сохранение пуповинной крови в гемабанках, несомненно, будет иметь возрастающее значение как для аутогенной трансплантации, получения АФС для донора пуповинной крови, так и с возможностью более широкого применения в онкологии и геронтологии. В заключение можно сказать, что все новое всегда является спорным и при дискуссии рождается истина.

А.С. Брюховецкий, И.С. Брюховецкий

Циторегуляторная терапия глиальных опухолей головного мозга: от клеточной терапии к нейрореставрации и нейрорегуляции мозга

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

neurovita@mail.ru

A.S. Bryukhovetskiy, I.S. Bryukhovetskiy

Cytoregulatory therapy of brain glial tumor: from cell therapy to neurorestoratology and neuroregulation of brain

Введение. В современной нейроонкологии существует три основные стратегии лечения глиальных опухолей головного мозга (ГОГМ): циторедукционная (удаление клеток опухоли), цитостатическая (остановка роста клеток опухоли) и цитотоксическая (отравления клеток опухоли) терапия. Однако эффективность этих подходов при ГОГМ очень низкая. Медиана выживаемости пациентов не превышает 15 мес. В научной литературе показана ингибирующая роль клеточных трансплантатов на развитие ГОГМ. Нами предлагается новая концепция лечения ГОГМ с использованием клеточных технологий — циторегуляторная терапия (ЦРТ). Сущность ЦРТ ГОГМ заключается в том, что основной целью терапии становится не уничтожение или повреждение опухолевых клеток, а биоуправление ими путем индукции в них требуемых системных эффекторных функций (дифференцировки, апоптоза, пролиферации) трансплантированными в организм пациента и (или) мобилизованными в нем, регуляторными мультипотентными (нейральными, гемопоэтическими, мезинхимальными) стволовыми клетками. ЦРТ основана на 4-х ключевых нейробиологических феноменах стволовых (СК) и прогениторных клеток (ПК): 1) эффект клеточной индукции (наведение); 2) эффект «патотропизма» (направленной миграции СК и КП к клеткам опухоли мозга); 3) феномене клеточной адгезии (прилипания) СК и КП к опухолевым клеткам; 4) эффект «рядом стоящего» — дублирование эффекторных функций СК и КП «рядом стоящими» опухолевыми клетками и клетками микроокружения. Результатом ЦРТ должна быть не киста или рубец (исход любой традиционной терапии заболеваний мозга), а реставрация ткани мозга, вовлеченной в неопластический процесс.

Цель работы: представить теоретическое, экспериментальное и технологическое обоснование возможности проведения ЦРТ на модели глиомы C6 у крыс *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы. Для моделирования терапии ГОГМ предложен сценарий инструктивного апоптоза клеток опухоли МСК, индуцированными на апоптоз (иМСК), которые производили из стандартных клеточных культур CD34⁺/CD 45⁻ ГСК человека и культуры

нейральных стволовых клеток человека биофизическим и биохимическим путем. При биофизическом способе получения иМСК клеточные культуры обрабатывали электромагнитным полем КВЧ-диапазона (Гапеев А.Б. с соавт., 2008). Для получения иМСК биохимическим путем использована предобработка МСК индукторами апоптоза (ИА): белками рицином и вискумином. Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* использована перевиваемая культура глиомы С6 крысы. Лечение *in vivo* проведено на 20 взрослых крысах-самцах линии Вистар с экспериментальной глиомой С6 полушария головного мозга (опытная группа). 1-я контрольная группа (А-группа) — 7 животных с глиомой С6 без лечения и 2-я контрольная группа (Б-группа) — 7 крыс с глиомой С6 с трансплантированными в опухоль нативными ГСК и НСК. 3-я контрольная группа — интрацеребральное введение в опухоль рицина (С-группа). ЦРТ проводилась через 7 сут. после стереотаксической имплантации глиомы С6.

Результаты. На модели терапии глиобластомы *in vitro* (совместное культивирование клеток глиомы и культуры иГСК в течении 7 сут.) доказана возможность развития индуктивного апоптоза в клетках опухоли мозга и показана высокая терапевтическая эффективность предложенного клеточного препарата с заданными свойствами: количество клеток глиомы С6 уменьшилось на 52%. Продемонстрирована регуляция и управление ростом клеток глиомы С6 крыс *in vitro*. *In vivo* получились крайне противоречивые результаты: в опытной группе клеточные системы иГСК увеличили рост глиомы С6 почти в 2 раза по сравнению с А-группой, а в Б-группе объем опухоли был меньше на 1/3 по сравнению с группой А, но в С-группе выявлен тотальный некроз мозгового вещества в зоне имплантации рицина и в корковых областях. Представлены иммунохимические и гистологические признаки развития индуктивного апоптоза в клетках опухоли *in vitro* и *in vivo* вызванного иГСК и НСК. Парадоксальный феномен увеличения опухоли мозга после действия иГСК и НСК *in vivo* (феномен «отдачи») объясняется их ранним апоптозом и тем, что клетки не успевают равномерно распределиться по опухоли. Мы не получили достоверных эффектов терапии глиомы С6 от применения иГСК, полученных при использовании электромагнитных полей КВЧ диапазона.

Заключение. ЦРТ в эксперименте показывает возможность терапии ГОГМ. иГСК и НСК *in vitro* позволяют осуществлять внутриклеточное биоуправление и внутритканевую регуляцию опухолевого роста ГОГМ и уменьшить рост глиомы С6 более чем на 50% по сравнению с контролем. *In vivo* требуется изменить режимы ЦРТ и использовать иГСК и НСК с имплантируемыми нанокапсулами (со сроками биодеградации не менее 10 сут.). Технология ЦРТ может быть эффективной при целом ряде неврологических заболеваний.

Г.Р. Бурганова, С.Р. Абдулхаков, А.А. Гумерова, И.М. Газизов, Т.С. Йылмаз, М.А. Титова, А.Х. Одинцова, А.П. Киясов

Оценка экспрессии CD34 в печени больных алкогольным циррозом печени до и после аутотрансплантации стволовых клеток

ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия
guzel.burganova@gmail.com

G.R. Burganova, S.R. Abdulkhakov, A.A. Gumerova, I.M. Gazizov, T.S. Yilmaz, M.A. Titova, A.Kh. Odintcova, A.P. Kiasov

Evaluation of CD34 expression in liver in alcoholic liver cirrhosis after autologous stem cell transplantation

Одним из важнейших механизмов формирования фиброза печени является капилляризация синусоидов, которая отражает прогрессирование фиброза и возможности его обратного развития. CD34 — маркер эндотелиальных и гемопоэтических стволовых клеток — отсутствует в эндотелии синусоидов в нормальной печени и появляется в этих клетках только при капилляризации синусоидов. Одним из новых и перспективных подходов к лечению заболеваний печени является клеточная терапия с использованием аутогенных стволовых клеток (СК).

Целью исследования было оценить экспрессию CD34 в печени больных алкогольным циррозом печени до и через 3 и 12 мес. после аутотрансплантации стволовых клеток.

Материал и методы. Исследования проведены в рамках программы «Развитие клеточной медицины в Республике Татарстан». Биоптаты печени 10 больных циррозом печени (класс А по Чайлд-Пью), полученные до введения в чревной ствол аутогенных СК и через 3 и 12 мес. после процедуры, окрашивали иммуногистохимически с антителами к CD34.

Результаты. До трансплантации СК мы наблюдали выраженную экспрессию CD34 в ткани печени, преимущественно в области портальных трактов и перипортальных инфильтратов. Кроме этого, окрашивались клетки в области порто-портальных и порто-центральных септ, а также единичные клетки в паренхиме печени.

Через 3 мес. после трансплантации число CD34-позитивных клеток резко уменьшилось, но они также в основном локализовались вокруг портальных трактов.

Через 12 мес. мы вновь наблюдали увеличение числа CD34-позитивных клеток, однако, их количество не достигало начального уровня. Количество CD34-позитивных клеток коррелировало с выраженностью воспалительной инфильтрации.

Выводы: полученные нами данные свидетельствуют о том, что трансплантация аутогенных гемопоэтических СК в чревной ствол пациентам с алкогольным циррозом печени является эффективной процедурой: трансплантированные СК способны восстанавливать структуру эндотелия синусоидов, уменьшая выраженность их капилляризации. Однако эта процедура должна быть проведена повторно в течение одного года.

Г.А. Воложин¹, А.А. Докторов², К.С. Десятниченко³,
Г. В. Мкртчян¹

**Тестирование in vitro остеогенных потенций
недифференцированных клеток
парадонтальных тканей**

¹ МГМСУ, Москва, Россия

² НИЦ БМТ ГНУ ВИЛАР, Москва, Россия

³ НПО «ПОЛИСТОМ», Москва, Россия

G.A. Volozhin, A.A. Doktorov, K.S. Desyatnichenko,
G.V. Mkrtchyan

**Testing of osteogenic capacity of undifferentiated cells
of periodontal tissues in vitro**

В стоматологии и челюстно-лицевой хирургии для возмещения костных дефектов все большее распространение находят технологии с использованием полученных от взрослых людей прогениторных клеток различной степени зрелости (M. Spector, 1999; P. Bianco, P. Robey, 2000). Ранее мы сообщали о возможности пролиферации in vitro клеток-предшественников остеогенеза из биоптатов губчатой кости (БГК), оболочки Гертвига (ОГ) и надкостницы альвеолярного отростка (НК), получаемых при санации ротовой полости (Воложин Г.А. с соавт., 2010). Известно, что предварительная дифференцировка ММСК в остеогенном направлении повышает эффективность клеточно-инженерной конструкции при имплантации в костный дефект (Р.В. Деев с соавт., 2008). В настоящем сообщении приводятся результаты, показывающие возможность остеогенной дифференцировки 3 типов клеток пародонта.

Материал для цитологических исследований был получен от 25 пациентов в возрасте от 17 лет до 61 года: БГК — 12, НК — 10, ОГ — 3. Образцы тканей с соблюдением асептики переносили в пробирки с кондиционной средой, и проводили 4 пассажа культивирования по стандартной методике, после чего подвергали криоконсервации. За сутки до нее заменяли культуральную среду, с помощью 0,25% раствора трипсина клетки снимали с подложки и переводили в ростовую среду с повышенным содержанием (40%) эмбриональной сыворотки коров. Полученную суспензию охлаждали до +4°C. Затем при тщательном перемешивании в нее добавляли диметилсульфоксид, для замораживания клеток до 10% общего объема. Полученную суспензию, содержащую примерно 1 млн клеток в мл, разливали по 1 мл в пробирки для криоконсервирования. Пробирки запаковывали в пенопластовые пеналы и на сутки помещали в кельвинатор с температурой -70°C. После этого пробирки переносили в специализированный сосуд Дюара с жидким азотом.

Клетки из тканей всех 3 типов исследовали на способность к колониеобразованию — доля колоний, содержащих более 16 клеток, при культивировании 100 клеток 4-го пассажа. Суммарное количество колоний, содержащих более 16 клеток, выраженное в процентах, мы называли эффективностью клонирования. Данный анализ, помимо эффективности клонирования, позволяет определить средний и максимальный размер колоний. Способность культивированных клеток к индукции остеогенной дифференцировки определяли после инкубирования в кондиционной среде без ФРФ₀, содержащей 50 мкМ аскорбат-2-фосфата, 10 мМ β-глицерофосфата и 0,1 мкМ дексаметазона с измерением размеров костных узелков. Оценку активности щелочной фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.3.1) проводили по методу McGadey (1970), а способность экспресси-

рованного матрикса к минерализации — выявлением кальция ализариновым красным.

Сравнительный анализ всех культур ММСК, полученных из материала БГК, НК и ОГ, проводили с помощью визуального ранжирования по степени выраженности изучаемых признаков: способности образовывать минерализованный матрикс и активности ЩФ. Достоверность различий между группами сравнения определяли с помощью непараметрических критериев, составляя общие упорядоченные ряды.

Анализ полученных результатов показал, что в культурах клеток от всех пациентов после индукции остеогенной дифференцировки отчетливо выявлялись как костеобразующая активность ММСК, так и активность щелочной фосфатазы. При этом клетки, полученные из БГК, ОГ и НК имели сходные свойства. В то же время, можно отметить, что культуры ММСК, полученные из ОГ, всегда давали более интенсивную окраску ализариновым красным, формировали наиболее крупные костные узелки и чаще окрашивались на щелочную фосфатазу. Статистический анализ материала с помощью составления общих упорядоченных рядов подтвердил превышение костеобразующих свойств клеток ОГ над БГК ($p_0 = 0,05$) и активности щелочной фосфатазы в культурах клеток ОГ по сравнению с культурами из НК ($p_0 = 0,05$). Однако, не найдено различий в костеобразующих свойствах между ММСК из ОГ и НК ($p_0 > 0,05$), так же, как и в активности ЩФ между МСК из ОГ и БГК ($p_0 > 0,05$). Учитывая небольшое количество наблюдений в группе ОГ ($n = 3$), такой результат можно рассматривать лишь как тенденцию к более высокой способности к костеобразованию у клеток из ОГ, по сравнению с БГК и НК. Сравнение активности костеобразования и окраски на ЩФ между группами культур БГК и НК с использованием непараметрического U-критерия не обнаружило достоверных отличий ($p_0 > 0,05$).

Таким образом, проведенное исследование показало, что в культурах ММСК из БГК, НК и ОГ после индукции остеогенной дифференцировки во всех случаях отчетливо прослеживались признаки костеобразования, заключающиеся в формировании минерализованного костного эквивалента. Их выраженность тесно коррелировала с активностью ЩФ, но не зависела от эффективности колониеобразования клеток.

Полученные данные доказывают возможность использования взятых при санации ротовой полости биоптатов губчатой кости, надкостницы и оболочки Гертвига для выделения, криоконсервации и размножения in vitro ММСК с сохранением их остеогенного потенциала. В дальнейшем эти клетки могут быть использованы для усиления остеоинтегративных свойств ткане-инженерных конструкций, применяющихся в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. В настоящее время ясно, что использование для этих целей размноженных in vitro ММСК предпочтительнее, чем применение препаратов диспергированного костного мозга, поскольку вызывает более быстрый и равномерно протекающий процесс костеобразования (J.E. Dennis, 1992). Существенным достоинством предложенных способов получения тканевых образцов является отсутствие для этих целей необходимости в проведении дополнительной хирургической процедуры, что позволяет отнести эту методику к категории малоинвазивных.

С.Е. Волчков¹, О.В. Тюмина¹, Л.Т. Волова²

Определение оптимального источника ММСК для создания банка клеток

¹ ГУЗСО «Клинический центр клеточных технологий»

Самара, Россия

quality@cordbank.ru

² ГОУ ВПО «Самарский государственный

медицинский университет Федерального

агентства по здравоохранению и социальному развитию»,

Самара, Россия

S.E. Volchkov, O.V. Tyumina, T.L. Volova

Defining of the optimal source of hMMSK to create a cell bank

Цель — определить оптимальный источник мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) с позиции доступности и этичности получения биологического материала, биологических свойств полученных клеток, с целью создания депозита клеточного материала.

Материал и методы. Было обработано 26 образцов пуповинной крови (ПК), 15 образцов костного мозга (КМ) и 15 образцов липоасpirата (ЛА). Проводили оценку пролиферативного потенциала с помощью автоматического анализатора клеток Vi-Cell XR фирмы Beckman Coulter (США), дифференцировку в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях с применением коммерческих сред фирмы Miltenyi Biotec (Германия), цитологическое исследование, морфометрию и кластерный анализ проводили на микроскопе Axio Observer A1 фирмы Carl Zeiss (Германия), иммунофенотип оценивали на проточном цитометре FACS Canto фирмы Becton Dickinson (США); концентрацию цитокинов измеряли на проточном флюориметре Lab Scan X100 фирмы Luminex (США), наборами 27 plex assay фирмы BioRad (США). Исследование адгезивной способности клеток к различным имплантатам (лиофилизированная кость, металлорезина) проводили методом совместного культивирования с оценкой на сканирующем электронном микроскопе Quanta Inspect S фирмы FEI (Япония).

Результаты. Частота колониеобразования клеток из костного мозга составила 100%, доля колониеобразующих единиц среди мононуклеаров составила 0,0005%, максимальное количество удвоений культуры 31 удвоение, липоасpirата 100% и 0,25% и 27 удвоений, пуповинной крови 15,33% и 0,000059% и 60 удвоений соответственно. Скорость удвоения клеточной культуры составила 0,0376 уд/час для КМ, 0,0466 для ПК и 0,0262 для ЛА соответственно. Клетки всех источников были позитивны на CD44, CD73, CD90, CD105 и негативны на CD14, CD34, CD38, CD45, HLA-DR. Дифференцировка в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении, была позитивной у всех источников. Адипогенная дифференцировка клеток пуповинной крови была зарегистрирована только к 30 сут. против 21 у других источников. Морфологическое исследование и кластерный анализ показали схожесть клеток из разных источников. Клетки всех источников делились на три группы по размерам, «незрелые» — небольшие клетки с правильной веретенообразной формой, клетки имели площадь от 1000 до 8000 мкм²; «взрослые» — средние клетки, фибробластоподобная форма, некоторые клетки имеют отростки, площадь от 8000 до 20 000 мкм²; «гигантские» — крупные клетки, часто с неправильной, кубовидной формы, с множеством отростков, площадь таких клеток

от 20000 до 40000 мкм² и выше. Концентрация цитокинов G-CSF, GM-CSF, IL-4, RANTES, TNF α , достоверно ($p < 0,05$) менялась в течение культивирования во всех исследуемых группах в сторону увеличения концентрации, в то время, как FGF basic, IL-15, IL-17, IL-1 α , IL-6, IL-8, MCP-1 (MCAF), VEGF, Eotaxin, γ IFN, IP-10, оставались без изменений ($p > 0,05$). При совместном культивировании клеток и имплантатов было зафиксировано полное прорастание исследуемых имплантатов клетками из всех трех источников, что подтвердилось данными как световой, так и электронной микроскопии.

На основании анализа полученных результатов, мы определили, что клетки из костного мозга, пуповинной крови и липоасpirата имеют схожие биологические характеристики и могут быть отнесены к группе мультипотентных мезенхимальных клеток. Данные лабораторных исследований, этической оценки и особенностей получения материала позволили выявить, что для быстрого и безопасного получения большого количества ММСК, необходимого для создания банка клеток, оптимальным источником является липоасpirат.

Т.Т. Глазко

Эпигенетическая и мутационная изменчивость эмбриональных стволовых клеток

Российский государственный аграрный университет —

МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

vglazko@yahoo.com

T.T. Glazko

Epigenetic and mutation variability of embryonic stem cells

Одна из проблем в разработках методов исследования и применения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) заключается в нестабильности их генетического аппарата, и, соответственно, генетической гетерогенности их популяций. Разнообразие механизмов, лежащих в основе такой нестабильности, их классификация и особенности мутационных спектров в разных линиях ЭСК до сих пор остаются недостаточно исследованными. В этой связи в настоящей работе выполнен сравнительный анализ мутационных спектров и характеристик эпигенетической изменчивости 8 сублиний линии ЭСК R1, полученной из эмбриона лабораторной линии мышей 129/Sv Наги и др. (Nagy et al., 1993), предоставленных для исследований к.б.н. Л.М. Межевикиной (Институт биофизики клетки РАН, Пущино) и эмбриональных герминативных (ЭГ) клеточных популяций на 15-м и 75-м пассажах клеточной линии G1, полученной из полового бугорка 12,5 дневного эмбриона мыши линии BALB/c, а также 14, 26 и 40 пассажах сублинии OA, выделенной из линии G1 на 35-том пассаже путем высевки клеток на среду, обедненную сывороточными факторами (предоставлено для исследований д.б.н. Л.Л. Лукаш, Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ, Киев, Украина).

Препараты клеток получали стандартным путем, высушивали и окрашивали красителем Гимза («Merck», Германия). Индивидуальное типирование хромосом проводили в соответствии с данными J.K. Cowell. В анализ включены следующие характеристики: анеуплоидия, полиплоидия, частота встречаемости метафаз с хромосомными aberrациями, с межхромосомными ассоциациями по типу Робертсоновских транслокаций (РБ) и с опережающим расщеплением центромерных

районов (ОР). Количество метафаз, двуядерных лейкоцитов, лейкоцитов с микроядрами, апоптозных клеток оценивали на тех же препаратах в клетках с сохраненной цитоплазмой в промилле (‰).

Рассмотрены частоты встречаемости различных цитогенетических аномалий в 8 клеточных популяциях исходной линии R1, отличающихся количеством пассажей после размораживания. Количество хромосом в клетках было относительно стабильным и колебалось от 37 до 42, однако популяции клеток широко варьировали по составу РБ. Во всех исследованных популяциях обнаруживался избыток копий хромосомы 8. Для около половины метафаз характерно присутствие спонтанного дифференциального окрашивания хромосом, без предварительной обработки трипсином (G-бендинг). Частота встречаемости таких клеток уменьшалась с увеличением количества пассажей. Обнаружены выраженные отличия между клеточными популяциями по частотам встречаемости метафаз с ОР, что, по литературным данным, является маркерной особенностью герминативной популяции эмбриональных клеток (Bernardino-Sgherri et al., 2002). В таких метафазах наблюдались сложные межхромосомные перестройки по центромерным районам. В общем, для группы сублиний ЭСК R1, при околодиплоидном числе хромосом, типичны выраженная гетерогенность по различным типам цитогенетических аномалий и РБ, темпам клеточного деления, а также по таким эпигенетическим характеристикам, как склонность к образованию эмбрионидных тел, спонтанному G-бендингу и частотам встречаемости клеток с ОР.

Популяции клеток разных пассажей ЭГ G1 отличались друг от друга по числу хромосом, близкому к тетра- пента- и гексаплоидным наборам, с относительным увеличением количества диплоидных клеток к 75 пассажу. Выявлены конфигурации метафаз, свидетельствующие о многополюсных митозах и межклеточных слияниях. Наблюдается выраженная гетерогенность клеток по различным вариантам РБ, относительный дефицит копий хромосом 6, 7 и 12 и избыток — хромосомы 11. Во всех исследованных клеточных популяциях присутствовала транслокация t(6;12). Обнаружен новый тип хромосомных аберраций, обусловленный хромосомными разрывами в проксимальных участках. В популяциях клеток ЭГ G1, так же, как и в сублиниях ЭСК R1, выявлена выраженная гетерогенность по эпигенетическим характеристикам: метафазам со спонтанным G-бендингом, частота которых убывает с увеличением времени культивирования клеток, а также клеток с деспирализацией перичентромерных районов хромосом и ОР.

Для 8 групп клеток ЭСК R1 линейноспецифичным была выраженная избыточность количества копий хромосомы 8 при сохранении околодиплоидного набора, для 5 групп — выявление специфики клеток ЭГ G1 — полиплоидизация с формированием множественных межхромосомных транслокаций при постоянном присутствии t(6; 12). Транслокация t(6; 12) объединяет три ключевых гена (Nanog, Tcl1, Esrrb) из пяти имеющихся (Esrrb, Tbx3 и Tcl1, Nanog, Oct4 и Sox2), блокирующих клеточную дифференцировку и способствующих самокопированию клеток. Хромосомы 8 и 11 несут ключевые гены пути JAK-STAT, контролирующего активацию пролиферации.

Полученные данные свидетельствуют о наличии линейноспецифичных механизмов генерации генетической изменчивости, необходимой для адаптации

клеток к росту в культуральных условиях в недифференцированном состоянии. В то же время, конечный итог такой адаптации приводит к изменению хромосомного баланса в сторону увеличения копийности хромосом, несущих гены активации клеточной пролиферации. Это соответствует селективным условиям культивирования клеток, направленным на поддержание высоких темпов клеточного деления, препятствующих клеточной дифференцировке. В случае ЭСК R1 генерация генетической изменчивости клонов, из которых отбираются наиболее успешно пролиферирующие, включает нарушение распределения хромосом по дочерним клеткам, по-видимому, с участием повышенной частоты формирования РБ, для клеток ЭГ G1 — полиплоидизацию, повышение частоты хромосомных разрывов и обменов. При сходном направлении эволюции клонального состава в сторону поддержания пролиферации, ее механизмы имеют выраженную линейную специфику.

А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко,
Л.В. Останкова, И.Ю. Мацевитая, М.В. Останков,
М.А. Сироус, Е.А. Порожан, К.А. Гольцев,
А.Ю. Димитров

**Проявление иммунокорригирующего эффекта
криоконсервированных клеток фетальной
печени разных сроков гестации в условиях
развития экспериментальной модели реакции
«трансплантат против хозяина»***

*Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков, Украина*

A.N. Goltsev, T.G. Dubrava, E.D. Lutsenko, L.V. Ostankova,
I.Yu. Matsevitaya, M.V. Ostankov, M.A. Sirous, E.A. Porozhan,
K.A. Goltsev, A.Yu. Dimitrov

**Manifestation of immune correcting effect of
cryopreserved cells of fetal liver of different gestation
terms under development conditions of experimental
model of graft versus host reaction**

В работе проведена сравнительная оценка иммунокорригирующей активности криоконсервированных и нативных клеток фетальной печени (КФП) разных сроков гестации в экспериментальной модели локальной РТПХ (лРТПХ). Индукцию лРТПХ проводили на мышах линии C57Bl/6 путем подкожного введения в подушечку задней лапы клеток лимфоузлов (ЛУ) линии CBA/H. Через 1 сут. после инициации лРТПХ мышам внутривенно вводили нативные (нКФП) или криоконсервированные (кКФП) КФП 14-х или 18-х сут. гестации мышей линии CBA. На 5-е сут. после инициации патологии оценивали следующие показатели: индекс РТПХ, содержание Treg (FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺клеток) лимфоузлов (ЛУ) на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA), экспрессию гена *tgf-β* — методом ПЦР; содержание ИЛ-2, ИЛ-10, ФНО-α в сыворотке крови животных — иммуноферментным методом на анализаторе Stat Fax 2100 (USA). Установлено, что при индукции лРТПХ манифестируются признаки характерные для патологий аутоиммунного генеза. В условиях развития лРТПХ, КФП минимизируют клинические признаки патологии и интенсивность развития иммуновоспалительной реакции. Терапевтическая активность КФП в большей степени коррелировала с содержанием в ЛУ FOXP3⁺ клеток и экспрессией гена

* Статья опубликована полностью в рубрике «Оригинальные исследования».

tgf-β, но не содержанием CD4⁺CD25⁺ клеток и степенью их флуоресценции. По мере увеличения срока гестации с 14 пкд к 18 пкд иммуннокорригирующая активность КФП снижалась. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммуннокорригирующую активность нКФП-14.

А.С. Григорьян¹, Е.В. Киселёва², Д.В. Штанский³, М.Р. Филонов³, Т.К. Хамраев¹, А.К. Топоркова¹, А.Б. Гастиев⁴, Ш. Фаркашди⁵

Новый тип тканеинженерной конструкции на основе политетрафторэтилена с наноструктурированным многофункциональным биосовместимым нерезорбируемым покрытием*

¹ ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Росмедтехнологий», Москва, Россия

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

³ Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Государственный технологический университет «Московский институт стали и сплавов», Москва, Россия

⁴ Российская медицинская академия последилового образования, Москва, Россия

⁵ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

A.S. Grigoryan, E.V. Kiseleva, M.P. Filonov, T.K. Khamraev, A.K. Toporkova, A.B. Gastiev, Sh. Farkashdi

A novel type of a polytetrafluorethylene-based tissue-engineered construction with nanopatterned multifunctional biocompatible nonresorbed coating

Описана методика получения тканеинженерной конструкции на основе высокопористого политетрафторэтилена (ПТФЭ) с наноструктурированным многофункциональным биосовместимым нерезорбируемым покрытием (МБНП) состава Ti-Ca-P-C-O-N. Показано, что на подложке из ПТФЭ с МБНП происходит активная адгезия и пролиферация стромальных мультипотентных клеток жировой ткани. В условиях остеогенной стимуляции происходит интенсивное коммитирование клеток, позволяющее получить популяцию преостео-бластически дифференцированных элементов, что было подтверждено положительной иммуногистохимической реакцией на остеопонтин и остеонектин. В опытах *in vivo* на модели экспериментально воспроизведенных критических дефектов свода черепа у кроликов проведена оценка влияния трансплантации тканеинженерных конструкций на основе высокопористого ПТФЭ с МБНП состава Ti-Ca-P-C-O-N, на поверхности которых культивированы аутогенные стромальные клетки из жировой ткани на формирование костного регенерата. Через 3 и 6 мес. после трансплантации под тканеинженерной конструкцией показано формирование костного регенерата, полностью закрывавшего дефект.

В.И. Грищенко¹, И.А. Криворучко², К.А. Гольцев¹, О.Ю. Кожина¹, А.Н. Гольцев¹

Экспериментальное обоснование применения пуповинной крови для лечения послеоперационных осложнений

¹ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

² Харьковский государственный медицинский университет, Харьков, Украина
cryopato@rambler.ru

V.I. Grischenko, I.A. Kryvoruchko, K.A. Goltsev, O.U. Kozhina, A.N. Goltsev

Experimental substantiation of cord blood application for treatment of post-operative complications

Как свидетельствуют данные литературы, послеоперационные гнойные осложнения являются результатом стресс-индуцированного угнетения функции иммунной системы (ИС) организма. При этом речь может идти не только об осложнениях как следствие экспансии инфекционных начал, но также в результате минимизации трофического потенциала клеток ИС и разбалансировки взаимодействия в нейро-иммуно-эндокринном блоке. В связи с этим очевидна необходимость поиска препаратов, обладающих полифункциональным лечебным эффектом в таких ситуациях.

Цель работы: оценить состояние ИС и частоту развития послеоперационных осложнений у крыс с острым гнойным перитонитом (ОГП) после лечения препаратом пуповинной крови «Гемокорд».

Материал и методы. Эксперименты проведены на крысах линии Вистар в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в научных целях» (Страсбург, 1985). Крысы были распределены на 4 группы: 1 – крысам проводили лапаротомию и релапаротомию; 2 – моделировали ОГП без терапии; 3 – крысам с ОГП вводили антибиотик во время операции; 4 (основная) – крысам с ОГП вводили «Гемокорд», который был получен и производится в ИПКиК НАН Украины. В работе использовали иммунологические, цитоморфологические и биохимические методы исследования. Оценку всех показателей проводили на 1, 3, 5 и 7 сут. после операции.

Результаты и обсуждение. Во всех группах оперированных крыс наблюдали отклонения показателей клеточного (КЗИ) и гуморального (ГЗИ) звена ИС. В первую очередь это касалось общих Т-клеток (CD3⁺) и Т-регуляторных (CD4⁺/CD25⁺) клеток, перитонеальных Mac-1⁺ мононуклеаров и содержания циклических иммунных комплексов (ЦИК). Все животные с ОГП без лечения (2 группа) погибли к 3 сут. на фоне выраженного дисбаланса ИС. У крыс 3 группы прослеживалась четкая тенденция к улучшению показателей КЗИ и ГЗИ. Однако у крыс, которым вводили «Гемокорд», эта динамика была более выражена, а показатели были значительно ближе к интактному контролю. Важно отметить, что все показатели ИС на 7 сут. в 4 группе в наибольшей степени улучшились в сравнении с животными других групп, что коррелировало с показателями их выживаемости.

* Статья опубликована полностью в рубрике «Оригинальные исследования».

А.А. Гумерова, А.К. Шафигуллина, С.Р. Абдулхаков,
И.М. Газизов, М.С. Калигин, Д.И. Андреева,
М.А. Титова, Г.Р. Бурганова, А.А. Трондин,
А.Р. Шайхутдинова, А.П. Киясов

**Перспективы использования различных
популяций стволовых/прогениторных клеток
в клеточной терапии заболеваний печени**

ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский
университет», Казань, Россия
anissagum@mail.ru

A.A. Gumerova, A.K. Shafigullina, S.R. Abdulkhakov,
I.M. Gazizov, M.S. Kaligin, D.I. Andreeva, M.A. Titova,
G.R. Burganova, A.A. Trondin, A.R. Shaichutdinova,
A.A. Kiasov

**Perspectives of different populations
of stem/progenitor cells in stem cell therapy
of liver diseases**

В настоящее время проводится множество исследований, посвященных поиску региональной стволовой клетки печени, изучению возможностей дифференцировки в гепатоциты стволовых/прогениторных клеток различной природы и анализу перспектив их дальнейшего использования в терапии хронических заболеваний печени. Целью комплекса наших экспериментальных и клинических исследований было оценить перспективы применения различных популяций стволовых/прогениторных клеток для лечения хронических гепатитов.

Материал и методы. Аутотрансплантация мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) периферической крови проведена 12 больным хроническим алкогольным гепатитом с исходом в тяжелый фиброз/цирроз печени. Биопсия печени проведена больным до трансплантации и через 1, 3 и 12 мес. после трансплантации. В условиях *in vitro* проведено изучение способности ГСК человека, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга крысы и звёздчатых клеток печени (ЗКП) крысы дифференцироваться в гепатоциты в различных условиях (влияние растворимых и контактных факторов со стороны ЗКП, добавление факторов роста). В экспериментах на белых лабораторных крысах изучена активация стволового компартмента печени после частичной гепатэктомии, а также хоуминг и пути дифференцировки нативных и генетически модифицированных ГСК пуповинной крови человека, трансплантированных крысам, перенесшим частичную гепатэктомию. Изучение фенотипов клеток во всех случаях проведено иммуногистохимическими методами.

Результаты клинических испытаний аутотрансплантации ГСК, мобилизованных из периферической крови, больным алкогольным гепатитом с исходом в тяжелый фиброз/цирроз печени показали её безопасность и эффективность. Через 1–3 мес. после однократной инъекции ГСК у больных улучшались клинические, биохимические и морфологические показатели (снижение индекса гистологической активности на 1–2 пункта у всех больных). Иммуногистохимическое исследование позволило установить снижение активности миофибробластов, восстановление фенотипа эндотелиальных клеток синусоидов печени и уменьшение их капилляризации, снижение напряженности регенераторного процесса (сокращение числа пролиферирующих клеток) и риска опухолевой трансформации (уменьшение числа клеток, экспрессирующих Bcl-2). Однако эффект от лечения сохранялся не более 12 мес.

Результаты экспериментов по культивированию ГСК пуповинной крови человека, ММСК и ЗКП крысы показали, что ГСК сохраняют жизнеспособность только при сокультивировании с ЗКП, но не дифференцируются в гепатоциты ни под воздействием паракринных и контактных влияний со стороны последних, ни под влиянием добавленных в культуральную среду факторов роста. Однако ГСК пуповинной крови человека (как нативные, так и генетически модифицированные) после трансплантации крысам, перенёвшим операцию частичной гепатэктомии, мигрировали в печень и дифференцировались в гепатоциты, холангиоциты и синусоидные клетки печени. Другие же популяции клеток — ММСК и ЗКП — продемонстрировали, в отличие от ГСК, способность к гепатоцитарной дифференцировке уже в условиях *in vitro*. ММСК начинали экспрессировать гепатоцитарные маркеры (цитokerатин 18, α -фетопротеин, специфический антиген гепатоцитов) спонтанно, но при добавлении среды, переработанной ЗКП, этот процесс происходил быстрее и был более выраженным. ЗКП после образования монослоя также начинали экспрессировать гепатоцитарные маркеры. Культивирование ММСК и ЗКП с факторами роста ускоряло их дифференцировку в гепатоциты.

Изучение активации стволового компартмента в печени после частичной гепатэктомии показало наиболее выраженные свойства стволовых/прогениторных клеток (экспрессию маркера стволовых клеток C-kit) у ЗКП и гепатоцитов. Аналогичные результаты были получены нами ранее при изучении онтогенеза человека и крысы.

Выводы: поскольку в условиях *in vivo* ЗКП проявляют признаки стволовых/прогениторных клеток в онтогенезе и при регенерации, в условиях *in vitro* ММСК и ЗКП демонстрируют значительно более выраженные, по сравнению с ГСК, потенции к гепатоцитарной дифференцировке, а терапевтический эффект от ауто-трансплантации ГСК больным хроническим алкогольным гепатитом не является длительным, мы считаем более перспективными для разработки методов клеточной терапии заболеваний печени ЗКП и ММСК.

Р.В. Деев^{1,2}, И.Я. Бозо³, Н.В. Цупкина⁴,
И.В. Честков⁵, М.С. Калигин⁶, Г.П. Пинаев⁴

**Судьба пересаженных в костную рану
мультипотентных мезенхимальных
стромальных клеток**

¹ ОАО «Институт стволовых клеток человека»,
Москва, Россия

² ФГУ «Российский НИИ травматологии и ортопедии
им. Р.Р. Вредена Росмедтехнологий»,
Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова,
Санкт-Петербург, Россия

⁴ УРАН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия

⁵ УРАН «НИИ общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова»,
Москва, Россия

⁶ ГОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет», Россия
romdey@gmail.com

R.V. Deev, I.Ya. Bozo, N.V. Tsupkina, I.V. Thestkov,
M.S. Kaligin, G.P. Pinaev

**Differentiations of transplanted in bone defect
multipotent mesenchymal stromal cells**

Многочисленными исследованиями показан дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Подтверждающие это данные были получены в экспериментах

как *in vitro*, так и *in vivo* — в диффузионных камерах, то есть в условиях, лишенных всего многообразия факторов микроокружения в тканях и тем более — в костной ране (про- и противовоспалительные цитокины и др.). Ранее нами было показано, что в случае пересадки в дефект длинной трубчатой кости культивированных на остеоиндуктивном носителе ММСК, последние в первые недели локализуются прежде всего в реактивно измененной соединительной ткани межбалочных пространств в области формирования костного регенерата (Р.В. Деев и др., 2008), что дало основания считать одним из основных факторов воздействия на репаративный процесс индукционные влияния со стороны пересаженных клеток. Вместе с тем, требуется более детальное исследование непосредственной дифференцировки пересаженных ММСК в костной ране и их продуктивного участия в регенерационном гистогенезе.

Цель исследования — выявить пересаженные ММСК и их дифференцировочную судьбу в составе костного регенерата через 30 и 60 сут. после пересадки.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на кроликах. ММСК получали из костного мозга по известной методике. После 3 нед. культивирования клетки подвергали трансфекции лентивирусной конструкцией GPur, кодирующей GFP под CMV промотером. Еще через 4 сут. культивирования, визуально констатировали результативность трансфекции. В дальнейшем по оригинальной запатентованной методике совмещали меченые клетки с деминерализованным костным матриксом из расчета 10 млн клеток на 1 см³ материала. Всем животным осуществляли резекцию 2 см средней трети диафиза большеберцовой кости, выполняли интрамедуллярную фиксацию с монтажом импровизированного дистрактора для предотвращения самостоятельного смещения костных опилов. Полученный таким образом танеинженерный эквивалент кости помещали в диастаз, рану ушивали послойно. Животных выводили из эксперимента через 30 и 60 сут. выпиливали костные фрагменты из области дефекта, фиксировали, осуществляли рутинную бескислотную декальцинацию, изготавливали гистологические препараты по общепринятой методике. Срезы исследовали в люминесцентном микроскопе. Для более достоверного выявления пересаженных клеток ставили иммуногистохимическую реакцию с антителами к GFP (Abcam, Великобритания).

Результаты. Установлено, что пересаженные клетки сохраняли жизнеспособность через 30–60 сут. Они интегрировались в состав мультитканевого костного регенерата и претерпевали дивергентную дифференцировку на месте в трех ортодоксальных направлениях. Получены данные, свидетельствующие о фибро-, хондро- и остеогенной дифференцировке пересаженных в составе танеинженерного эквивалента ММСК. Следует отметить, что значительная их часть локализовалась в периваскулярных тканевых нишах.

Таким образом, клеточная культура не только индуцирует восстановительный процесс в костной ране, но и продуктивно участвует в строительстве регенерата.

Р.В. Деев¹, С.Л. Киселев², А.А. Исаев¹,
А.В. Приходько¹, И.В. Потапов¹, С.В. Грязнов³,
Р.Е. Калинин³, П.Г. Швальб³

Опыт создания и применения (1–2 фаза клинических испытаний) препарата на основе гена VEGF

¹ ОАО «Институт стволовых клеток человека»,
Москва, Россия

² УРАН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН»,
Москва, Россия

³ ГОУ ВПО Рязанский государственный медицинский
университет, Рязань, Россия

R.V. Deev, S.L. Kiselev, A.A. Isaev, A.V. Prichodko, I.V. Potapov,
S.V. Griashnov, R.E. Kalinin, G.G. Schvalb

Experience of creating and applying (1–2 phase of clinical trials) of the drug on the basis of VEGF gene

В соответствии с действующим законодательством и на основании официально выполненных доклинических исследований проведена I-IIa фаза клинических исследований на базе трех лечебных учреждений. В простое открытое рандомизированное многоцентровое исследование было включено 45 пациентов, 10 из которых составили группу сравнения. Исследование проведено в строгом соответствии с национальными правилами этики и достоверности клинических исследований. Назначение исследуемого препарата производилось на фоне стандартной терапии в соответствии с протоколами ведения больных, используемыми в клинике, участвующей в исследовании. Пациенты группы испытуемых получали генотерапевтический препарат на основе высокоочищенной сверхсжатой формы плазмиды pCMV-VEGF165, кодирующей эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF). Производитель: ОАО «Институт Стволовых Клеток Человека» (Москва, Россия).

Цель исследования: определить безопасность и переносимость введения препарата у пациентов с ишемией нижних конечностей (IIa-III стадии по А.В. Покровскому — Фонтейну).

Препарат вводили внутримышечно дважды, в дозе 1,2 мг с интервалом в 7 или 14 сут.

Активный период наблюдения составил 30 сут. Общее наблюдение за пациентами осуществлялось в течение 3 мес. В ходе наблюдения оценивали: жалобы, жизненно-важные функции, дистанцию безболевого ходьбы, общий и биохимический анализы крови, мочи, коагулограмму, результаты ультразвукового дуплексного сканирования сосудов нижних конечностей, лодыжечно-плечевой индекс, транскутанное напряжение кислорода (TcPO₂).

Установлено, что препарат безопасен для пациентов, имеет хорошую переносимость, не оказывает значимого влияния на общеклинические, биохимические показатели, а также показатели гемостаза. Результаты обработаны статистически (p≤0,05). У пациентов группы испытуемых в сравнении с исходным уровнем статистически достоверно увеличивались лодыжечно-плечевой индекс (на 18,8–22,9%), уровень TcPO₂ (на 15,4–17,8%), безболезненно проходимое расстояние (на 260,8–290,3%).

Полученные результаты позволяют реализовывать следующую фазу клинических испытаний с участием больших групп пациентов.

К.С. Десятниченко ¹, И.И. Селезнева ²,
С.Г. Курдюмов ¹

Влияние композиции костных неколлагеновых белков на остеогенную дифференцировку фибробластов эмбрионов мышей

¹ НПО «ПОЛИСТОМ», Москва, Россия

² ИТЭБФ, Пущино, Россия

K.S. Desyatnichenko, I.I. Selezneva, S.G. Kurdyumov.

Influence of the composition of bone noncollagenous proteins at osteogenous differentiation of fibroblasts embryos mice

Известно, что зрелая компактная костная ткань в качестве минорной фракции содержит композицию водорастворимых белков неколлагеновой природы (НБК), имеющих электрофоретическую подвижность в области б1 и б2 глобулинов, аффинных к коллагену и ортофосфатам кальция, дозозависимо влияющих на пролиферацию и дифференцировку клеток мезенхимального происхождения (К.С. Десятниченко с соавт., 1982-2000). Перечисленные свойства были использованы при создании серии остеопластических материалов (патент РФ № 2317088), прошедшей все регламентные испытания и разрешенной к клиническому применению. Необходимость дальнейшего совершенствования медицинских изделий, предназначенных для регенерации костной ткани в ортопедии, стоматологии, челюстно-лицевой хирургии и пр., побудило нас исследовать влияние композиции НБК на остеогенную дифференцировку культивируемых *in vitro* фибробластов эмбрионов мыши.

Для испытания выбран раствор НБК крупного рогатого скота, приготовленных, как ранее было описано (V. Shevcov, K. Desyatnichenko, 1997), осветленный и стерилизованный ультрафильтрацией последовательно через фильтры 0,44 и 0,22 мкм (Millipore, США) с исходной концентрацией 475 мг/л в деионизированной воде.

Исследование проводили с использованием первичной культуры фибробластов мыши, полученных из кожно-мышечной ткани 13 дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6-Tg(ACtEGFP)10sb/J. Трансгенные мыши с геном-репортером, кодирующим синтез улучшенного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) под контролем промотора в-актина цыпленка, были получены из Jackson Laboratory (США) с любезного разрешения А.В. Червонского. Клетки культивировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров (ЭТС) и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина.

Культура клеток на 5 пассаже была использована для тестирования материалов в различных вариантах дополнительных добавок.

1. Среда 1 — без дополнительных добавок (контроль).

2. Среда 2 — с добавкой 0,25 мМ аскорбиновой кислоты, 10 мМ β-глицерофосфата и 0,1 мкМ дексаметазона (стандартная среда, стимулирующая остеогенную дифференцировку).

3. Среда 3 — 0,1 мкМ дексаметазона, 20 нг/мл фактора роста фибробластов основного (bFGF).

4. Среда 4 — 0,1 мкМ дексаметазона и 47,5 нг/мл НБК (разведение в 100 раз).

5. Среда 5 — 0,1 мкМ дексаметазона и 4,75 мкг/мл НБК (разведение в 1000 раз).

6. Среда 6 — 0,1 мкМ дексаметазона и 0,475 мкг/мл НБК (разведение в 10 000 раз).

Клетки высевали на поверхности образцов с плотностью 15 тыс./см² и культивировали в течение 20 сут., при этом объем среды составил 0,5 мл/лунку. Смену среды производили каждые 3–4 сут. После окончания культивирования клетки были промыты фосфатным буфером (рН = 7,4) и зафиксированы в течение 20 мин. в 3,7% забуференном растворе формальдегида.

После удаления фиксатора и промывки деионизованной водой клетки были окрашены 2% раствором ализаринового красного в течение 5 минут для выявления образования минерализованного матрикса по степени окрашивания соединений кальция и определения активности щелочной фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.3.1.), используя набор и для выявления активности щелочной фосфатазы (Sigma, Кат. № 86-R) по инструкции производителя. Исследовали на микроскопе Axiovert 200.

Получены следующие результаты. В контроле отсутствовала спонтанная дифференцировка клеток в остеогенном направлении. Среда 2 — в данном эксперименте было показано, что используемые клетки способны дифференцироваться в остеогенном направлении и продуцировать кальцийсодержащий матрикс. Среда 3 — показала способность к индукции остеогенной дифференцировки у сравнительно небольшого числа клеток. Среда 4 показала наибольшую активность в стимуляции жизненной активности клеток (она быстрее всех сред закислялась клетками), на 20-е сут. культивирования видны множественные центры кальцификации небольшого размера, что говорит о более позднем начале дифференцировки, чем в среде 2. Морфология клеток в центрах кальцификации соответствует фенотипу остеобластов. Среда 5 — показала меньшее число кальциевых узелков, чем в среде 4 при меньшей интенсивности окраски на ЩФ, однако была более активной, чем среда 3. Среда 6 — практически не оказывала дифференцирующего действия. Отмечены лишь единичные клетки, продуцирующие минерализованный матрикс. В этой и меньшей концентрации композиция НБК стимулирует пролиферацию фибробластов из свода черепа эмбрионов, подавляемую в данном эксперименте дексаметазоном (К.С. Десятниченко, О.П. Березовская, 1990).

Таким образом, в настоящей работе подтверждено, что композиция НБК, содержащая, как установлено, ряд местных факторов роста (E. Canalis, 1984; R.D Fincelman, 1992; P.J. Boyne, 1990; T.L. Mc Cartny, M. Centrella, 2000 e.a.). стимулирует остеогенную дифференцировку эмбриональных фибробластов *in vitro* и способна повышать остеогенные потенции тканеинженерных конструкций, предназначенных для возмещения костных дефектов.

В.Н. Ждан, В.И. Шепитко, А.А. Капустянская

**Опыт применения препарата
«Криоцелл – криоэкстракт плаценты»
в комплексном лечении обострения
подагрического артрита у больных
с метаболическим синдромом**

Высшее государственное учебное заведение Украины
«Украинская медицинская стоматологическая академия»,
Полтава, Украина
nusakap@rambler.ru

V.N. Zhdan, V.I. Shepitko, A.A. Kapustyanskaya

**Experience in use of preparation
«Cryocell – cryo extract of placenta» in complex
treatment of acute gouty arthritis in patients with
metabolic syndrome**

Целью исследования была оценка эффективности препарата «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» в комплексном лечении обострения подагрического артрита у больных с метаболическим синдромом.

Материал и методы. Под нашим наблюдением на базе поликлинического отделения Полтавской областной клинической больницы и Полтавского филиала ГП «МНЦ криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МОЗ Украины» находились 55 мужчин, больных подагрой с метаболическим синдромом, возраст от 35 до 50 лет включительно. Диагноз подагры устанавливали по классификационным критериям S. Wallace (1977). Диагноз метаболического синдрома устанавливали по критериям ААСЕ (2002). Пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 30 больных подагрой с метаболическим синдромом, которым кроме базисной терапии дополнительно в асептических условиях внутримышечно вводили «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» в дозе 1,8 мл 1 раз в сут., через день, трижды. Препарат «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» – это жидкая фракция из плаценты, объемом 1,8 мл, изготовленный в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков. Во вторую группу вошли 25 больных

подагрой с метаболическим синдромом, которым проводили только традиционную фармакотерапию. Базисная терапия, которую получали больные подагрой с метаболическим синдромом, состояла из приема нестероидного противовоспалительного препарата – Ксефокам в дозе 16 мг в сут., урикодепрессивного препарата – Аллопуринол в дозе 100 мг в сут., статины – Ливостор 10 мг в сут., гипогликемического препарата – Метморфин 180 мг в сут., сартана – Вазар в дозе 160 мг в сут. Всем пациентам рекомендовано придерживаться диеты № 6 по Певзнеру. Для оценки эффективности лечения во внимание принимали клинические данные и результаты лабораторных методов исследования, а именно уровень мочевой кислоты, глюкозы крови, натощак, общего холестерина.

Результаты исследования. Наблюдения показали, что комплексное лечение с использованием «Криоцелл – криоэкстракта плаценты» имеет существенные преимущества в сравнении с традиционным, а именно: среди больных 1 группы положительный клинический эффект достигнут у 97,2% случаев, а среди больных 2 группы, которым проводили стандартную терапию – у 94,8% случаев.

Клиническое улучшение у больных подагрой проявлялось в уменьшении деформации и дефигурации суставов, восстановлении мышечной силы, уменьшении боли в суставах, оценивали по шкале ВАШ. У больных 1 группы уже после второго введения препарата «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» заметили более стремительное снижение уровня мочевой кислоты по сравнению с показателями у больных 2 группы. Выводы. Установлено, что комплексное лечение обострения подагрического артрита у больных с метаболическим синдромом путем использования препарата «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» приводит к более динамическому снижению уровня мочевой кислоты, общего холестерина, глюкозы крови, обеспечивает значительное улучшение функциональной активности суставов, улучшает качество жизни больных подагрой с метаболическим синдромом.

Изменения клинко-лабораторных показателей у больных 1-й и 2-й групп

Показатель	1 группа		2 группа	
	До лечения	На 7 день от начала лечения	До лечения	На 7 день от начала лечения
Болевой индекс, баллы	9,8±4,2	2,7±1,8*	9,6±3,7	4,1±2,1*
Мочевая кислота, мкмоль/л	768±16,4	378±18,2*	770±16,9	419±19,2*
СОЕ, мм/час	35,5±1,2	22,96±1,9*	38,0±1,3	25,12±2,7*
СРБ, мм	3,0±0,2	1,66±0,3*	2,9±0,1	2,13±0,1*
Общий холестерин, ммоль/л	7,7±1,3	4,6±1,1	7,4±1,2	5,8±1,2
Глюкоза, ммоль/л	7,8±1,2	4,9±1,1	7,8±1,3	6,1±1,1
САД, мм. рт. ст.	159±3,46	138,5±1,1*	163,7±2,11	145,51±3,32*
ДАД, мм. рт. ст.	112±1,78	91,8±2,78*	110,4±2,14	94,21±2,73*

Примечание: *P < 0,05 между показателями до и после терапии.

А.В. Жуковский, А.В. Мелерзанов

Проблемы контроля качества продукции клеточных технологий

Федеральный Научно-клинический центр Детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава, Москва, Россия
m83071@gmail.com

A.V. Zhukotskiy, A.V. Melerzanov

Problems of quality assurance for Cellular Technologies Products

Отрасль клеточных технологий является одним из наиболее перспективных направлений в биомедицине. Однако отсутствие четкого законодательства, регулирующего деятельность данной отрасли, тормозит ее развитие.

Организационные проблемы существуют на всех этапах от создания клеточной технологии до применения продукции клеточных технологий в клинических испытаниях. Для лаборатории, создающей продукцию клеточных технологий, основной проблемой является контроль качества выпускаемой продукции, так как качество продукции прямо связано с обеспечением безопасности субъекта клинических испытаний. В связи с отсутствием нормативно-правовых актов, регулирующих контроль качества продукции клеточных технологий, отсутствует стандарт для так называемого клеточного паспорта или сертификата продукции клеточных технологий, в котором должны быть отражены все необходимые параметры продукта.

Сегодня контроль качества продукции, выпускаемой лабораториями клеточных технологий, заключается, как правило, в контроле донора по основным наиболее часто встречающимся инфекциям, передающимся с кровью, в бактериальном контроле исходного материала, поступающего в лабораторию и фенотипировании конечного продукта. В некоторых лабораториях продукция также подвергается микроскопическому анализу перед передачей учреждению, проводящему соответствующие клинические исследования. При этом недавно открытые нанобактерии, которые оказывают существенное влияние на функционирование клетки, сегодня чаще всего не определяются даже при трансплантации аллогенных клеток.

Быстрое развитие отрасли приводит к появлению новых клеточных технологий, связанных с генной инженерией, воздействием на геном вирусов, плазмид, наночастиц и других носителей участков ДНК, приводящих к изменению генома и в ряде случаев к изменению функций клетки качественно или количественно (например, увеличение продукции белков при воздействии наночастицами серебра размером 40 нм). Изменение генома значительно увеличивает риск возникновения нежелательных мутаций, потенциально опасных для реципиента. Это приводит к необходимости гораздо более тщательного многопараметрического контроля продукции клеточных технологий, в том числе, кариотипировании и оценки стабильности генома.

Стабильность генома имеет большое значение с точки зрения биологической безопасности продукции клеточных технологий. При этом являясь категорией биофизической, нередко недооценивается врачами и биологами, работающими в сфере клеточных технологий.

Таким образом, так как продукция клеточных технологий является сравнительно дорогостоящей, то в отсутствии соответствующего законодательства веро-

ятность полноценной оценки клеточного материала маловероятна, тем более по нанопараметрам (стабильность генома и наличие нанобактерий). Решение проблемы биобезопасности продукции клеточных технологий на наноуровне — это создание экономически оправданного высокоточного метода многоуровневой визуализации. В этом может помочь применение новой технологии — морфоденситометрии, которая позволяет осуществить одномоментный многоуровневый морфо-функциональный анализ клеточных структур. Аппаратно-программный комплекс, работающий на основе технологии морфоденситометрии, сочетает в себе высокую точность, простоту применения и низкую стоимость как самого комплекса (по сравнению с системами сходных функций и разрешения), так и анализов, проведенных с его помощью.

Внедрение данного аппаратно-программного комплекса в лаборатории клеточных технологий позволит проводить полноценный контроль качества без значительного роста себестоимости продукции.

В дальнейшем, когда широкая практика применения аппаратно-программного комплекса покажет эффективность морфоденситометрии, в том числе экономическую, технологию можно будет рекомендовать для стандартного оснащения лабораторий клеточных технологий.

Б.В. Засорин, О.М. Курмангалиев, А.А. Бельшев

Эффективность применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при токсических формах нарушения сперматогенеза

Западно-Казахстанский государственный медицинский университет им. М. Оспанова, Актыбинск, Казахстан

B.V. Zasorin, O.M. Kurmangaliev, A.A. Belyshev

The efficacy of using multipotent mesenchymal stromal cells derived from bone marrow in toxic impairment of spermatogenesis

На сегодняшний день достоверно установлено, что около 40% бесплодных браков обусловлено нарушениями в мужской половой сфере. Среди причин, приводящих к указанным нарушениям, одно из ведущих мест занимает токсическое поражение гонад. В связи с этим, актуален поиск новых подходов в реабилитации данной группы пациентов. Одним из таких подходов является клеточная терапия. Наш эксперимент проведен на 70 крысах-самцах линии Вистар, разделённых на три группы: интактные, негативный контроль и опытная группа. В качестве модели токсического поражения гонад использовали хроническую алкогольную интоксикацию (ежедневное внутрибрюшинное введение 20% этилового спирта из расчёта 0,52 г/кг в течение 6 мес.). Воздействию подвергались животные опытной группы и негативного контроля.

Аллогенные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) были выделены из бедренных костей двадцати семидневных крысят, культивированы *in vitro* до третьего пассажа, иммунофенотипированы и использованы в эксперименте. Введение ММСК животным опытной группы осуществляли внутрибрюшинно на 14 сут. после прекращения введения алкоголя. Учёт результатов осуществляли на седьмые, четырнадцатые и двадцать первые сутки после введения клеток. Для оценки функционального состояния семенников определяли плотность и формы спермиев (активно-подвижные, аномальные), полученных из

хвостовой части эпидидимиса по методике Е.К. Милованова в модификации Г.И. Егоровой.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что у животных опытной группы в динамике происходит улучшение всех изученных показателей. В частности, на 7 сут. после введения ММСК, концентрация сперматозоидов составила $56,3 \pm 5,1$ (млн/мл), на 14 сут. — $70,5 \pm 5,5$ ($p < 0,05$), на 21 — $97,0 \pm 5,3$, что статистически значимо выше, чем на 7-и и 14-е сут. В группе негативного контроля были выявлены следующие показатели: концентрация сперматозоидов на 7 сут. — $39,6 \pm 6,2$, на 14 сут. — $41,3 \pm 5,9$, на 21 — $43,6 \pm 5,7$. В группе интактных животных, данный показатель был стабилен на протяжении всего времени эксперимента и в среднем составлял $48,75 \pm 4,06$.

Доля активно-подвижных сперматозоидов у животных опытной группы, соответственно составил: $7,8 \pm 2,4$; $14,8 \pm 3,6$ и $31,4 \pm 4,1$ (отличия статистически достоверны, $p < 0,05$). У животных группы негативного контроля процент активно-подвижных сперматозоидов соответственно срокам наблюдения составил: $3,6 \pm 1,9$; $4,8 \pm 1,7$ и $5,7 \pm 2,8$. В группе интактных животных данный показатель в среднем составлял $33,67 \pm 5,09\%$.

Доля аномальных форм сперматозоидов в опытной группе животных изменялся по срокам наблюдения — $81,2 \pm 2,7$; $62,4 \pm 3,8$ и $45,3 \pm 3,1$, соответственно. В группе негативного контроля процент аномальных сперматозоидов соответственно составил: $91,4 \pm 3,6$; $84,5 \pm 4,1$ и $70,8 \pm 3,9$. У интактных животных данный показатель в среднем составлял $15,7 \pm 3,8\%$.

Полученные в эксперименте результаты позволяют нам сделать следующие выводы.

1. Применение ММСК при нарушениях сперматогенеза, обусловленного хронической алкогольной интоксикацией, стабилизирует основные показатели сперматогенеза, начиная с 7 сут. после внутрибрюшинного введения.

2. Двукратное увеличение числа сперматозоидов на 21 сут. после внутрибрюшинной инъекции ММСК, вероятно, обусловлено высоким биостимулирующим воздействием введенных клеточных компонентов.

В.Л. Зорин ^{1,2}, А.И. Зорина ¹, В.Р. Черкасов ¹,
Б.П. Копнин ^{1,2}, Р.В. Деев ¹, А.И. Неробеев ³,
А.В. Аликова ³, А.В. Шеин ⁴, С.В. Донецкая ⁵

Применение аутогенных дермальных фибробластов человека для коррекции возрастных и других изменений кожи

¹ ОАО «Институт стволовых клеток человека», Москва, Россия

² НИИ Канцерогенеза РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

³ ЦНИИС и ЧЛХ Росмедтехнологий, Москва, Россия

⁴ Клиника эстетической медицины «Ланцет», Москва, Россия

⁵ Клиника эстетической медицины «Лега Артис», Москва, Россия

V.L. Zorin, A.I. Zorina, V.R. Cherkasov, B.P. Kopnin,
R.V. Deev, A.I. Nerobeev, A.V. Alikova, A.V. Shein,
S.V. Donetskaya

Using autogenous human skin fibroblasts to correct skin age-related and diverse alterations

Согласно современным представлениям, дермальные фибробласты — основной клеточный компонент кожи — не только продуцируют и организуют экстрацеллюлярный матрикс дермы, но также взаимодействуют друг с другом и другими типами клеток. Играя ключевую роль в физиологии кожи и, благодаря своим уникальным свойствам, фибробласты, по мнению ведущих

специалистов, являются центром тканевой и органной физиологии кожи.

Культированные дермальные аутофибробласты, используемые в качестве интрадермально инъецируемой живой системы, позволяют эффективно восстанавливать дерму, измененную в результате хронологического и фото-старения, а также постакне-рубцов. Проведенные многочисленные (как отечественные, так и зарубежные) клинические исследования продемонстрировали безопасность и эффективность применения такой системы.

Институтом стволовых клеток человека (ИСКЧ) разработана и зарегистрирована в Росздравнадзоре инновационная медицинская технология выделения, наращивания, хранения и применения аутогенных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи и рубцов.

В настоящее время «ИСКЧ» совместно с «ЦНИИС и ЧЛХ» и клиниками эстетической медицины «Ланцет» и «Лега Артис» проводит дополнительные клинические исследования по применению культивированных аутофибробластов для коррекции дефектов кожи. Работа проводится в соответствии с зарегистрированной Росздравнадзором медицинской технологией и решением Этического комитета и Ученого совета ЦНИИС и ЧЛХ. В исследовании участвуют 17 пациентов в возрасте 45–62 лет.

Основная цель исследований: получение объективных знаний о качественных изменениях, происходящих в коже после интрадермальной трансплантации культивированных аутогенных фибробластов. Применение морфо-функциональных методов оценки культур фибробластов и современных инструментальных функциональных методов исследования кожи до и после интрадермального введения аутофибробластов, наряду с морфологическим методом исследования биоптатов кожи, позволит в динамике на протяжении не менее 2-х лет получить объективные сведения о происходящих в коже изменениях.

Доклад содержит результаты 1-го этапа клинических исследований (через месяц после курса интрадермальной трансплантации аутофибробластов, состоящего из 2 процедур).

С.И. Игнатенко, С.М. Космачева, Н.В. Петевка,
М.П. Потапнев

Применение АВ(IV)–сыворотки для наращивания мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека

Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, Минск, Беларусь

4kosmacheva@mail.ru

S.I. Ihnatsenko, S.M. Kasmachova, N.V. Petyovka,
M.P. Patapneu

Use human AB serum for expansion multipotential mesenchymal stem cells

Масштабирование применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (ММСК) в клинике требует подбора оптимальных условий культивирования с целью наращивания в культуре необходимого количества клеток для проведения клеточной терапии. Чаще всего для наращивания ММСК человека используется эмбриональная сыворотка коров, которая является источником ксеногенных антигенов и может быть причиной иммунологических

реакций. В настоящее время отмечается тенденция к внедрению протоколов культивирования ММСК, основанных на замене ксеногенной сыворотки человеческой.

Цель работы — доказать возможность эффективной экспансии ММСК при использовании АВ(IV)-сыворотки человека для культивирования *in vitro*.

Материал и методы. АВ(IV)-сыворотка получена от здоровых доноров крови (пул от 21 донора).

Протокол 1 (контрольный вариант). Мононуклеары, полученные из пунктата костного мозга центрифугированием на градиенте плотности фиколл-верографин, высевали в культуральные флаконы T25 (Sarstedt, Германия) в концентрации $0,5 \text{ млн/см}^2$ в полной питательной среде (ППС): α -МЕМ с глутамаксом (Invitrogen, GIBCO, США), 5% АВ (IV)-сыворотки, пенициллин/стрептомицин и помещали в CO_2 инкубатор при 37°C на 48 ч. Затем удаляли неадгезировавшие клетки и проводили замену среды. При достижении 80–90% конfluентности клетки снимали с подложки 0,25% раствором трипсин-ЭДТА. Полученную первичную культуру высаживали во флаконы в концентрации 5 тыс/см^2 и инкубировали в CO_2 инкубаторе до достижения 80–90% конfluентности. Таким способом провели три пассажа. Замену среды проводили каждые сут.

Протокол 2 отличался от контрольного получением первичной культуры и посевной концентрацией при пассажах. Пунктат костного мозга разводили средой α -МЕМ без сыворотки в соотношении 1:4, вносили в культуральные флаконы. Через 48 ч удаляли неадгезировавшие клетки и далее вели культуру в ППС по протоколу 1. При пассажах использовали посевную концентрацию 1 тыс/см^2 .

Протокол 3. Получение первичной культуры, наращивание и пассажирование ММСК проводились по регламенту протокола 1 с заменой ППС на среду следующего состава: среда для культуры клеток IMDM (Invitrogen, GIBCO, США), сыворотка крови группы АВ(IV) 5%, 10^{-4} М 2-меркаптоэтанола, пенициллин/стрептомицин.

Результаты. Исследование каждого протокола проведены на трех образцах костного мозга со значениями теста КОЕ-Ф 25,0; 4,7 и 11,3 колонии на 1×10^5 мононуклеаров.

Получение первичной культуры ММСК из цельного костного мозга было менее эффективно по сравнению с получением клеток из популяции выделенных мононуклеаров. Добавление в среду культивирования 2-меркаптоэтанола стимулировало пролиферацию ММСК — количество клеток в первичной культуре в 2,3 раза превышало значения контрольного протокола. Период наращивания первичной культуры был одинаковым и составлял 10–11 сут.

В дальнейшем, при пассировании клеток в посевной концентрации 1 тыс/см^2 , была установлена наиболее высокая пролиферативная активность ММСК на протяжении всего периода субкультивирования, что позволило получить количество клеток, значительно превышающее контрольные показатели. Напротив, клетки в среде IMDM с 2-меркаптоэтанолом демонстрировали слабую пролиферативную активность. Всего за 3 пассажа из 1 мл костного мозга по протоколу 1 было получено $8,0 \times 10^6$ ($5,8$ – $12,2 \times 10^6$), по протоколу 2 — $210,6 \times 10^6$ ($43,0$ – $503,1 \times 10^6$), по протоколу 3 — $3,37 \times 10^6$ ($2,73$ – $4,0 \times 10^6$) ММСК. Кратность увеличения клеток относительно первоначально внесенного количества КОЕ-Ф (в расчете на 1 мл костного мозга) в среднем составила: по протоколу 1 — $1,1 \times 10^4$, по

протоколу 2 — $8,3 \times 10^5$ и по протоколу 3 — $7,7 \times 10^2$ раза. Продолжительность наращивания культуры составила 29; 31; 31 сут.

Число удвоения клеток культуры было самым высоким в период первого пассажа и постепенно снижалось к третьему пассажу. При этом число генераций ММСК, высеваемых в концентрации 1 тыс/см^2 , на первом и третьем пассажах в 2,6 раза превосходило значения контрольного протокола, а число генераций культуры ММСК по протоколу 3 было ниже контроля в 2,2 и 3,6 раза соответственно. Общее число генераций ММСК в течение 3-х пассажей по протоколам 1, 2 и 3 составило 12,3; 16,3; 9,7.

Таким образом, проведенные исследования показали, что применение 5% сыворотки АВ(IV) в качестве добавки к питательной среде, позволяет получить количество ММСК, необходимое для клинических целей. Оптимальными условиями для наращивания ММСК являются: получение первичной культуры из суспензии мононуклеаров, применение полной питательной среды на основе α -МЕМ и посевной концентрации $3 \pm 1 \text{ тыс./см}^2$ при пассировании.

Т.С. Йылмаз, А.А. Гумерова, А.П. Киясов,
А.В. Табанакова, Д.И. Андреева, И.М. Газизов,
М.С. Калигин

Участие гемопоэтических CD34(+)-клеток в репаративной регенерации почки

ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия
tsmetannikova@yandex.ru

T.S. Yilmaz, A.A. Gumerova, A.P. Kiassov, A.V. Tabanakova,
D.I. Andreeva, I.M. Gazizov, M.S. Kaligin

Study of CD34-positive haematopoietic cells in kidney regeneration

Проблема хронического гломерулонефрита (ХГН) занимает одно из центральных мест в нефрологии. Актуальность этого заболевания обусловлена его высокой распространенностью, поражением в основном работоспособной части населения и неизбежным развитием хронической почечной недостаточности. Кроме того, крайне проблематичной остается терапия ХГН. Так, медикаментозное лечение малоэффективно и сопряжено с многочисленными побочными эффектами, гемодиализ является лишь методом паллиативной терапии, а трансплантация почки часто невозможна. В связи с этим необходимым является поиск новых методов лечения, одним из которых может стать клеточная терапия с использованием гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

К сожалению, на сегодняшний день ничего не известно об участии ГСК в регенерации клубочков при ХГН, и соответственно, чтобы установить целесообразность трансплантации ГСК при ХГН, необходимо получить ответ на этот вопрос. Кроме того, перед тем как трансплантировать стволовые клетки с целью лечения какого-либо заболевания, необходимо знать, как ведут они себя в здоровой почке, мигрируют ли трансплантированные клетки в почку, и если мигрируют, то в какие отделы встраиваются.

Цель исследования: изучить возможность участия гемопоэтических CD34(+)–клеток в процессах восстановления клубочков у больных ХГН, а также хоуминг и дифференцировку трансплантированных мононуклеаров пуповинной крови человека в интактных почках крыс.

Материалы и методы. Изучение участия стволовых клеток в процессах репаративной регенерации почки проведены на 64 нефробиоптатах больных различными клинко-морфологическими формами первичного гломерулонефрита. Для выявления гемопоэтических CD34(+) -клеток в клубочках использовали иммуногистохимическое окрашивание к CD31 (маркёру эндотелиальных клеток) и CD34 (маркёру эндотелиальных и гемопоэтических стволовых клеток). Преобладание экспрессии CD34 над CD31 клетками клубочков свидетельствовало о наличии в них гемопоэтических CD34(+) -клеток. Для каждого нефробиоптата проводили гистоморфологическую оценку индекса воспалительной активности ХГН и индекса склероза клубочков, а также иммуногистохимическим методом изучали пролиферативную активность клеток клубочков (окрашивание к PCNA) и их миофибробластическую трансдифференцировку (окрашивание к α -ГМА).

Изучение участия стволовых клеток в процессах физиологической регенерации почки проведено на 15 белых беспородных крысах, которым в хвостовую вену вводили фракцию мононуклеаров пуповинной крови человека, выделенную на градиенте плотности фикола. Через 2, 5, 7 и 14 сут. проводили иммуногистохимическое окрашивание антителами к лейкоцитарному антигену человека (HLA-ABC) для изучения миграции и дифференцировки введенных клеток.

Результаты. Сравнительный анализ показал, что в 34% нефробиоптатов гемопоэтические CD34(+) -клетки обнаруживались в клубочках. На основании того, что стовые клетки — это дополнительный регенераторный резерв, а ХГН — это хроническое иммуновоспалительное повреждение почки, мы решили изучить взаимосвязь между появлением гемопоэтических CD34(+) -клеток в клубочках и морфологической активностью заболевания (индексом воспалительной активности и индексом склероза клубочков) и сопоставить это с наиболее изученными механизмами регенерации — пролиферацией клеток клубочков и их миофибробластической трансдифференцировкой. Установлено, что максимальное число нефробиоптатов с наличием гемопоэтических CD34(+) -клеток обнаруживается при индексе воспалительной активности ХГН до 4 баллов и индексе склероза клубочков до 2 баллов. В то же время, значительно чаще нефробиоптаты с повышенной пролиферативной активностью клеток клубочков и их миофибробластической трансдифференцировкой встречались у больных с индексом воспалительной активности более 4 и индексом склероза клубочков более 7 баллов.

Результатом иммуногистохимического окрашивания почек крыс антителами к HLA-ABC после трансплантации мононуклеаров пуповинной крови человека стало обнаружение HLA-ABC(+) -клеток в эпителиальной выстилке дистальных канальцев нефрона на всех экспериментальных сроках — 2, 5, 7 и 14 сут. Причём HLA-ABC экспрессировался не во всех дистальных канальцах и не всеми клетками.

Выводы.

1. Гемопоэтические CD34(+) -клетки участвуют в регенерации клубочков при ХГН, и это участие максимально при минимальной и умеренной воспалительной активности заболевания (1–4 балла) и минимальном склерозе клубочка (1–2 балла). При более выраженном воспалении и склерозе основную роль в регенерации играют процессы пролиферации и миофибробластической трансдифференцировки клеток клубочка.

2. Мононуклеары пуповинной крови человека, трансплантированные в системный кровоток крыс, мигрируют в неповрежденную почку и встраиваются в эпителиальные клетки дистальных канальцев нефрона, на основании чего дистальные канальцы можно рассматривать как «нишу» стволовых клеток.

М.З. Кауламбаева¹, М.К. Амиргазиева¹,
Г.С. Стабаева¹, К.С. Бименов¹, А.М. Орекешова²

Применение клеточных технологий для профилактики несостоятельности легочных швов в эксперименте

¹ НПП «Антиген», Алматы, Казахстан

² Национальный научный медицинский центр, Астана, Казахстан

marzan61z@mail.ru

M.Z. Kaulambayeva, M.K. Amirgazyeva, G.S. Stabayeva,
K.S. Bimenov, A.M. Orekesheva

Application of cell technologies for the prevention of pulmonary failure seams in the experiment

В хирургии нет более важной проблемы, чем предупреждение и борьба с послеоперационными осложнениями. Особую опасность представляет собой ранняя и поздняя несостоятельность легочных и бронхиальных швов, которая влечет за собой тяжелые последствия в виде развития гнойно-воспалительных процессов, бронхоплевральных свищей, обуславливающих высокую инвалидность и послеоперационную летальность. По данным научной литературы частота осложнений при операциях на легких с формированием легочно-бронхально-плевральных свищей наблюдается в 7,3% случаях.

Цель работы: экспериментальное обоснование применения культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга человека и клеток диплоидного штамма фибробластов человека ЗФЧ 01/05 на коллагеновом матриксе для профилактики несостоятельности легочных швов.

Работу проводили на кроликах весом 3–4 кг, возрастом 10–12 мес. в количестве 36 шт. Подопытные животные были разделены на 4 группы (одна контрольная и три испытуемые). Подопытным животным после введения наркоза и обработки операционного поля произведена правосторонняя торакотомия, пневмоторакс. После иссечения легочной ткани на рану были наложены швы. На поверхность швов у животных испытуемых групп была нанесена суспензия клеток (ММСК или ЗФЧ 01/05) в коллагеновом геле и наложена коллагеновая мембрана.

На 3, 7 и 14 сут. после операции животных выводили из опыта. Производили вскрытие плевральной полости. Проводили осмотр плевральной полости на предмет содержания патологической жидкости и состоятельности легочных швов. Проводили обследование легких на герметичность швов (водные пробы). Взяты кусочки легочной ткани в области шва для патоморфологических исследований.

У животных первой контрольной группы — на 3 сут. швы не состоятельны, на 7 и 14 сут. после операции швы состоятельны, но не герметичны. Во второй испытуемой группе (наложение на шов только коллагеновой мембраны) — на 3 и 7 сут. швы состоятельны, но не герметичны, на 14 сут. шов состоятелен и герметичен. В третьей испытуемой группе (с нанесением суспензии клеток ЗФЧ 01/05 с наложением коллагено-

вой мембраны) — на 3 сут. швы состоятельны, на 7 и 14 сут. швы состоятельны и герметичны. В четвертой испытуемой группе (с нанесением суспензии клеток ММСК человека с наложением коллагеновой мембраны) на 3 сут. швы состоятельны, на 7 и 14 сут. швы состоятельны и герметичны.

Гистологические исследования легочных швов, наложенных после иссечения части легкого, показали следующее. По сравнению с контрольной группой у экспериментальных животных, у которых поверхность хирургически травмированной легочной ткани обработана коллагеновой мембраной, культурой фибробластов с коллагеном и культурой ММСК, клеточные и тканевые реакции были более ярко выраженными. Это свидетельствует о стимулирующем влиянии культур клеток фибробластов и ММСК на репаративные процессы.

На основании полученных результатов макроскопических и гистологических исследований можно утверждать, что применение клеточных технологий для профилактики несостоятельности легочных является оптимальным способом лечения. В контрольной группе на 14 сут. не удается добиться герметичности легочного шва. Применение только коллагеновой мембраны позволяет получить герметичный шов на 14 сут. Сочетанное воздействие клеток ЭФЧ 01/05 и ММСК фетального костного мозга человека с коллагеновым матриксом приводит к образованию состоятельного и герметичного легочного шва уже на 7 сут. после операции.

С.Л. Киселев

Репрограммирование соматического генома

УРАН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН»,
Москва, Россия
sl_kiselev@yahoo.com

S.L. Kiselev

Reprogramming of somatic genome

В процессе развития организма реализуется онтогенетическая программа, в результате выполнения которой клетки индивидуального организма постепенно утрачивают потенциал дифференцировки. Однако, в целом ряде исследований было показано, что цитоплазматических и ядерных факторов, содержащихся в плюрипотентной клетке, достаточно для репрограммирования генома соматической клетки до плюрипотентного состояния (Kato et al., 1998; Matveeva et al., 1998). С помощью транскрипционных факторов, которые напрямую вовлечены в поддержание плюрипотентности, была разработана технология получения клеток с индуцированной плюрипотентностью (iPS) (Takahashi&Yamanaka, 2006). В настоящем исследовании для получения клеток с индуцированной плюрипотентностью нами были использованы фибробласты кожи, полученные от больных с нейродегенеративными заболеваниями. Полученные iPS клетки были схожи с эмбриональными стволовыми клетками человека по морфологическим, молекулярно-генетическим и функциональным параметрам. Дифференцированные из iPS клеток нейрональные производные могут служить моделями для изучения патогенеза заболеваний и их генетической коррекции.

А.В. Ковалев

Методика построения тканеинженерных конструкций на раневой поверхности восстанавливаемых органов

ФГУ «ЦИТО им. Н.Н. Приорова Росмедтехнологий»,
Москва, Россия
kovalov1@mail.ru

A.V. Kovalev

Tissue reconstruction build-up on the wounded surface of recovered organs

В настоящее время выделяют три наиболее перспективные стратегии развития регенеративной медицины:

- 1) трансплантация клеток для формирования новой ткани в области пересадки;
- 2) внедрение биоискусственных тканей и органов, выращенных *in vitro*;
- 3) индукции регенерации в естественных условиях от неповрежденных тканей, смежных с раной (D. Stocum, 2006).

Нами разработан новый подход к восстановлению частей органов и тканей, позволяющий объединить эти стратегии в одной технологии. Для этого созданы специальные растворы и биореакторы, в которые возможно помещать поврежденную часть тела и длительно там удерживать, не извлекая из водной питательной среды, до восстановления целостности органа.

Само по себе длительное и непрерывное удержание травмированных органов в растворе, приближенном по физико-химическим свойствам к межклеточной среде, влияет на регенерацию. В зависимости от возраста животного, локализации и формы раны благодаря воздействию раствора на травмированные ткани в биореакторе исключается рубцевание, или значительно уменьшается фиброз кожного регенерата. Более того, водная изотоническая среда способствует регенерации, не характерной для вида и линии экспериментальных животных при обычных условиях заживления ран: в растворах отрастают кончики хвостов и пальцев у крысят. Этого не происходит при обычных условиях заживления, когда на раневой поверхности образуется рубец и остается очевидный посттравматический дефект. Обнаружено, что окружение раны способно влиять не только на морфогенез, но и на саму возможность заживления. Так, кожа хвоста или лапы у крыс не регенерирует, если циркулярно иссекается кожный полнослойный лоскут шириной 7–8 мм вокруг оси этих наружных органов. На воздухе перешеек, лишенный наружного покрова, гибнет вместе с неповрежденной частью хвоста или лапы, расположенной дистально месту травмы. В растворе-биореакторе при таком же повреждении кожа регенерирует с образованием малозаметного рубца, а конечность или хвост остаются целыми (Иванищук П.П., Ковалев А.В., 1990, Ковалев А.В., Иванищук П.П., 1991; 1999). Если удалить 30 и более процентов кожи от всей площади поверхности тела у крысы, то регенерации кожи не произойдет, животное гибнет от раневого истощения. Погружение животного в установку с раствором позволяет адаптировать крысу к повреждению и повысить регенеративную способность наружного покрова. В течение 30–60 сут. преимущественно за счет контракции и вне раневого вставочного роста обширная рана кожи заживает (Ковалев А.В., Иванищук П.П., 1995, 1997).

Эксперименты показали возможность технического обеспечения длительного окружения области по-

вреждения не просто физиологическим раствором, а стерильной питательной средой. Внутри такого раствора-биореактора создаются условия для выращивания биоискусственных органов. Итак, в растворе-биореакторе, где находится поврежденный сегмент конечности, одновременно выращивается графт. При этом матрица биоискусственной части восстанавливаемого органа плотно взаимодействует с раневой поверхностью. Матрица может иметь различную форму, структуру и состав, и даже наращиваться и собираться в ходе восстановления органа, сразу или постепенно воспроизводя его форму. Эта же матрица является индуктором и проводником репаративной регенерации «по каркасу», в первую очередь для сосудов и нервов из дна раны, обеспечивая интеграцию тканеинженерной конструкции сразу с началом и параллельно ее формированию. Проблема интеграции и васкуляризации трехмерных тканеинженерных конструкций актуальна и в данном случае решается не префабрикацией или использованием принципа трехкомпонентной клеточной культуры, создания искусственных микрососудистых собственных сосудистых сетей децелюлированной ткани и т.д., а иным путем. Это новая технология восстановления органов эффективна за счет объединения параллельно идущих и взаимно потенцирующих друг друга процессов: репаративной регенерации по каркасу и восполнения травматического дефекта поврежденного органа биоискусственной составляющей, выращиваемой непосредственно на ране.

Н.В. Кудряшова ¹, И.И. Салафутдинов ¹,
И.Г. Мустафин ², Р.Р. Исламов ²,
А.А. Ризванов ^{1, 2}

**Трансфекция клеток HEK293
и мультипотентных мезенхимных стромальных
клеток человека *in vitro* плазмидами
с помощью высокомолекулярного
полиэтиленимина**

¹ ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

² ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия
nkudryashova@gmail.com

N.V. Kudryashova, I.I. Salafutdinov, I.G. Mustafin,
R.R. Islamov, A.A. Rizvanov

**Transfection of HEK293 and human multipotential
mesenchymal stromal cells *in vitro* with plasmids using
high molecular weight polyethyleneimine**

В настоящее время большое значение уделяют стимуляции регенеративных процессов в организме. Одно из перспективных направлений — разработка методов генно-клеточной терапии. В основе подхода лежит генетическая модификация клеток *in vitro* и *ex vivo* для коррекции генетического дефекта или для повышения экспрессии рекомбинантных терапевтических биомолекул. Затем генетически модифицированные клетки могут быть трансплантированы пациенту для лечения широкого спектра дегенеративных и ишемических заболеваний. Применение плазмидных экспрессионных векторов — один из наиболее биологически безопасных подходов для генетической модификации клеток. Основным недостатком плазмид — низкая эффективность трансфекции и высокая стоимость химических трансфекционных препаратов. Кроме того, трансфекционные препараты зачастую обладают выраженной цитотоксичностью. Отдельную проблему представляет низкая

эффективность трансфекции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК).

Полиэтиленимины (polyethyleneimine, PEI) — наноразмерные положительно заряженные (катионные) частицы, состоящие из синтетического полимера — продукта полимеризации этиленимина. PEI способны конденсировать нуклеиновые кислоты и эффективно проникать внутрь клетки. Для трансфекции клеток чаще всего применяют низкомолекулярные PEI (например 25 000 кДа). Однако низкомолекулярные PEI обладают относительно высокой цитотоксичностью по сравнению с высокомолекулярными PEI. Кроме того, на сегодняшний день недостаточно исследован вопрос применения высокомолекулярных PEI для трансфекции стволовых клеток человека, в частности ММСК.

Задачи исследования: оценить эффективность трансфекции клеток HEK293 и ММСК плазмидами, экспрессирующими репортерные белки LacZ (β -галактозидаза) и GFP (зелёный флуоресцентный белок), с помощью высокомолекулярного PEI.

Материал и методы. Работу проводили в ламинаре 2 класса биологической защиты. Клетки HEK293 культивировали на среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров FBS и пенициллина/стрептомицина. Культуру ММСК получали методом эксплантации из зачатков зубов мудрости подростков и поддерживали в питательной среде α MEM с добавлением 10% FBS и пенициллина/стрептомицина. В работе использовали PEI с молекулярной массой 60 000 кДа (Acros Organics). Трансфекционный реагент TurboFect (Fermentas) использовали в качестве контроля в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. В качестве репортерных генетических конструкций использовали плазмиды pEGFP-N2 (Clontech), кодирующую ген зелёного флуоресцентного белка GFP, и pAAV-LacZ, кодирующую ген β -галактозидазы. Анализ экспрессии GFP проводили с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Анализ экспрессии LacZ проводили на планшетном спектрофотометре по уровню накопления продуктов гидролиза о-нитрофенил- β -D-галактопиранозиды (ONPG).

Результаты и обсуждение. В работе использовали соотношения PEI к плазмидной ДНК (мг:мг) 0,5:1, 0,5:2, 1:1 и 2:2. Показано, что экспрессия LacZ в клетках HEK293 при трансфекции с помощью PEI составила приблизительно 50% от уровня экспрессии в клетках, трансфицированных TurboFect. В то же время уровень экспрессии LacZ в МСК, трансфицированных PEI (в соотношении 1:1) или TurboFect, значительно не различались. Таким образом, показано, что высокомолекулярный PEI способен конденсировать плазмидную ДНК с последующей трансфекцией клеток HEK293 и ММСК. В дальнейшем мы планируем продолжить работы по оптимизации режимов трансфекции ММСК препаратами на основе высокомолекулярных PEI.

С.А. Кузнецов, Н. Черман, М. Манкани,
П. Герон Робей.

**Образование костной ткани путём
трансплантации стромальных клеток костного
мозга и эмбриональных стволовых клеток
человека**

Национальные Институты Здоровья, Бетезда, США
skuznets@mail.nih.gov

S.A. Kuznetsov, N. Cherman, M.H. Mankani, P. Gehron Robey

**Bone tissue engineering by in vivo transplantation
of human bone marrow stromal cells and human
embryonic stem cells**

Стромальные клетки костного мозга (СККМ) были открыты более 40 лет назад Александром Яковлевым Фриденштейном; в начале 90-х их неудачно переименовали в «мезенхимальные стволовые клетки». В последние годы количество публикаций, посвящённых СККМ, растёт лавинообразно, что вызвано двумя важнейшими их особенностями. При системном введении, благодаря обилию освобождающихся цитокинов и сильному иммуномодулирующему эффекту, СККМ оказывают благоприятное воздействие на течение целого ряда заболеваний, от инфаркта миокарда до реакции «трансплантат против хозяина». Трансплантированные локально, СККМ, в составе которых присутствуют мультипотентные скелетные стволовые клетки (ССК), могут образовывать кость и кроветворное микроокружение (КМО), а в ряде случаев также и хрящ.

Образование костной ткани аутогенными СККМ является весьма перспективным подходом при многих травмах и иных патологиях костей, когда существующие приёмы (ауто- и аллотрансплантация кости, остеопроводящие материалы, остеоиндуцирующие факторы) оказываются недостаточными. Однако, широкому применению этого подхода препятствует тот факт, что методы культивирования и трансплантации СККМ человека (СККМч) ещё недостаточно разработаны. Наша лаборатория многие годы занимается вопросами биологии и клинического применения СККМ. В настоящем докладе представлены результаты экспериментов по трансплантации СККМч, когда клетки 2–4-го пассажей трансплантировали подкожно иммунонекомпетентным мышам *bg-nu/nu-xid*; трансплантаты фиксировали 8–16 нед. спустя.

Нами было показано, что СККМ разных видов животных нуждаются в различных компонентах культуральной среды для пролиферации *in vitro*, и в различных носителях для образования кости *in vivo*; очевидно, данные, полученные на СККМ мышей, кроликов или овец нельзя механически переносить на СККМч. Последние не образуют кости при трансплантации с носителями, построенными на основе синтетических полимеров, таких как polyvinyl, poly(L-lactic acid), hyaluronic acid, или poly(lactide-co-glycolide). Очень мало костной ткани образуют СККМч при трансплантации с деминерализованным костным матриксом или с коллагеновыми губками. Только носители, содержащие фосфаты кальция: гидроксипатит (ГА), трифосфат кальция (ТФК) или их комбинации, способствуют интенсивному костеобразованию в трансплантатах СККМч. При сравнении продуктов нескольких компаний оказалось, что среди восьми различных ГА/ТФК носителей, имеющих сходный химический состав и близкую структуру, лишь два поддерживают не только обширный остеогенез, но и обильное кроветворение — последнее сви-

детельствует о сохранении ССК в составе популяции СККМч. Важную роль в стимуляции остеогенеза играют такие качества ГА/ТФК носителей как биосовместимость, способность подвергаться деградации в организме, порозность, структура поверхности, соотношение между кальцием и фосфором. Сравнение макроструктуры ГА/ТФК носителей показало, что порошковые носители, состоящие из отдельных мелких частиц, имеют существенное преимущество перед цельными блоками. Среди порошков наилучшему костеобразованию способствовали частицы диаметром от 0,1 до 0,5 мм; как уменьшение ($< 0,044$ мм — 0,1 мм), так и увеличение (0,5–2,0 мм) размеров частиц приводило к существенному сокращению костеобразования. Мы продолжаем активный поиск и разработку ГА/ТФК носителей, способствующих формированию наиболее обширной кости и КМО при трансплантации СККМч.

В отличие от СККМч, СККМ мыши образуют прекрасную кость и КМО, когда их трансплантируют в коллагеновые губки. Мы предположили, что низкий уровень остеогенеза в трансплантатах СККМч в коллагеновых носителях может быть вызван быстрой деградацией коллагена клетками человека. Для замедления деградации был применён метод поперечной сшивки молекул коллагена глютаральдегидом и дифенилфосфорилазидом (ДФФА). Оказалось, что, при использовании 0,1–0,5% ДФФА, СККМч образуют атипический хрящ и хондроидную кость. Применяя 0,5–1,5% ДФФА в сочетании со вторичным носителем (фибриновым сгустком), можно получить образование кости и КМО. Этот подход открывает широкие перспективы получения, путём модификации структуры носителя, не только кости, но и других скелетных тканей в трансплантатах СККМч.

Как известно, в подавляющем большинстве работ СККМч выращиваются на средах, содержащих эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС). Между тем, клетки, находившиеся в контакте с ЭБС, могут служить переносчиками вирусов, прионов и зоонозов, а также вызывать иммунные реакции против сывороточных антигенов коровы. Чтобы разработать систему культивирования СККМч, свободную от продуктов животного происхождения, мы заменили ЭБС на тромбоцитарный лизат человека (ТЛ, 1×10^9 тромбоцитов на 1 мл плазмы крови). Оказалось, что стимулирующий эффект на пролиферацию СККМч уменьшается в ряду: 5% ТЛ $>$ 20% ЭТС $\sim$ 2,5% ТЛ $>$ 1% ТЛ. Более того, СККМч, выращенные на средах, содержащих 5%, 2,5% или 1% ТЛ, образуют столько же (или даже больше) кости и КМО, как и СККМч, выращенные на среде с 20% ЭТС. Следовательно, ССК хорошо поддерживаются в культурах с ТЛ; среды, содержащие ТЛ, весьма перспективны для выращивания СККМч с целью их последующего клинического применения.

Образование кости на основе эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСКч) или собственных индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток большого явилось бы серьёзным достижением, так как открыло бы доступ к неограниченным ресурсам остеогенных клеток-предшественниц. До настоящего времени, однако, не считая спорадически формируемых, мелких островков костной ткани, образования кости клетками — производными ЭСКч достичь не удавалось. Мы поставили своей задачей выработать методику образования костной ткани *in vivo* потомками ЭСКч при отсутствии опухолевого роста (формирования тератом). ЭСКч (линия HSF-6, 58-62 пассажей) длительно,

в течение 2–4 мес., выращивали в дифференцировочных условиях *in vitro*. При использовании 12 культуральных сред различного состава, было создано 16 дифференцированных клеточных линий фибробластной морфологии, которые были трансплантированы *in vivo* в сочетании с ГАТФК носителями. Через 8–16 нед. во многих трансплантатах была сформирована гистологически несомненная костная ткань человеческого происхождения. Она была хорошо минерализованной, имела пластинчатую структуру и состояла из многочисленных, тесно переплетённых трабекул. Эта кость по своим размерам значительно превосходила все костные структуры, построенные *in vivo* клетками — потомками ЭСКч, которые были описаны ранее. Культуральные среды, созданные на основе DMEM, с добавлением ЭБС, дексаметазона и аскорбата, способствовали существенно более частому образованию кости. Напротив, среды, основанные на α MEM, благоприятствовали развитию тератом. В клетках дифференцированных линий — потомков HSF-6 уровни транскрипции генов, связанных с плюрипотентностью (Oct4, Nanog), остеогенезом (Coll I, Runx2, ALP, BSP) и хондрогенезом (Coll II и X, Aggrecan), не коррелировали с образованием ни кости, ни тератом. Полученные результаты намечают новые пути к созданию костной ткани на основе ЭСКч или собственных ИПС клеток человека.

Н.В. Ламовская, М.М. Зафранская, Г.Я. Хулуп

Влияние ростовых факторов на эндотелиальную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека *in vitro*

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь
natkhrpach@tut.by

N.V. Lamouskaya, M.M. Zafranskaya, G.Ya. Khulup

The Influence of Growth Factors on Endothelial Differentiation of Human Multipotential Mesenchymal Stromal Cells into Endothelial-like Cells *in vitro*

Цель исследования. Изучить влияние ростовых факторов на дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) в эндотелиальном направлении по экспрессии эндотелиальных и мезенхимальных маркеров дифференцируемыми культурами для оптимизации протокола направленной дифференцировки ММСК в эндотелиоциты.

Материал и методы. Для получения ММСК мононуклеары костного мозга и обработанный коллагеназой липоаспират засевали в культуральные чашки в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки коров, 2 мМ L-глутамин и антибиотики. Индукцию эндотелиальной дифференцировки ММСК проводили культивированием в питательной среде m199 с пониженным содержанием сыворотки в присутствии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF), и различных комбинаций ростовых факторов: VEGF + FGF, VEGF + инсулиноподобный фактор роста (IGF), VEGF + FGF + IGF + эпидермальный фактор роста (EGF). Эффективность дифференцировки оценивали по экспрессии маркеров CD90, CD31, CD34 методом проточной цитометрии. В качестве положительного контроля использовали культуры эндотелиальных клеток пуповинной вены (ЭКПВ) человека.

Результаты определения маркеров при различных способах индукции эндотелиальной дифференцировки были подвергнуты кластерному анализу. Дальнейшее сравнение выделенных кластеров (подгрупп) проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Клеточный прирост в культурах вычисляли по формуле: $P = N_1/N_0$, где P — клеточных прирост в течение пассажа, N_1 — количество полученных клеток; N_0 — количество посеянных клеток. Сравнение клеточного прироста при дифференцировке и в контроле в параллельных опытах (связанные группы) проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (25-й — 75-й процентиля)).

Результаты. Недифференцированные ММСК КМ и ЖТ человека характеризовались сходной фибробластоподобной морфологией и стабильным фенотипом CD90⁺/CD105⁺/CD44⁺/CD34⁻/CD31⁻/CD45⁻. ЭКПВ и ММСК различались по экспрессии молекул CD31, CD34, характерных для эндотелиальных клеток, и CD90, являющегося маркером ММСК и не экспрессирующегося на эндотелиоцитах в стандартных условиях культивирования.

При проведении кластерного анализа установлено, что культуры ММСК, в которых индукция эндотелиальной дифференцировки осуществлялась с использованием комбинации факторов роста, включающей как минимум VEGF и FGF, формируют отдельный кластер (подгруппу) за счет максимального изменения экспрессии изучаемых маркеров. В подгруппе, где для индукции дифференцировки использовалась комбинация факторов, включающая VEGF и FGF, экспрессия маркеров CD31 и CD34 была выше, а маркера CD90 — ниже, чем в подгруппе культур, где дифференцировка индуцировалась с использованием только одного фактора (VEGF или FGF), либо комбинации факторов, включающей VEGF и IGF, причем обнаруженные различия являются статистически значимыми (таблица).

Экспрессия маркеров CD90, CD31 и CD34 в культурах клеток при использовании различных способов индукции направленной дифференцировки в эндотелиоциты

Маркер	Подгруппа способов индукции дифференцировки		
	Комбинация факторов роста, включающая VEGF и FGF	Использование в качестве индукторов дифференцировки VEGF или FGF или VEGF+IGF	Значение p
CD90	66,6% (58,5–71,6%)	94% (87–99,5%)	0,021
CD31	65,3% (51,7–47%)	0,6% (0,5–0,8%)	0,020
CD34	51,25% (14,2–81%)	0,4% (0,1–1,75%)	0,042

При культивировании ММСК в присутствии комбинации факторов VEGF + FGF в среде m199 с пониженным содержанием сыворотки отмечался меньший клеточный прирост по сравнению со стандартными условиями культивирования (соответственно, 1,54 (0,71–1,54) и 4 (4–7,62), $p < 0,05$). При культивировании в присутствии комбинации ростовых факторов

VEGF+FGF+EGF+IGF пролиферативная активность клеток достоверно превышала пролиферативную активность в соответствующих культурах в контроле, и клеточный прирост составил, соответственно, 5,21 (2,5–12,73) и 4,17 (1,6–5,45), $p < 0,05$).

Выводы. Культивирование ММСК в присутствии комбинации ростовых факторов, включающей как минимум VEGF и FGF, для индукции эндотелиальной дифференцировки, приводит к статистически значимому увеличению экспрессии культурами эндотелиальных маркеров CD31 и CD34 и уменьшению экспрессии маркера ММСК CD90 по сравнению с другими способами культивирования. Культивирование в дифференцировочной среде, содержащей комбинацию четырех факторов роста VEGF, FGF, IGF и EGF, позволяет добиться оптимальных результатов с точки зрения клеточного прироста и индукции экспрессии эндотелиальных маркеров.

Г.С. Лобынцева¹, В.А. Шаблий², М.Д. Кучма¹,
Д.В. Лобынцев¹

**Программа криоконсервирования
и морфофункциональная характеристика
популяции клеток, выделенных
из эмбриональной печени**

¹ ООО «Институт клеточной терапии», Киев, Украина

² Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Киев, Украина

G.S. Lobyntseva, V.A. Shablii, M.D. Kuchma, D.V. Lobyntsev

**A programme of cryoconservation and morphofunctional
characterization of a cell population derived from
an embryonic liver**

Для разработки программы криоконсервирования гемопоэтических клеток эмбриональной печени использован метод многофакторных экспериментов 2³, при выполнении которого варьировали следующие факторы: концентрацию криопротектора, скорость замораживания до температуры кристаллизации и длительность выдержки (адаптации) на этапе кристаллизации образца. Это позволило выявить закономерности взаимодействия параметров криоконсервирования и сформулировать гипотезу об устранении основных механизмов криоповреждения путем варьирования скоростями снижения температуры, концентрацией криопротектора, инициацией процесса кристаллизации и температурными остановками для изменения характера кристаллообразования в замораживаемом объекте. Функцией отклика служила сохранность клеток-предшественниц грануломоноцитопоза (КОЕ-ГМ).

Как показали результаты экспериментов, область исследованных режимов является оптимальной и позволяет получить сохранность КОЕ-ГМ от 50 до 90%. При устранении влияния неконтролируемых параметров максимальное количество колоний и кластеров (95–98%) после криоконсервирования образуют гемопоэтические клетки, замороженные с криопротектором ДМСО (0,4–0,7 моль/л), со скоростью охлаждения 0,5–1,5°С/мин., инициацией кристаллообразования и 10-минутной выдержкой при температуре адаптации – 5–10°С. Этот режим был проверен многократными экспериментами при замораживании кроветворных клеток эмбриональной печени.

В эмбриональной (плодной) печени 6–12-ти недельной гестации кроме кроветворных клеток-предшественниц содержатся мезенхимальные и эндотелиальные клетки, гепатобласты. При длительном культивировании

на различных подложках и средах росли колонии стромальных клеток печени (гепатобластов, мезенхимальных и эндотелиальных клеток). Путем иммунофенотипирования было установлено, что при культивировании в бессывороточной среде вырастали колонии, состоящие из компактно собранных сферических клеток и гепатобластов. Также наблюдался рост компактных колоний, состоящих только из бластных сферических клеток. При культивировании размороженной суспензии печеночных клеток в среде ДМЕМ с 15% фетальной бычьей сыворотки были получены монослой МСК и колонии звездчатых клеток печени. Также было исследовано наличие жизнеспособных эндотелиальных клеток в препарате криоконсервированной фетальной печени человека. При посеве клеток в среду с ростовыми факторами EGF, VEGF на коллагене вырастали колонии эндотелиальных клеток с последующим образованием монослоя.

Таким образом установлено, что разработанная программа позволяет сохранить все клетки-предшественницы, содержащиеся в эмбриональной и плодной печени ранних сроков гестации.

М.О. Мавликеев, А.В. Табанакова, А.А. Трондин,
Г.О. Певнев, Г.Р. Бурганова, И.М. Газизов,
М.С. Калигин, А.А. Гумерова, А.П. Киясов

**Иммуногистохимическое исследование
мышечной ткани в норме и у пациентов
с хроническими облитерирующими
заболеваниями артерий нижних конечностей
после аутотрансплантации стволовых клеток
периферической крови**

ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский
университет», Казань, Россия
mikhail.mavlikeev@yahoo.com

M.O. Mavlikeev, A.V. Tabanakova, A.A. Trondin, G.O. Pevnev,
G.R. Burganova, I.M. Gazizov, M.S. Kaligin, A.A. Gumerova,
A.P. Kiasov

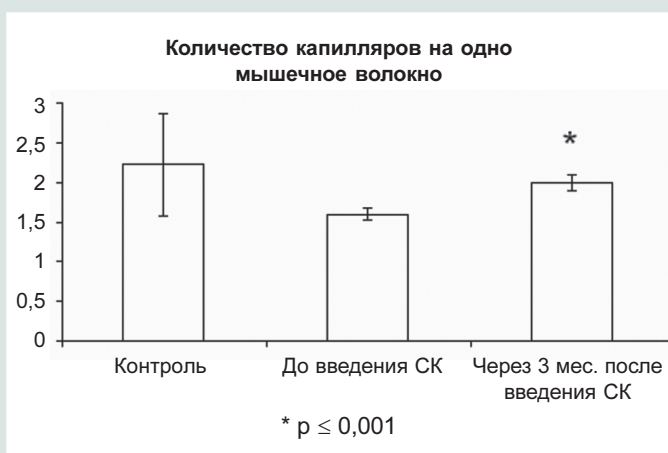
**Immunohistochemical analysis of normal skeletal
muscles and after peripheral blood stem cells
transplantation in patients with peripheral arterial
disease**

Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) характеризуются прогрессирующей ишемией тканей, устойчивой к традиционному хирургическому и консервативному лечению и ведущей к инвалидизации пациентов с высоким риском ампутации конечностей. Доклиническими исследованиями доказана высокая эффективность клеточной терапии ХОЗАНК. Целью нашего исследования было выявление морфологических изменений в мышечной ткани пациентов с ХОЗАНК до и после аутотрансплантации стволовых клеток периферической крови (СКПК) по сравнению с мышечной тканью здоровых людей. Исследование проведено в 2009–2010 гг. на базе Республиканской Клинической Больницы Минздрава Республики Татарстан и кафедры нормальной анатомии Казанского государственного медицинского университета в рамках Республиканской программы «Внедрение клеточной медицины в Республике Татарстан в 2008 году».

Материал и методы. В исследовании были использованы биопсии пациентов с ХОЗАНК и аутопсийный материал от лиц без хронической артериальной недостаточности нижних конечностей в качестве контроля. Тридцати пациентам с ХОЗАНК была произведена

внутримышечная аутоотрансплантация СКПК, мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором. Парафиновые срезы аутопсийного материала и биоптатов икроножной мышцы пораженной конечности, полученных до начала клеточной терапии и через 3 мес. после трансплантации СКПК окрашивали иммуногистохимически с антителами к маркерам эндотелия (CD31, CD34, фактор фон Виллебранда) и антителами к миогенину — маркеру активированных клеток-сателлитов. Далее производили морфометрический анализ образцов, подсчитывали число мышечных волокон и капилляров и определяли плотность капиллярной сети.

Результаты исследования. Результаты иммуногистохимического окрашивания показали рост плотности капиллярной сети на 25% (соотношение «число капилляров/число мышечных волокон» возрастает после аутоотрансплантации с $1,6 \pm 0,15$ до $2,0 \pm 0,12$; $p < 0,001$). Средняя плотность капиллярной сети мышечной ткани в аутопсийном материале составила $2,36 \pm 0,75$, $p < 0,05$ (рис.). В аутопсийном материале от лиц без признаков хронической артериальной недостаточности нижних конечностей и в биоптатах мышечной ткани до введения стволовых клеток мы наблюдали единичные клетки-сателлиты с цитоплазматическим окрашиванием миогенина, через 3 мес. после аутоотрансплантации СКПК их количество увеличивалось, появлялись клетки-сателлиты с миогенин-позитивным ядром — признаком поздней стадии дифференцировки. Также мы наблюдали слияние клеток-сателлитов с образованием мышечных трубочек и новых мышечных волокон.



Вывод: ХОЗАНК приводит к значительному снижению плотности капиллярной сети мышечной ткани, аутоотрансплантация СКПК ведет к улучшению васкуляризации ишемизированной конечности путем неогенеза, а также активации миосателлитов и формированию новых мышечных волокон, что способствует восстановлению функции ишемизированной конечности. Аутоотрансплантация СКПК является перспективным методом терапии ХОЗАНК.

В.Е. Мамонов, Н.В. Сац, И.Н. Шипунова, А.Е. Бигильдеев, Д.А. Свинарева, Н.В. Проскурина, М.М. Ряшенцев, А.Г. Чемис, Н.И. Дризе

Роль мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга в восстановлении больших костных дефектов

Учреждение Российской Академии медицинских наук
Гематологический Научный Центр РАМН,
Москва, Россия
ndrize@yandex.ru

V.E. Mamonov, N.V. Sats, I.N. Shipounova, A.E. Bigildeev, D.A. Svinareva, N.V. Proskurina, M.M. Riashtentsev, A.G. Chemis, N.I. Drize

Part of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in repair of big bone defects

Показано, что мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) способны дифференцироваться *in vitro* в клетки кости, хряща, жировой ткани. Для восстановления больших незаживающих дефектов кости используют носители из синтетических или натуральных биоматериалов. Комбинация ММСК с различными носителями может значительно улучшить восстановление больших костных повреждений. Целью данной работы было изучить дифференцировочный потенциал ММСК *in vivo*, а также эффективность регенерации кости с помощью биоматериала в комбинации с ММСК после трансплантации в место повреждения лучевой кости кролика.

Материал и методы. ММСК получали из костного мозга кроликов. Остеогенную дифференцировку ММСК индуцировали *in vitro* в течение 4 сут. (остео-ММСК). Одну десятую часть трансплантируемых ММСК трансдуцировали с помощью концентрированного (10^8 вирусных частиц/мл) LeGO вектора третьего поколения, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (EGFP), и 1/10 часть остео-ММСК — с помощью LeGO вектора, кодирующего красный флуоресцентный белок (mCherry). В область повреждения (резекция 1 см лучевой кости) имплантировали аутогенные ММСК или ММСК в комбинации с остео-ММСК, губкой ИНДОСТ (POLYSTOM) и гранулами PRODENS® (WMT). За динамикой изменений в области резекции следили в течение 52 нед. Каждые 4 нед. проводили рентгенологические исследования поврежденных конечностей. Через 6, 12, 26–29 и 52 нед. новообразованные участки кости и окружающей соединительной ткани анализировали на наличие маркированных клеток методом ПЦР, морфологию изучали на гистологических срезах.

Результаты. В течение 7 мес. не наблюдалось никаких видимых изменений в регенерации повреждения у контрольных животных, в отсутствие клеток и носителей. Имплантация только губки ИНДОСТ (POLYSTOM) и гранул PRODENS® без ММСК также не приводит к образованию костной ткани в области резекции. После трансплантации остео-ММСК с носителями в области повреждения уже через 6 нед. наблюдался остеогенез, присутствие маркированных клеток было выявлено в новообразованной костной и соединительной тканях. Не было выявлено отличий в регенерации кости между ММСК и остео-ММСК через 12 нед. Маркированные клетки в новообразованной кости выявлялись в обоих случаях. Клетки, несущие зеленый белок, обнаруживались в фасции, хрящевой и костной тканях. К этому времени формируется костная мозоль, окружающая место дефекта. Через полгода

после трансплантации смеси ММСК, маркированных зеленым белком, и остео-ММСК, маркированных красным, в новообразованных костях доминируют клетки, несущие зеленый белок. Потомки остео-ММСК выявляются в костной мозоли и в фасциях, однако их количество меньше в тысячи раз. Результаты этих экспериментов демонстрируют ограничения пролиферативного потенциала среди ММСК, подвергнутых индукции к дифференцировке, что стоит учитывать при планировании условий для использования ММСК.

Дальнейшие наблюдения в течение года после операции выявили присутствие маркированных клеток в образующихся костной и хрящевой тканях, а также в прилегающих фасциях. Полученные данные говорят о том, что:

1) комбинация ММСК с носителями способствует регенерации кости в области обширного незаживающего дефекта;

2) культивированные ММСК способны *in vivo* к соединительнотканым дифференцировкам и образуют костную, хрящевую и волокнистую соединительную ткань;

3) предварительная индукция дифференцировки ММСК снижает их пролиферативный потенциал *in vivo*;

4) введение маркерного гена не нарушает способности ММСК к пролиферации и мультипотентной дифференцировке;

5) Терминально дифференцированные потомки маркированных ММСК сохраняются в регенерировавшей ткани по крайней мере в течение года.

ММСК могут быть использованы в терапевтических целях в регенеративной медицине для заживления тяжелых костных и хрящевых повреждений. Длительное сохранение маркированных клеток в регенерате позволяет использовать ММСК для генотерапии.

Е.В. Мартынова¹, Н.Л. Блатт², М.Э. Ялвач³,
Е.В. Головин¹, О.Р. Галеев¹, В.А. Анохин¹,
А.А. Ризванов^{1,2,3}

Влияние гипотонического шока на инфицирование клеток рекомбинантным лентивирусом *in vitro*

¹ ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия

² ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия

³ Департамент генетики и биоинженерии, Университет Едиптепе, Стамбул, Турция
Martynova85@gmail.com

E.V. Martynova, N.L. Blatt, M.E. Yalvac, E.V. Golovin,
O.R. Galeev, V.A. Anokhin, A.A. Rizvanov

Effect of hypotonic stress on recombinant lentiviral transduction *in vitro*

Процесс проникновения ретровирусов в клетку-хозяина происходит по одному из двух механизмов: рН-зависимое проникновение в клетку при помощи клатрин-опосредованного эндоцитоза или рН-независимое проникновение в клетку посредством прямого взаимодействия со специфическими рецепторами на поверхности клетки с последующим слиянием мембран. Известно, что гипотоническая среда приводит к значительной активации процессов эндоцитоза. В 2009 г. Yu-Hsiang Lee и Ching-An Peng показали, что гипотоническая среда значительно повышала инфекционность MoMuLV-GFP ретровируса (экотропный вирус, содержащий геном вируса лейкемии мышей

Молони, экспрессирующий белок GFP; Ecotropic Moloney murine leukemia virus). Лентивирусы, в частности ВИЧ-1, также принадлежат к семейству Retroviridae. Представители этого рода используют связывание поверхностных гликопротеинов с рецепторами на мембране клетки, что, в свою очередь, запускает каскад механизмов, способствующих последующему слиянию внешней оболочки вируса и клеточной мембраны с высвобождением вирусного капсида в цитоплазму.

Лентивирусы — один из наиболее эффективных векторов доставки рекомбинантных генов в клетки мишени. Лентивирусы способны инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки с высокой эффективностью, а современные способы получения рекомбинантных вирусов позволяют работать с ними в стандартных лабораториях 2 уровня биологической опасности. Интеграция провируса, содержащего рекомбинантные гены, в геном клетки-хозяина приводит к перманентной генетической модификации клеток и долговременной экспрессии трансгенов. Одним из применений рекомбинантных векторов на основе лентивирусов служит генетическая модификация клеток *in vitro* для последующего использования в генно-клеточных приложениях. В связи с этим встает вопрос о повышении эффективности вирусной трансдукции *in vitro*.

Цель работы: исследование влияния гипотонической обработки клеток на эффективность инфицирования рекомбинантным лентивирусом.

Материал и методы. Работу проводили в ламинаре 2 класса биологической защиты. В качестве инфекционного агента использовали рекомбинантный лентивирус (LV-GFP), созданный на основе генома ВИЧ-1, псевдотипированный поверхностным гликопротеином вируса везикулярного стоматита G (VSV-G) и экспрессирующий зелёный флуоресцентный белок GFP. В качестве модельной культуры клеток использовали клетки человека HeLa. Клетки высевали в 24-х луночный культуральный планшет и инкубировали при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Изотоническая среда состояла из 50% культуральной среды и 50% дистиллированной воды. Эксперимент состоял из 3 групп: 1) клетки, инфицированные LV-GFP в изотонической среде (контроль); 2) клетки, прошедшие предобработку гипотонической средой и инфицированные LV-GFP в изотонической среде; 3) клетки, инфицированные LV-GFP в гипотонической среде. Подсчет процента инфицированных клеток осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson).

Результаты и обсуждение. Анализ количества GFP-позитивных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии не показал значительных различий в исследуемых экспериментальных группах. Показано, что гипотоническая среда не оказала влияния на эффективность инфицирования клеток рекомбинантным лентивирусом LV-GFP, что свидетельствует о том, что проникновение рекомбинантного лентивируса в клетку, в отличие от ретровируса MoMuLV-GFP, по-видимому, не связано с активностью процессов эндоцитоза.

Таким образом, применение гипотонических сред не повышает эффективность лентивирусной трансдукции *in vitro*.

Р.Ф. Масгутов^{1, 2, 3}, И.И. Салафутдинов^{1, 3},
Г.А. Масгутова^{1, 2}, А.П. Киясов², А.А. Ризванов^{1, 2, 3},
А.А. Богов²

Аутогенные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки из жировой ткани при лечении дефектов мягких тканей: результаты клинического исследования фазы I

¹ ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

² ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия

³ ГУЗ «Республиканская клиническая больница», Казань, Россия

masgut@gmail.com

R.F. Masgutov, I.I. Salafutdinov, G.A. Masgutova, A.P. Kiyasov, A.A. Rizvanov, A.A. Bogov

Autologous multipotent mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue in the treatment of soft tissue defects: the results of the I phase clinical investigation

Современные методы лечения дефектов мягких тканей и кожных покровов направлены на их замещение путем свободной и/или васкуляризированной кожной пластики. Но данные методы имеют ряд недостатков, таких как развитие несостоятельности кровоснабжения пересаженного лоскута и его некротизирование, отторжение трансплантата, а также трудоемкость и техническая сложность операций.

Одним из перспективных методов замещения дефектов мягких тканей и кожных покровов является использование аутогенных стволовых клеток, полученных из жировой ткани в сочетании с аутоотрансплантацией жировой ткани.

Нами отработана методика получения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) из жировой ткани и аутоотрансплантация полученных клеток в дефект мягких тканей в составе собственного жира. Получены первые клинические данные о позитивном эффекте данной методики при посттравматической кожно-рубцовой деформации голени и гемипареза лица вследствие пареза ветвей лицевого нерва. Пациентов наблюдали в динамике на протяжении 6 мес. после операции. Выявлено приживление жировой ткани в месте ее трансплантации с коррекцией мягких тканей на 75–80%.

Таким образом, мы полагаем, что способ аутоотрансплантации ММСК в составе собственного жира в значительной степени повышает приживаемость трансплантата, стимулирует его реваскуляризацию и является перспективным методом коррекции рубцов и дефектов мягких тканей и кожных покровов.

Г.А. Масгутова^{1, 2}, Р.Ф. Масгутов^{1, 2},
А.А. Ризванов^{1, 2}, Ю.А. Челышев²

Микроглия-подобные клетки, полученные в результате дифференцировки эмбриональных стволовых клеток и генетически модифицированные нейротрофическим фактором NT3, при посттравматической регенерации спинного мозга мыши

¹ ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

² ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия

galina2526@gmail.com

G.A. Masgutova, R.F. Masgutov, A.A. Rizvanov, Yu.A. Chelyshev

Embryonic stem cell derived microglia cells genetically modified with neurotrophic factor NT3 in posttraumatic regeneration of mouse spinal cord

Цель работы: оценить эффективность внутривенной трансплантации генетически модифицированных микроглия-подобных клеток, секретирующих нейротрофический фактор NT3, при повреждении спинного мозга. Клетки были получены из эмбриональных стволовых клеток линии мышей линии C57/Bl6. Животным на уровне T8 осуществляли латеральную гемисекцию спинного мозга с правой стороны. Рану ушивали послойно. Через 7 сут. после травмы животным опытной группы через хвостовую вену вводили 4 млн микроглия-подобных клеток, животным контрольной группы — PBS в том же объеме. Влияния трансплантированных клеток на регенерацию спинного мозга оценивали гистохимическими методами.

Через 35 сут. после травмы введение модифицированных геном NT3 микроглия-подобных клеток снижало количество собственных клеток микроглии в эпицентре травмы, однако при удалении в ростральном и каудальном направлениях уровень экспрессии Iba-1 приближался к уровню у интактных животных. В группе с введением PBS в области травмы наблюдали увеличение экспрессии Iba-1 по сравнению с интактным спинным мозгом, но при удалении от плоскости гемисекции количество подобных клеток значительно уменьшалось.

Через 35 сут. после гемисекции и введения PBS GFAP⁺ клетки в области травмы практически отсутствовали, отростки единичных клеток обнаруживали по периферии белого вещества и лишь на отдалении от эпицентра травмы. Противоположную картину наблюдали в спинном мозге мышей, которым были введены микроглия-подобные клетки, модифицированные геном NT3. В данной группе GFAP⁺ клетки локализовались преимущественно вокруг патологических полостей, и их количество в области повреждения было вдвое больше, чем в интактном спинном мозге.

Таким образом, мы можем заключить, что микроглия-подобные клетки, полученные из эмбриональных стволовых клеток и модифицированные геном NT3, при введении в хвостовую вену мыши через 7 сут. после травмы поддерживают выживание клеток микроглии в удаленных от места травмы участках спинного мозга и астроцитов в области травмы.

В. Миронов

Печатание органов: тканевые сфероиды как строительные блоки

Медицинский университет Северной Каролины,
Чарльстон, США

mironovv@musc.edu

V. Mironov

Organ printing: tissue spheroids as building blocks

Печатание органов может быть определено как роботизированное послойное строительство трехмерных жизнеспособных биоартифициальных тканей и органов с использованием тканевых (клеточных) сфероидов в качестве составных элементов. Получение тканеподобных сфероидов позволяет использовать известные клеточные популяции, стандартизировать состав и предсказуемые свойства. Таким образом становится возможным собирать небольшие участки внутриорганной сосудистой сети, для чего используются цельные и просветные тканевые сфероиды.

Органное печатание способно значительно расширить возможности тканевой инженерии. Кроме того, подобные технологии формируют новую парадигму развития биологии и биопротезирования

Ш. Миталипов

Плюрипотентные клетки в онтогенезе

Oregon National Primate Research Center, Oregon Stem Cell Center, Department of Obstetrics & Gynecology, Department of Molecular & Medical Genetics and Department of Pediatrics, School of Medicine, Oregon Health & Science University, Oregon, USA

mitalipo@ohsu.edu

Sh. Mitalipov

Pluripotent cells during development

Развитие млекопитающих начинается с тотипотентной зиготы — клетки, из которой развиваются все специализированные виды клеток взрослого организма. По мере развития клетки ранних эмбрионов размножаются и дифференцируются в первые 2 линии — плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы и трофобластическую дерму. Плюрипотентные клетки могут быть выделены из эмбриона, адаптированы и размножены *in vitro* с сохранением их недифференцированного состояния; они получили название эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). ЭСК сохраняют способность дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков зародыша: эктодерму, мезодерму и энтодерму или любой из более чем двухсот видов клеток взрослого организма.

Поскольку многие болезни человека развиваются в результате повреждений в одном из видов клеток, то следует рассматривать плюрипотентные стволовые клетки как неограниченный источник для заместительной терапии. Плюрипотентные клетки, напоминающие ЭСК, могут быть получены также и экспериментальным путем — методом перепрограммирования дифференцированных соматических клеток. Внесение изменений в геном соматических клеток, возможно, будет играть более важную роль в заместительной клеточной терапии, поскольку для этих целей возможно использовать аутогенный материал, что устраняет иммунологические проблемы при трансплантации.

В докладе будут обсуждаться два подхода к перепрограммированию соматических клеток: 1) перенос ядер соматических клеток и 2) прямое перепрограммирование с использованием генетических манипуляций.

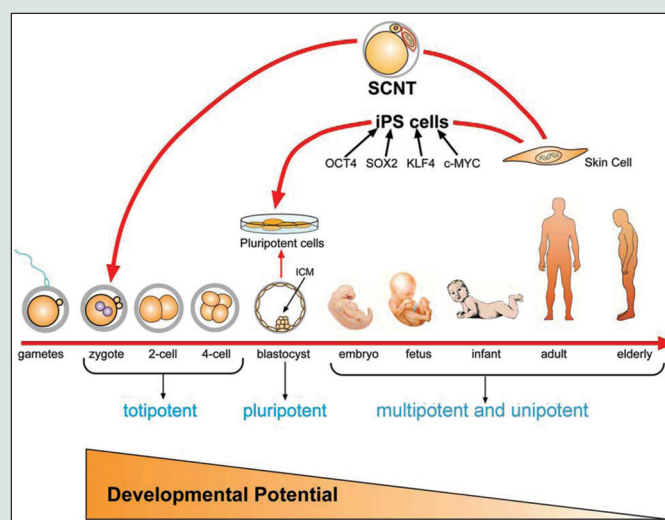


Схема развития организма и перепрограммирования соматических клеток. Онтогенез начинается с одной клетки — зиготы. Зигота и каждый бластомер раннего эмбриона тотипотентны, т.е. помимо возможности дифференцироваться во все многообразие клеток, они несут в себе потенциал к развитию в целый организм. По ходу эмбрионального этапа онтогенеза дифференцировочный потенциал отдельных бластомеров постепенно уменьшается, в результате дочерние клетки постепенно переходят в плюрипотентное состояние, затем — мульти-, унипотентные клетки, а в дальнейшем в терминально дифференцированное состояние. Однако путем перепрограммирования соматических клеток можно восстановить плюрипотентный статус клеток

В.М. Михайлов

Клеточная терапия моногенных заболеваний на примере миодистрофии мышей mdx

Группа генетики клеточных популяций

Отдела внутриклеточной сигнализации транспорта

Института цитологии РАН,

Санкт-Петербург, Россия

vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru

V.M. Mikhailov

Cell therapy of monogenic diseases by the example of myodistrofii mdx mice

Группа моногенных заболеваний включает в себя многочисленные формы патологии, обусловленные мутациями чаще всего структурных генов. Спектр заболеваний постоянно расширяется в связи с успехами молекулярной диагностики. Возможности лечения, как правило, ограничены лекарственной терапией. В настоящее время накапливаются данные об использовании как генной, так и клеточной терапии при лечении моногенных заболеваний. Клеточная терапия включает в себя как местную или общую трансплантацию стволовых клеток дикого типа, так и замену мутантных популяций стволовых клеток костного мозга на стволовые клетки дикого типа. Последний подход используется при лечении серповидно-клеточной анемии и β-талассемии. Известно, что стволовые клетки костного мозга участвуют в регенерации не только клеток гемопоэтического ряда, но также мышц и нервных клеток. Представляет интерес возможность использования замены мутантного костного мозга на костный мозг дикого типа при лечении нейромышечных заболеваний.

Одним из распространенных моногенных заболеваний такого типа является миодистрофия Дюшенна, при которой нарушен синтез белка дистрофина. На экспериментальных моделях мышей и собаках показано, что некоторые типы клеточных линий с выраженными стволовыми свойствами при местной трансплантации в аллогенных условиях оказывают на мышечные ткани значительный терапевтический эффект, оцениваемый по усилению синтеза дистрофина, снижению уровня клеточной гибели и другим признакам дифференцировки. Однако продолжительность терапевтического эффекта ограничена во времени. В наших экспериментах однократная трансплантация в сингенных условиях стволовых клеток костного мозга дикого типа усиливала синтез дистрофина через 4–6 мес. только у 2% мышечных волокон. По литературным данным синтез дистрофина также не усиливается при трансплантации мутантным мышам mdx костного мозга дикого типа после смертельного рентгеновского облучения в дозах 7 и 11 Гр. В наших экспериментах на радиационных химерах мышей mdx замена мутантного костного мозга после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр на костный мозг дикого типа через 2 мес. вызывала синтез дистрофина только у 1,2% мышечных волокон. Факт транскрипционной инертности трансплантированных стволовых клеток костного мозга, ядра которых входят в состав мышечных волокон, общепризнан. Нам удалось преодолеть транскрипционную инертность ядер трансплантированных стволовых клеток после воздействия на радиационных химер мышей mdx Ca-специфического параметрического (циклотронного) магнитного резонанса, в результате которого синтез дистрофина через 2 мес. после трансплантации был обнаружен у 16% мышечных волокон. Также было показано, что у радиационных химер мышей mdx после облучения в дозе 3 Гр трансплантация стволовых клеток костного мозга дикого типа приводит через 2 и 6 мес. к усилению синтеза дистрофина у 4 и 27% мышечных волокон соответственно. Полученные данные указывают на возможность сравнительно быстрого преодоления транскрипционной инертности трансплантированных стволовых клеток в мышцах и на перспективность дальнейшего изучения замены мутантного костного мозга на костный мозг дикого типа для лечения моногенных заболеваний тканевых систем, которые имеют предшественники — стволовые клетки — в костном мозге.

Г.В. Мкртчян¹, К.С. Десятниченко², А.А. Докторов³,
С.Г. Курдюмов², Г.А. Воложин¹

Тестирование in vitro остеопластического материала в гелевой форме

¹ МГМСУ, Москва, Россия

² НПО «ПОЛИСТОМ», Москва, Россия

³ НИЦ БМТ ГНУ ВИАП, Москва, Россия

G.V. Mkrtchyan, K.S. Desyatnichenko, A.A. Doctorov,
S.G. Kurdyumov, G.A. Volozhin

In vitro testing of a gel-formed osteoplastic material

Альтернативой имплантации остеопластического материала в виде керамики, гранул, губок, пластин в костные дефекты с целью их замещения новообразованной костью, требующей открытого хирургического доступа, может быть использование остеопластического материала в виде геля, мягкой пасты, эмульсии, которые можно вводить в костный дефект с минимальной травматизацией здоровых тканей из шприца или

аналогичного устройства. Материалом такого назначения является «ИНДОСТ-гель+», разработанный в НПО «ПОЛИСТОМ» (патент РФ № 2360663), выпускаемый там же по ТУ 9391-008-77330104-2006, разрешенный для клинического использования, который получил положительную оценку и пользуется спросом у стоматологов различных специальностей и челюстно-лицевых хирургов.

«ИНДОСТ-гель+» представляет собой композицию из ортофосфатов кальция — гидроксиапатит и трикальций фосфат — в виде гранул и нанодисперсного порошка, комплекса полипептидов, обладающих свойствами факторов роста, из ксенокости, антиоксиданта и гелеобразующей основы — линейного полимера биологического или синтетического происхождения с тиксотропными свойствами. В настоящем сообщении приводятся данные о взаимоотношениях in vitro данного материала с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК) из тканей пародонта.

Работу проводили с ММСК из губчатого вещества альвеолярного отростка челюсти и надкостницы челюсти, показавшими наилучшие показатели остеобразовательной активности и активности ЩФ. Клетки культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) («ПанЭко», РФ), 10% эмбриональной сыворотки коров («HyClone», Новая Зеландия) и 40 ед./мл гентамицина. Использовали культуральные флаконы площадью 25 см² («Corning», США), которые инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% углекислого газа в термостате (Sanyo MCO-15AC, Япония). По достижении клетками монослоя их пересекали, используя трипсин («ПанЭко», РФ) или смесь трипсин/Версен («ПанЭко», РФ) по обычной схеме. В работе использовали клетки 8–15 пассажа.

Клетки высаживали в культуральной среде в 24- или 96-луночные планшеты для культивирования клеток («Corning», США) с плотностью 1000 клеток на 1 см². На следующий день вносили в лунки «Индост-гель+». Клетки с гелевым материалом культивировали 2 и 7 сут. Производили фотографические наблюдения и на определенном сроке для определения количества клеток в лунках производили МТТ-тест, основанный на способности дегидрогеназ в живых клетках восстанавливать водорастворимый желтый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в темно синий водонерастворимый формазан, который накапливается внутри клетки. Количество образовавшегося формазана, пропорциональное числу жизнеспособных клеток, измеряли спектрофотометрически на плашечном денситометре Chameleon V (Hidex, Финляндия).

Для индукции остеогенной дифференцировки клетки высаживали в культуральной среде в 24- или 96-луночные планшеты для культивирования клеток («Corning», США) в плотности 20 000 клеток на 1 см². На следующий день уже после внесения гелевого материала клетки переводили в среду следующего состава: среда DMEM, 10% эмбриональной сыворотки коров, 50 мкМ аскорбат-2-фосфата, 10 мМ β-глицерофосфата и 0,1 мкМ дексаметазона (все реактивы Sigma, США). Среду меняли каждые 3–4 сут. В качестве маркера остеогенной дифференцировки определяли активность щелочной фосфатазы (ЩФ). Активность щелочной фосфатазы определяли на сроках от 4-го до 21-го дня с использованием реактивов набора «Щелочная фосфатаза-Ново» (В-8327, Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя.

Контролем служили клетки, культивировавшиеся без гелевого препарата. Культуру клеток наблюдали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diavert (Nikon, Япония). Фотографии делали цифровой камерой Nikon D5000. Цифровое усиление контраста проводили с помощью программы Image J. Люминесцентную микроскопию проводили с помощью микроскопа Olympus BX61 (Япония). Использовали цифровую камеру CoolSNAP (США).

В результате проведенных исследований было выяснено, что оба вида ММСК для сохранения жизнеспособности требуют доступа к культуральному пластику. При микроскопическом наблюдении в течение нескольких дней стало ясно, что оба типа клеток прикрепляются к пластику в свободных от геля местах и сохраняют нормальную структуру и жизнеспособность по МТТ-тесту. Таким образом, можно полагать, что изучаемый материал не обладает выраженной цитотоксичностью, однако клетки не в состоянии использовать его как непосредственный субстрат для роста. Со временем такие неприкрепившиеся клетки погибают от апоптоза (апоптоз от невозможности прикрепиться).

Для определения влияния гелевого материала на пролиферацию клеток сначала высаживали клетки в лунки, а затем добавляли «Индост-гель+». В этих условиях клетки достаточно хорошо росли под гелем. Их количество после недели культивирования было сходным с контролем, что позволяет утверждать об отсутствии отрицательного влияния материала на пролиферацию.

При исследовании индукции дифференцировки в культуре положительный результат был получен после исключения аскорбата из состава индуцирующей среды и снижении количества добавляемого гелевого материала. В этом случае на 21-е сут. культивирования активность ЩФ в опыте была существенно выше ($p < 0,05$), чем в контроле. Показателем стимулирования остеогенной дифференцировки было также более высокое отложение минерализованного матрикса. В тот же срок культивирования гелевый материал подвергается контракции в результате объединения клетками мелких частиц в более крупные образования с тем, чтобы компактизовать и изолировать гель. Похожее действие производят фибробласты при добавлении к ним гранул коллагена. По биологическому смыслу это действие *in vivo* направлено на очистку раны.

В.Н. Никандров, О.Н. Жук

Компоненты перичеллюлярного протеолиза в биотехнологии клеток нервной ткани

*Институт физиологии НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

V.N. Nikandrov, O.N. Juk

The components of pericellular proteolysis biotechnology in cells of nervous tissue

Обобщены результаты собственных исследований роли плазминогена и стрептокиназы в жизнедеятельности клеток нервной ткани в органотипических, диссоциированных культурах чувствительных и симпатических ганглиев, неокортекса, а также перевиваемых линий глиомы С6, нейробластомы IMR-32 и феохромоцитомы PC12.

В дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде плазминоген и стрептокиназа стимулировали жизнеспособность клеток, и в концентрации

10^{-7} – 10^{-10} М защищали клетки чувствительных, симпатических ганглиев, неокортекса и перевиваемых линий от повреждающего действия H_2O_2 (0,0001 М), NH_4Cl (0,01 М), глутамата, АТФ (0,001 М) в анионной форме и охлаждения. Даже кратковременная экспозиция (20 мин) клеток глиомы С6 или феохромоцитомы PC12 с этими белками в концентрации 10^{-9} М вела к резким изменениям перичеллюлярного или внутриклеточного АТФ- или Ca^{2+} -активируемого протеолиза. В присутствии изучаемых белков активировались биосинтетические процессы в клетках нервной ткани, изменялась их энзиматическая активность.

Исследуемые белки в ряде случаев ускоряли созревание культур ткани, улучшали адгезивность, обеспечивали высокую жизнеспособность, увеличивали количество отростков и их арборизацию. Электронная микроскопия выявила характер структурных перестроек клеток нервной ткани, отражающих нейротрофические свойства плазминогена или стрептокиназы. Стрептокиназа способна регулировать водно-электролитный баланс клетки.

Обсуждается значение полученной совокупности результатов в фундаментальном и прикладном аспектах, включая проблемы биотехнологии нервной ткани.

А.В. Новицкая, А.А. Смикодуб, М.П. Демчук,
И.В. Архипенко

Фетальные стволовые клетки в лечении метаболического синдрома

*Центр эмбриональных тканей «ЭмСелл»
Киев, Украина*

infocenter@emcell.com

A.V. Novytska, A.A. Smikodub, M.P. Demchuk, I.V. Arkhipenko

Fetal Stem Cells in Metabolic Syndrome

Под наблюдением находились 12 пациентов (7 мужчин и 5 женщин, средний возраст $58,0 \pm 6,3$ лет) с клиническими проявлениями метаболического синдрома. У всех пациентов была гипертония I-II степени, нарушения углеводного обмена: нарушение толерантности к глюкозе — 8 пациентов и сахарный диабет (СД) 2 типа легкой степени (утренняя гипергликемия, аглюкозурия) с гиперинсулинемией и повышением уровня С-пептида ($4,7 \pm 1,6$ нг/мл) у 3-х пациентов. У всех пациентов имели место нарушения липидного обмена: повышение уровня холестерина, триглицеридов, повышенная концентрация липопротеидов низкой плотности (ЛНП), липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП), снижение концентрации липопротеидов высокой плотности (ЛВП) и абдоминальное ожирение (ИМТ — $30,8 \pm 1,6$ кг/м²), обхват талии — $94,8 \pm 2,3$, М-105, $7 \pm 2,9$ см).

Всем пациентам проведена трансплантация фетальных гемопоэтических и негемопоэтических стволовых клеток (СК) мезенхимального и эндодермального происхождения, полученных из ростковых зон внутренних органов трупов фетусов человека 4–8 нед. гестации.

После введения пациенты наблюдались на протяжении 1–5 лет. Через 1–2 мес. после трансплантации отмечали постепенное снижение артериального давления с дальнейшей его стабилизацией в течение последующих 2–3 месяцев — 135–140/80–90 мм рт. ст. на фоне снижения дозы гипотензивных препаратов у 83% пациентов. Тест на толерантность к глюкозе, проведенный через 7–9 мес. после лечения, показал улучшение углеводного обмена у пациентов с нару-

шением толерантности к глюкозе (уровень гликемии через 2 ч после употребления глюкозы составил $7,2 \pm 0,3$ ммоль/л). Через 2–3 мес. после лечения начиналось снижение утренних показателей сахара крови у пациентов с СД 2 типа, нормализация наступала через 5–7 мес. В течение 2–3 мес. после введения СК постепенно снижалась концентрация С-пептида, а его нормализация наступала через 6–9 мес. Нормализация липидного профиля отмечалась через 9–12 мес. после лечения у 75% пациентов на фоне снижения показателей триглицеридов, холестерина, ЛНП, ЛОНП и ЛВП.

Работы проводились с соблюдением международных норм биоэтики, в соответствии с Законом Украины «О трансплантации органов и других анатомических материалов человека» № 1007 – XIV от 16.07.1999 г.

М.М. Одинак, Г.Н. Бисага, А.В. Новицкий,
В.В. Тыренко, Д.Г. Полынцев, П.В. Кругляков,
А.А. Билибина, М.С. Фоминых, А.Д. Соболев

Клиническая эффективность аутогенной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при рассеянном склерозе и боковом амиотрофическом склерозе

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова,
Санкт-Петербург, Россия
bisaga@yandex.ru

M.M. Odinak, G.N. Bisaga, A.V. Novitsky, V.V. Tyrenko,
D.G. Polintsev, P.V. Krugljakov, A.A. Bilibina, M.S. Fominykh,
A.D. Sobolev

Clinical efficacy of autologous multipotent mesenchymal stem cells transplantation in multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis

Трансплантация стволовых клеток признана наиболее перспективным направлением терапии прогрессирующих и дегенеративных заболеваний центральной нервной системы.

Обследовано 12 пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (БАС; 5 женщин, 7 мужчин, возраст 41–63 года, длительность заболевания 18–57 мес., степень тяжести 32–20 баллов шкалы ALSSS) и 8 пациентов с рассеянным склерозом (РС; 3 женщины, 5 мужчин, возраст 24–47 лет, длительность заболевания 4–14 лет, тип течения – 3 с рецидивирующе-ремиттирующим, 3 с вторично-прогрессирующим, 1 с прогрессирующе-ремиттирующим, 1 с первично-прогрессирующим, степень тяжести 3,5–6,5 баллов шкалы EDSS). Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) были получены из красного костного мозга этих пациентов. Рост ММСК, иммунофенотип и кариотип, стерильность, отсутствие примеси гемопоэтических клеток, хромосомных aberrаций и признаков старения контролировали в процессе выращивания.

Обратное введение ММСК проводили в соответствии с разработанным протоколом путем короткой внутривенной инфузии в дозе $2,0 \times 10^6$ /кг массы тела, кратностью 1 раз в 30 сут. Длительность терапии составляла от 1 до 22 мес.

Повторные внутривенные трансфузии ММСК все больные перенесли хорошо, какие-либо значимые побочные эффекты как в раннем, так и в отдаленном периоде терапии не выявлены. Легкий побочный эффект в виде невысокой транзиторной гипертермии в течение 8–10 часов наблюдали у 2 пациентов после

одного из введений; умеренная головная боль в течение 3–4 ч отмечена у 2 пациентов с БАС; повышение общей утомляемости в течение 2 сут. после каждого введения наблюдали у 2 пациентов с РС.

У 6 больных с БАС в процессе лечения отмечали стабилизацию состояния, отсутствие прогрессирования и регресс отдельных симптомов заболевания в течение 4–10 мес. В последующем эффективность лечения снижалась, несмотря на продолжение лечения, и общее состояние и неврологический статус постепенно вновь начинали ухудшаться. У остальных 6 пациентов с БАС эффект от лечения отсутствовал с самого начала.

Выбор пациентов с РС по этическим аспектам осуществляли с учетом эффективности предшествующей терапии: 6 пациентов были резистентны ко всем (или большинству) видам терапии, обычно применяемой при РС (препараты ПИРС (копаксон, бетаферон), кортикостероиды, плазмаферез). У 2 пациентов была отмечена невосприимчивость ко всем видам лечения, включая эскалацию терапии с проведением высокодозной иммуносупрессивной терапии с последующей аутотрансплантацией стволовых кровяных клеток. Положительный ответ на лечение ММСК у высокорезистентных к лечению больных с РС наблюдали в 4 из 6 случаев. В целом у 6 из 8 больных с РС наблюдали улучшение состояния с снижением степени тяжести РС на 0,5–1,0 балла по шкале EDSS.

Полученные результаты свидетельствуют о безопасности разработанного протокола лечения и значимой клинической эффективности данного варианта клеточной терапии (в 50% у больных БАС и 75% у больных РС) у некурабельных или труднокурабельных больных с БАС и РС, что позволяет рассчитывать на продолжение исследования и включение в него новых пациентов.

Г.В. Павлова, А.В. Ревущин

Влияние трансгенных нейротрофических факторов на развитие нейральной ткани

ГУ Институт биологии гена РАН,
Москва, Россия

G. Pavlova, A. Revishchin

Influence of neurotrophic factors transfected into Drosophila cells on the development of mammalian neural tissue

Исследованы возможности использования эмбриональных нервных клеток, экспрессирующих трансгенные нейротрофические факторы, для управления дифференцировкой и развитием нервной ткани млекопитающих. Для этой цели проводили эксперименты по сокультивированию эмбриональных спинальных ганглиев крысы с трансгенными эмбриональными клетками дрозофилы, в геном которых введены гены нейротрофических факторов: NGF – фактора роста нервов, GDNF – глия производного нейротрофического фактора, BDNF – мозг-производного нейротрофического фактора. Наблюдали направленное прорастание волокон из спинального ганглия к трансгенной ткани, которое начиналось уже через 1–2 ч кокультивации. Показано, что присутствие трансгенных нейротрофических факторов NGF, GDNF и BDNF стимулирует прорастание отростков нервных клеток спинальных ганглиев.

В экспериментах по исследованию влияния гиперэкспрессии нейротрофических факторов на образование

глиального рубца клетки линии HEK-293, трансфицированные конструкцией, содержащей ген *gdnf*, трансплантировали взрослым мышам линии СВА. Иммуногистохимическая окраска срезов мозга мышей, проживших после трансплантации 18 сут., на белковые маркеры рубцовой ткани, показала, что присутствие трансгенного *gdnf* в трансплантированных клетках уменьшает глиальную посттравматическую реакцию окружающей трансплантат ткани мозга. Результаты подтверждают перспективность применения GDNF в качестве нейропротектора в тканевой терапии.

Для успешного применения перечисленных выше трансгенов в генной и клеточной терапии необходимо иметь конструкции с управляемой экспрессией трансгенного продукта. Полученная нами конструкция, содержащая промотор гена белка теплового шока дрозофилы (*hsp70*) и репортерный ген синего флуоресцентного белка (СФБ) под тем же промотором, была введена в геном эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мышей. Трансформированные клетки обнаруживали выраженное голубое свечение только после предварительного температурного шока, полученного прогреванием культуры ЭСК при 39°C в течение 30 мин.

Таким образом, показана возможность использования промоторов дрозофилы для регуляции экспрессии в клетках млекопитающих чужеродных генов, полезных при лечении различных, в частности, нейродегенеративных, заболеваний.

А.Ю. Петренко ^{1, 2}, Ю.А. Петренко ^{1, 2}, А.И. Правдюк ¹,
С.П. Мазур ^{1, 2}, Р.В. Иванов ³, Ю.В. Степаненко ³,
В.И. Лозинский ³, В.И. Грищенко ^{1, 2}

**Пролиферация и дифференцировка
мультипотентных мезенхимальных стромальных
клеток при культивировании в альгинатных
микрокапсулах и широкопористых губках**

¹ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ,
Харьков, Украина

² Межведомственный научный центр криобиологии
и криомедицины, Харьков, Украина

³ Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова, РАН, Москва, Россия
alexander_petrenko@cryo.org.ua

A.Yu. Petrenko, Yu.A. Petrenko, A.I. Pravduk, S.P. Mazur,
R.V. Ivanov, Yu.V. Stepanenko, V.I. Lozinsky, V.I. Grischenko

**Proliferation and differentiation of multipotent
mesenchymal stromal cells in culture within alginate
microbeads and wide pore sponges**

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) характеризуются мультилинейным дифференцировочным потенциалом, что определяет перспективу их применения в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Монослойное культивирование является классическим подходом для изучения клеток, в том числе и ММСК. Однако в этой системе клеткам доступно только двухмерное пространство, тогда как в естественных условиях они имеют трехмерную архитектуру.

Целью работы явилось изучение пролиферации и дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека при монослойном и объемном культивировании в составе альгинатных микрокапсул и широкопористых криогелевых губок.

ММСК выделяли из костного мозга взрослого человека в соответствии с этическими нормами. После экспансии в монослойной культуре иммунофенотип

клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии. Для инкапсуляции ММСК смешивали с раствором альгината натрия и распыляли в раствор, содержащий ионы кальция. После гелеобразования получали микрокапсулы размером 500–1000 мкм с иммобилизованными клетками. Широкопористые губки изготавливали из альгината методом криоструктурирования. Модификацию адгезивных свойств носителя проводили ковалентным присоединением к поверхности пор желатина типа А. Пролиферацию и метаболическую активность определяли Alamar Blue тестом. Дифференцировку осуществляли добавкой соответствующих индуцирующих факторов в среду культивирования, продукты дифференцировки определяли биохимическими и гистологическими методами.

Цитофлуориметрические исследования показали, что клетки, изолированные из костного мозга взрослого человека, после 4-го пассажа имели иммунофенотип, характерный для ММСК (CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻). В ходе последующего монослойного культивирования в среде экспансии клетки активно пролиферировали, а в присутствии соответствующих индуцирующих факторов ММСК дифференцировались в остеогенном и адипогенном направлениях. После инкапсуляции в альгинатные микрокапсулы ММСК не распластывались, сохраняя сферическую форму, и практически не пролиферировали при последующем культивировании в среде экспансии. Вместе с тем, альгинат-инкапсулированные ММСК сохраняли жизнеспособность, метаболическую активность и способность к индуцированной дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Остановка пролиферации ММСК в альгинатных микрокапсулах может быть обусловлена потерей ориентации клеток в гомогенном полужидком окружении или низкими адгезивными свойствами альгината. Для выяснения этого вопроса ММСК культивировали в широкопористых губках на основе альгината. При заселении таких губок ММСК вели себя так же, как при инкапсуляции в микросферы – не адгезировались к их поверхности, что сопровождалось потерей способности к пролиферации. Прямое введение желатина в концентрациях от 0,125% до 0,5% в альгинатный носитель не обеспечивало адгезию и пролиферацию ММСК. Модификация альгинатных губок путем ковалентной сшивки желатиновых наночастиц к поверхности пор увеличивала адгезивные свойства носителя. В ходе последующего культивирования в широкопористых альгинатных губках с модифицированной желатином поверхностью пор ММСК пролиферировали и мигрировали, занимая весь объем носителя. Изучение дифференцировочных возможностей показало, что ММСК в составе вышеуказанных губок способны дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях.

Выводы:

1. ММСК в составе альгинатных микрокапсул или широкопористых губок не способны к пролиферации в результате низких адгезивных свойств альгината.

2. Модификация альгинатного носителя путем химического присоединения якорных частиц желатина к поверхности пор сопровождается адгезией клеток и их пролиферацией.

3. Для индуцированной дифференцировки ММСК в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях не требуется столь прочный контакт с поверхностью как для пролиферации; дифференцировочный

потенциал клеток реализуется при культивировании в составе как адгезивных, так и неадгезивных носителей на основе альгината.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта РФФИ и ГФФИ Украины (проект № 09-04-90403-Укр_ф_а).

А.Г. Попандопуло

Лечение рефрактерной стенокардии с использованием аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

*Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака АМН Украины, Донецк, Украина
Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, Украина
pag.lctc@male.ru*

A.G. Popandopulo

Treatment of refractory angina pectoralis with the use of autologous multipotent mesenchymal stromal cells

Несмотря на использование медикаментозной терапии и методов прямой реваскуляризации миокарда при ишемической болезни сердца (ИБС), проблема рефрактерной стенокардии остается актуальной. У большого количества пациентов на фоне лечения сохраняются симптомы заболевания, высок процент инвалидизации.

Цель работы — изучить эффективность применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (аутоММСК) костного мозга с учетом путей доставки у больных с рефрактерной стенокардией.

Материал и методы. В исследование включено 48 пациентов с рефрактерной стенокардией (45 мужчин и 3 женщины) в возрасте от 46 до 68 лет (средний возраст $53,7 \pm 1,62$) с функциональным классом стенокардии II–IV. Всем выполнено катетерное электро-механическое картирование левого желудочка (ЛЖ) с помощью системы Noga XR, при котором выявлены обширные зоны гибернированного миокарда и рубцовые поля после перенесенных инфарктов. Оценивалось количество приступов стенокардии в сутки, частота госпитализаций, развитие инфарктов миокарда, летальность, качество жизни с использованием Миннесотского опросника а также контрольные картирования ЛЖ в сроки 6 и 12 мес.

Пациенты разделены на 4 группы. Пациентам I группы сразу после завершения процесса картирования ЛЖ были выполнены инъекции аутоММСК с применением системы навигации NOGA XR (8–10 инъекций) — 11 пациентов. Во II группе осуществлено в/в введение — 13 больных. В III группе — интракоронарное введение — 14 пациентов. Пациентам IV группы производилось интрамиокардиальное введение физиологического раствора при выполнении катетерной навигации NOGA XR в количестве и по объему раствора аналогичного в группе I.

Результаты. Период наблюдения составил 6–18 мес. Госпитализаций с острым коронарным синдромом или нарастанием сердечной недостаточности не было. При контроле у 32 пациентов выявлена положительная динамика (66,8%). В группе I отмечено улучшение качества жизни по Миннесотскому опроснику на 13–38 баллов, в группе II — на 24–45 баллов, в группе III — на 26–39, в группе IV — положительной динамики не отмечено. Количество приступов стенокардии умень-

шилось с 2–8 в сут. до 1–2 у пациентов первых трех групп. В четвертой группе у 20% пациентов отмечена отрицательная динамика. При ЭхоКГ увеличилась фракция выброса левого желудочка на 5–10% и уменьшилось КДО ЛЖ на 30–50 мл (до 10–12% от исходного объема) при интрамиокардиальном введении, на 3–8% и 20–46 мл соответственно при внутривенном введении, на 6–9% и 25–50 мл при интракоронарном введении. В IV группе эти показатели улучшились только у 1 пациента, в 70% остались на прежнем уровне, а у 2 больных зарегистрировано уменьшение ФВ и КДО. При контрольном картировании ЛЖ в первой группе у 9 (91%), во второй группе — у 10 (76,9%), в третьей группе у 11 (78,6%) отмечена положительная динамика. При этом зона гибернированного миокарда значительно уменьшилась или исчезла. На вольтажной униполярной карте увеличилась амплитуда электрограммы, что является свидетельством увеличения массы живого миокарда, на механической карте увеличилась амплитуда движения сегмента. При интрамиокардиальном введении — более выраженная динамика — преимущественно исчезновение зон гибернации в зонах инъекций. В то же время отрицательная динамика в связи с основным заболеванием отмечена нами у 20% четвертой группы. Неудовлетворительный результат у пациентов второй и третьей групп зарегистрирован в 7,7 и 7,1% соответственно. Отрицательной электро-механической динамики у пациентов первой группы нами не выявлено.

Таким образом, введение аутоММСК является безопасным и может быть использовано в практической медицине. Введение аутоММСК путем интрамиокардиальных инъекций более эффективно, чем внутрисосудистое (системное и регионарное) введение. Внутривенный и интракоронарный пути введения сопоставимы по своей эффективности. Механическая травма при интрамиокардиальном введении не имеет существенного влияния на течение основного заболевания.

В.Е. Рябинин

Состояние, возможности и перспективы развития клеточных технологий: региональные аспекты*

*Лаборатория «Искусственные органы и клетки» ЮУНЦ РАМН, Челябинск, Россия
ООО «Центр Клеточных Технологий при Областной Клинической Больнице», Челябинск, Россия
veryabinin@mail.ru*

V.E. Ryabinin

State, opportunities and perspectives of development of cell-based technologies: regional aspects

В докладе обсуждаются вопросы, касающиеся состояния и перспектив регионального развития клеточных технологий. Подчеркивается актуальность поддержки научных исследований в области биомедицинских технологий со стороны государственных структур, частных предприятий, инвесторов и венчурных фондов. Продемонстрированы конкретные примеры такого взаимодействия и проанализированы причины возможной их недостаточной эффективности. Приведена информация о развитии клеточных технологий в Уральском федеральном округе. Показана возможность продвижения новых биомедицинских технологий в регионах за счет бюджетных средств в рамках существующих

* Статья опубликована полностью в рубрике «Оригинальные исследования».

областных целевых программ (приоритетных направлений) и их коммерческой реализации путем создания малых предприятий и (или) частно-государственного партнерства с помощью целевых программ по развитию инновационной деятельности.

А.Б. Селькина, В.И. Шепитько, Г.А. Ерошенко,
О.Д. Лисаченко

Влияние трансплантации криоконсервированной плаценты на местный иммунный статус слизистой оболочки полости рта

ВГУЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», Полтава, Украина
gala_umsa@mail.ru

A.B. Sel'kina, V.I. Shepitko, G.A. Yeroshenko, O.D. Lisachenko

Influence of kryopreserved placenta transplantation on the oral cavity mucosa's local immune status

Местные защитные реакции в слизистой оболочке полости рта обеспечиваются иммунокомпетентными клетками как в составе эпителиальной пластинки (клетки Лангерганса, макрофаги, лимфоциты), так и в собственной пластинке (макрофаги, лимфоциты, плазматические клетки, тканевые базофилы). Изменение их количества и соотношения дает представление о напряженности местного защитного барьера.

Целью работы было определение клеточного состава «иммуноцитов» в собственной пластинке слизистой оболочки дорсальной поверхности языка (ДПЯ) крыс после трансплантации криоконсервированной плаценты (ККП).

Исследование выполнено на 30 крысах линии Вистар, 5 из которых составили контрольную группу, а 25 одноразово провели трансплантацию ККП объемом 0,125 см³ под кожу на плече. Выведение животных из эксперимента осуществляли на 2, 7, 14, 21 и 30 сут. Фрагменты слизистой оболочки ДПЯ заключали в эпон-812 по общепринятой методике, изготавливали полутонкие срезы, которые окрашивали полихромным красителем. Количество макрофагов, лимфоцитов, плазматических и тканевых базофилов определяли методом стандартных площадей в 10 полях зрения. Статистическую обработку полученных цифровых данных провели при помощи программы Excel.

У животных контрольной группы в собственной пластинке ДПЯ определялись лимфоциты (0,9±0,23 в п/з), макрофаги (1,0±0,29 в п/з), плазматические клетки (0,4±0,22 в п/з) и тканевые базофилы (1,2±0,29 в п/з).

На 2-е сут. после трансплантации ККП количество всех изученных клеток, особенно макрофагов (в 6 раз) и плазматических (в 9 раз) статистические достоверно увеличилось, что может служить морфологическим подтверждением формирования иммунного ответа в слизистой оболочке языка в ответ на введение плацентарной ткани. Количество лимфоцитов и тканевых базофилов увеличилось втрое (до 3,2±0,21 и 3,2±0,18 в п/з соответственно (p≤0,05)).

На 7-е сут. эксперимента количество лимфоцитов соответствовало показателям в контрольной группе животных. Нормализация количества тканевых базофилов определялась до 14 сут. наблюдения. К 21 сут. эксперимента количество всех изученных клеток не отличалось от значений в контрольной группе.

Таким образом, трансплантация ККП вызывает изменение количества и соотношения «иммуноцитов» в собственной пластинке ДПЯ. Однако наличие в ККП

биологически активных веществ способствует быстрой реализации иммунного ответа и восстановлению морфофункционального состояния слизистой оболочки ДПЯ до 14 сут. наблюдения.

С.А. Сергеев¹, Н.В. Кошелева^{1, 2}, И.Н. Сабурова²,
М.Л. Семенова¹

Оптимизация результатов трансплантации клеток в сетчатку, поврежденную лазерным излучением на модели эксплантационной культуры

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт общей патологии и патофизиологии РАН, Москва, Россия

embryossa@gmail.com

S.A. Sergeev, N.V. Kosheleva, I.N. Saburina, M.L. Semenova

Cells transplantation results optimization using the explantation retina culture model damaged by laser emission

Применение клеточных технологий, а именно, трансплантация нейрональных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) и клеток пигментного эпителия (ПЭ), в современной офтальмологии дало возможность восстанавливать утраченное зрение после необратимых повреждений сетчатки. Однако полученные как в клинике, так и в эксперименте данные наблюдения за репарацией дефектов сетчатки после клеточной трансплантации часто носят противоречивый характер и не позволяют добиться желаемого результата. Остается бесспорной решающая роль нового микроокружения на судьбу трансплантированных клеток, однако наглядно продемонстрировать зависимость активности участия введенных в организм клеток от места и способа инъекции удается при сравнении экспериментов *in vivo* и *in vitro* с применением модели органотипического эксплантационного культивирования.

Нами были предложены модели трансплантации GFP⁺ НСПК 4-го пассажа и клеток ПЭ 6-го пассажа мышей линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)/Osb/J в эксплантационную культуру сетчатки (37°C, 5% CO₂, DMEM/F12, + глутамин, + dFGF и EGF (10 нг/мл), B27, N2 и 10% Fetal clone) и их инъекции интравитриально (10 000 кл./2 мкл), ретробульбарно (300 000 кл./10 мкл) и супрахориоидально (300 000 кл./2 мкл) крысам линии *Campbell* в возрасте 14 сут. с последующим иммуногистохимическим анализом экспрессии β-III-тубулина и GFAP.

После трансплантации *in vivo* на основании ЭРГ установлено, что клетки ПЭ как при интравитриальной, так и при ретробульбарной трансплантации через 4 и 6 сут. оказывают слабopоложительное влияние на функциональное состояние сетчатки крыс *Campbell* возраста 25 сут. и позволяет сохранить функциональную активность сетчатки у крыс до 36 сут. Статистически достоверно увеличивается толщина ONL у опытных животных возраста 27 и 43 сут. При супрахориоидальной трансплантации клеток ПЭ отмечено выраженное стабилизирующее влияние трансплантации на процессы дегенерации, развивающиеся в ONL у крыс *Campbell* и сохранение высокого уровня функциональной активности сетчатки. При супрахориоидальной трансплантации НСПК функциональная активность сетчатки животных была в 3 раза ниже, чем при аналогичной трансплантации клеток ПЭ, несмотря на статистически неразличимые морфологические данные толщины ONL.

При супрахориоидальной инъекции НСПК попадали в новое микроокружение, в то время как клетки ПЭ занимали свойственное им расположение над слоем нейросетчатки.

Аналогичные результаты были получены и при нанесении агрегатов НСПК и ПЭ на поверхность эксплантата сетчатки. НСПК оставались в составе агрегата на протяжении всего времени эксперимента (14 сут.) и оставались негативными к маркерам нейральной и глиальной дифференцировки. Для ПЭ была характерна активная миграция, начинающаяся уже через 10 мин после нанесения на эксплантат, и пролиферация, приводящая к покрытию всего эксплантата сетчатки клетками ПЭ к 3-м сут. сокультивирования.

Противоположные результаты оценки клеточной миграции и пролиферации были получены при инъекции НСПК и ПЭ непосредственно в нейросетчатку — в среднюю зону края разрастания эксплантата. Клетки ПЭ оставались неподвижными и слабо пролиферировали на протяжении всего времени сокультивирования, в то время как НСПК активно мигрировали по направлению к зоне повреждения, начиная с первых минут после инъекции, образовывали длинные филоподиальные и нейритоподобные отростки, по которым шло передвижение тел нейронов и соседних нейрональных клеток к области дефекта. Перемещение НСПК и их потомков в составе эксплантата сетчатки происходило наиболее активно в первые сут. после трансплантации, GFP⁺ клетки детектировали через сут. в зоне повреждения, удаленной от места инъекции на 100 мкм, через 3-е сут. на 1000 мкм и через 7 сут. в области повреждения, находящейся на расстоянии 3000 мкм от зоны инъекции. Инъецированные в нейросетчатку НСПК образовывали длинные разветвленные нейриты, взаимодействующие как с другими GFP⁺ клетками донора, так и с нейронами сетчатки реципиента. Начиная с 3-х сут. после трансплантации, они имели все морфологические признаки биполярных и мультиполярных нейронов и экспрессировали β-III-тубулин.

Таким образом, при помощи модели эксплантационной культуры развивающейся нейросетчатки, поврежденной лазерным излучением, удалось показать решающую роль способа введения клеток на дальнейшую судьбу трансплантата и эффективность репарации повреждений сетчатки, проследить миграцию, дифференцировку и взаимодействие индивидуальных клеток донора и реципиента на различных сроках после инъекции. Полученные данные подтверждают экспериментальными наблюдениями *in vivo*, что позволяет не только говорить об адекватности используемой модели эксплантационного культивирования, но и оптимизировать имеющиеся протоколы трансплантации НСПК и ПЭ в клинике.

Работа выполнена при реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Е.И. Слынько, И.В. Прудников

Результаты применения стволовых клеток костного мозга при травматических повреждениях спинного мозга

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова»
АМН Украины, Киев

Институт физиологии им. акад. А.А. Богомольца,
Киев, Украина

E.I. Slynko, I.V. Prudnikov

The results of using bone marrow stem cells to cure spinal cord traumas

Данное исследование проведено с целью изучить эффективность метода трансплантации стволовых клеток костного мозга при травме спинного мозга в отдаленном периоде.

Материал и методы. За период с 2005 по 2010 г. у 16 больных применен метод трансплантации стволовых клеток костного мозга. У всех больных были травматические повреждения позвонков и спинного мозга грудного отдела. У всех больных на момент операции отмечена нижняя параплегия, анестезия ниже уровня повреждения, рефлекторная функция тазовых органов — полный функциональный перерыв мозга. Срок от момента травмы до оперативного вмешательства варьировал от 6 мес. до 27 мес. Перед операцией всем больным проводилась рентгенография и МРТ-графия интересующего отдела. В послеоперационном периоде МРТ-графия выполнялась через 1–3 мес. Всем 16 больным выполнены трансплантации стволовых клеток костного мозга с помощью оперативных вмешательств. Случаи, где операции дополнялись декомпрессией мозга, стабилизацией, менингиолизом исключены из данного исследования.

Результаты. Применяли методику открытой хирургической трансплантации стволовых нейрогенных клеток в зону повреждения спинного мозга. Использовали стволовые клетки, выделенные из костного мозга больного и культивированные в течение 2–3 мес. Клетки пересаживали в фибриновом клее в качестве матрикса, приготовленном из крови самого больного. При наличии интрамедуллярной кисты вследствие миеломалии проводили миелотомию по REZ зоне (зона входа задних корешков). Кисту аспирировали, полость наполняли стволовыми нейрогенными клетками в фибриновом клее, спинной мозг ушивали за пияльную оболочку. При отсутствии кисты миеломалии проводили миелотомию в зоне наибольшего повреждения мозга по данным МРТ-графии. Микропинцетом волокна проводящих путей разводили в стороны, в центральные отделы проводили трансплантацию, мозг ушивали за пияльную оболочку. Для трансплантации использовали 2–4 млн стволовых нейрогенных клеток.

Отдаленные результаты оценивали через 10–12 мес. после операции. У 15 больных отмечено снижение уровня чувствительных расстройств на 1–3 сегмента. У 5 больных появились императивные позывы к мочеиспусканию. У 9 больных появилось ощущение тепла в нижних конечностях. Эти изменения не специфические, связанные отчасти со вскрытием интрамедуллярной кисты, внутренней декомпрессией спинного мозга.

Отдаленные результаты прослежены от 2 до 4 лет у 9 больных. У 4 больных отмечено дополнительное снижение уровня сенсорных нарушений на 1–2 сегмента, у 2 больных появились элементы глубокой чувствительности в нижних конечностях, у 3 больных отмечено

появление ощущения тепла в нижних конечностях, у 8 уменьшилась спастика. Ни у одного из больных не отмечено регресса проводниковых нарушений движений и поверхностной чувствительности.

При МРТ исследовании в отдаленном периоде у 11 больных обнаружена коллабиравшая внутримозговая полость, МР зона трансплантации. У 5 больных МРТ позволила констатировать только зону ушиба спинного мозга.

Таким образом трансплантация стволовых клеток при повреждениях спинного мозга — метод, который требует дальнейшей разработки и клинической оценки. На сегодняшний день показана его некоторая эффективность в отдаленном периоде травмы спинного мозга. Результаты трансплантации лучше у больных с неполным функциональным повреждением спинного мозга.

А.А. Старченко, Д.А. Зинланд, Е.Н. Третьякова,
О.В. Тарасова, М.Ю. Фуркалюк, С.А. Комарец,
И.Н. Курило, Е.Ю. Гончарова, М.Д. Гуженко

**Менеджмент качества медицинской помощи
и обоснованность риска при использовании
клеточных технологий в системе обязательного
медицинского страхования**

*Общественный совет по защите прав пациентов
при Росздравнадзоре, Москва, Россия
Росгосстрах-Медицина, Москва, Россия
ГУЗ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия
medadvokat1@mail.ru*

A.A. Starchenko, D.A. Zinland, E.N. Tretjakova, O.V. Tarasova,
M.J. Furkaljuk, S.A. Komarets, I.N. Kurilo, E.Ju. Goncharova,
M.D. Guzhenko

**Quality management of medical aid and validity
of risk at use of cellular technologies in system
of obligatory medical insurance**

Цель: информировать медицинскую общественность о правилах менеджмента качества медицинской помощи и обоснованности риска при использовании клеточных технологий в системе обязательного медицинского страхования.

Предусмотренная Законом «О медицинском страховании граждан в РФ» обязанность выполнения экспертизы качества медицинской помощи, включает применение финансовых санкций к учреждению здравоохранения при выявлении дефектов организации и оказания медицинской помощи с использованием клеточных технологий. К ним относятся нижеперечисленные дефекты.

1. Отсутствие лицензии на вид деятельности «применение клеточных технологий», уст. постановлением Правительства РФ от 22.01.07 г. № 30.

2. Отсутствие разрешения Росздравнадзора на использование конкретной клеточной технологии (приказ МЗ и СР РФ от 20.07.07 г. № 488). В соответствии с Основами законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан (статья 43) в практике здравоохранения возможно использовать только разрешенные к применению методы профилактики, диагностики и лечения. Государственный Реестр новых медицинских технологий является официальным документом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, представляет собой аннотированный перечень утвержденных, зарегистрированных и разре-

шенных к применению в медицинской практике способов профилактики, диагностики, лечения и методов организационной формы работы.

3. Несоответствие использования клеточных технологий требованиям приказа МЗ и СР РФ от 25.05.07 г. № 357/40: — перечню тканей человека — объектов трансплантации; — перечню учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию тканей человека; — перечню учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку тканей человека.

4. Неисполнение требований инструкций, утвержденных приказом Минздрава России от 25.07.03 г. № 325 «О развитии клеточных технологий в РФ».

5. Неисполнение требований приказа МЗ и СР РФ от 20.07.07 г. № 488 «Об утверждении административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по выдаче разрешений на применение новых медицинских технологий»:

5.1. Неинформирование пациента о применении новой медицинской клеточной технологии — впервые предлагаемые к использованию на территории РФ или усовершенствованные совокупности методов (приемов, способов) лечения, диагностики, профилактики, реабилитации, средств, с помощью которых данные методы осуществляются, а в некоторых случаях и способ получения средства, применяемого в данной технологии.

5.2. Нарушение требования: «Методы и средства, применяемые в новых медицинских технологиях, могут включать в себя использование лекарственных средств и изделий медицинского назначения при условии, что они зарегистрированы в установленном порядке в РФ и используются в строгом соответствии с утвержденными при регистрации инструкциями по медицинскому применению. Использование в новых медицинских технологиях зарегистрированных в РФ лекарственных средств и (или) изделий медицинского назначения с отклонениями от инструкций по медицинскому применению не допускается».

5.3. Неинформирование пациентов о том, что медицинские технологии, связанные с использованием клеточных технологий и генных манипуляций отнесены к медицинским технологиям с высокой степенью риска: «1.5. ...классификация в зависимости от степени потенциального риска применения в медицинских целях по трем классам: — класс 3 — медицинские технологии с высокой степенью риска, включающий в себя медицинские технологии, оказывающие прямое (хирургическое) воздействие на органы и ткани организма; пластические реконструктивные операции; медицинские технологии, связанные с использованием клеточных технологий и генных манипуляций, трансплантации органов и тканей».

6. Нарушение требований о безопасности клеточных технологий — наличие необоснованного риска медицинского вмешательства; выполнение в отсутствие показаний и не в соответствии с имеющимся заболеванием; выполнение без учета противопоказаний к вмешательству.

Признаки необоснованного риска использовании клеточных технологий:

1) цель может быть достигнута без риска;

2) риск развития ятрогенного осложнения больше, чем риск неблагоприятного исхода без применения данного метода;

3) наступление вредных последствий вмешательства неизбежно;

4) не использованы без положительного результата все менее опасные методы лечения;

5) врач не предвидит возможные осложнения применяемого метода и не предпринимает мер для их предотвращения, своевременного выявления и лечения;

6) нарушены требования инструкции по применению лекарственных средств и изделий медицинского назначения;

7) отсутствует согласие пациента на применение рискованных медицинских действий на основе клеточных технологий.

Т. Стелзер

Модифицированные поверхности для повышения эффективности культивирования адгезирующихся и неадгезирующихся клеток в интересах 3D-тканевой инженерии

Thermo Fisher Scientific, Германия

Th. Stelzer

Novel Surfaces for Improved Cultivation of Adherent and Non-adherent Cells with Examples from Stem Cell Culture and 3D Tissue Engineering

Commercial Product Manager Europe and Emerging Markets Cell Culture, Filtration & IVF

Thermo Scientific Nunc & Nalgene Brand Products

Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Germany

Thomas.stelzer@thermofisher.com

The presentation will give an overview of established and novel technologies to modify cultureware surfaces used in mammalian cell culture.

Cell harvesting using enzymatic digestion, such as trypsinization, results in degradation of cell surface proteins and extracellular matrix deposited by the cells. These proteins are important for the interactions between the cell and the environment. The Thermo Scientific Nunc™ UpCell™ Surface is designed to enable quick dissociation of cells from the culture surface upon a change in temperature. Depending on the degree of confluence of the culture, single cells or cell sheets can be harvested from the UpCell Surface. Examples from stem cell culture, as well as from 3D tissue engineering will be shown.

The unique feature of the new Thermo Scientific Nunc™ HydroCell™ surface is its ultra low cell binding capacity used for non-adherent cluster culture such as neural and embryonic stem cells.

А.М. Суббот, А.И. Антохин, А.С. Павлюк

Механизмы клеточной терапии эндотелиальных поражений роговицы

НИИ глазных болезней РАМН, ГОУ ВПО РГМУ, Москва, Россия

kletkagb@gmail.com

A.M. Subbot, A.I. Antokhin, A.S. Pavlyuk

The mechanisms of cellular therapy of the cornea endothelial destruction

Клеточная терапия в офтальмологии остается терапией выбора при тяжелых поражениях, когда существующие «классические» методы лечения себя исчерпали или оказались недостаточно эффективными.

В НИИ глазных болезней РАМН был предложен и с успехом используется метод лечения больных с различными поражениями тканей переднего отдела глаза,

основанный на введении непосредственно в зону патологического процесса аутогенных лейкоцитов пациента, активированных *in vitro*.

Герпетические поражения роговицы наряду с буллезной кератопатией показали высокую эффективность на данную клеточную терапию.

Цель исследования: выявить механизмы терапевтической эффективности данной клеточной терапии.

Материал и методы. Содержание цитокинов в клеточном препарате определялось с использованием методов иммуноферментного анализа, фенотипирования клеточного состава — при помощи проточной цитометрии.

Результаты. Показано высокое содержание в клеточном препарате различных цитокинов и факторов роста. Охарактеризован клеточный состав.

Выводы. По-видимому, высокая терапевтическая эффективность такого вида клеточной терапии обусловлена совместным применением в этом методе аутосыворотки, насыщенной цитокинами и факторами роста и клеточной фракции, обуславливающей пролонгированное высвобождение этих биологически активных веществ *in vivo*, и осуществляющей контактное взаимодействие с элементами тканевой ниши, что обеспечивает максимальное приближение состава полученного лечебного препарата к физиологическим жидкостям организма, обеспечивающим регенерацию, и сводит к минимуму возможность побочных реакций и непереносимости лечения.

А.А. Титова, Д.И. Андреева, М.А. Титова, М.С. Калигин

Источник и развитие СК19⁺ клеток в эндокринной части поджелудочной железы человека

ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия
mfkaligin@mail.ru

A.A. Titova, D.I. Andreeva, A.M. Titova, M.S. Kaligin

Source and development of CK19⁺ cells in the endocrine part of the human pancreas

В настоящее время обсуждается возможность использования в качестве маркера стволовых/прогениторных клеток инсулоцитов поджелудочной железы цитокератина 19 (СК19). В связи с этим мы решили выяснить, имеется ли динамика экспрессии СК19 в ходе пренатального и постнатального развития островков поджелудочной железы и как связана экспрессия СК19 с дифференцировкой инсулоцитов.

Цель данного исследования — изучить экспрессию СК19 в клетках поджелудочной железы человека в ходе онтогенеза.

Материал и методы. Исследование было проведено на поджелудочной железе эмбрионов и плодов человека (8–15 нед. гестации), полученных в результате легальных медицинских аборт, а также на аутопсийном материале поджелудочной железы человека различных возрастов. Материал фиксировали и заливали в парафин по стандартной методике, далее окрашивали иммуногистохимическим стрептавидин-биотиновым методом с использованием коммерческих моноклональных антител к СК19.

Результаты. На сроке 8 нед. гестации была обнаружена экспрессия СК19 в клетках эпителия протоков поджелудочной железы. В мезенхиме органа на этом

сроке клеток, экспрессирующих СК19 не обнаружено. На сроке 11,5 нед. гестации СК19 экспрессировали все клетки островков Лангерганса. С 15-й нед. гестации количество СК19⁺ клеток в островках уменьшалось. А в постнатальном периоде в островках присутствовали лишь единичные СК19⁺ клетки.

В ходе исследования мы установили, что в процессе развития поджелудочной железы количество СК19⁺ клеток в островках Лангерганса уменьшается. Это уменьшение мы связываем с дифференцировкой СК19⁺ клеток в островках. Кроме того, мы еще раз подтвердили, что клетки островков поджелудочной железы развиваются из протокового эпителия.

И.А. Хлусов^{1,4}, Н.В. Рязанцева^{1,5}, О.Е. Чечина^{1,5},
Е.В. Сазонова¹, А.К. Биктасова¹, Н.М. Шевцова¹,
М.Ю. Хлусова¹, Ю.П. Шаркеев², В.Ф. Пичугин³,
Е.В. Легостаева², К.В. Зайцев⁴, Н.В. Литвяков⁴,
К.А. Нечаев⁴, М.В. Дворниченко⁴, Е.Н. Больбасов⁴,
Т.В. Саприна^{1,4}, Н.Ю. Захарова⁴

**Моделирование реакции стромальных
стволовых клеток и мононуклеаров крови
на имплантаты как основа для прогноза
клинической эффективности инженерии
костной ткани**

¹ Сибирский государственный медицинский университет,
Томск, Россия

² Институт физики прочности и материаловедения СО РАН,
Томск, Россия

³ НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия»
при ТПУ и СибГМУ, Томск, Россия

⁴ Томский филиал РНЦ ВТО им. акад. Г.А. Илизарова
Росмедтехнологий, Томск, Россия

⁵ НОЦ молекулярной медицины СибГМУ Росздрава,
Томск, Россия

khlusov63@mail.ru

I.A. Khlusov, N.V. Ryazantseva, O.E. Chechina, E.V. Sazonova,
A.K. Biktasova, N.M. Shevtsova, M.Yu. Khlusova,
Yu.P. Sharkeev, V.F. Pichugin, E.V. Legostaeva,
K.V. Zaytsev, N.V. Litvyakov, K.A. Nechaev, M.V. Dvornichenko,
E.N. Bolbasov, T.V. Saprina, N.Yu. Zaharova

**Modelling of stromal stem cells and blood mononuclear
leukocytes reaction to implants as a base of clinical
efficacy prognosis of bone tissue engineering**

Цели исследования: 1) изучение *in vitro* секреции цитокинов, процессов апоптоза и продукции активных форм кислорода (АФК) в клеточных культурах, топографии и некоторых параметров искусственных микротерриторий, способствующих дифференцировке ММСК в остеогенном направлении при контакте с имплантатами с кальцийфосфатными (КФ) покрытиями; 2) оценка *in vitro* связи морфофункциональных и молекулярно-генетических параметров культуры мононуклеаров крови с клиническими вариантами несовершенного остеогенеза (НО), сроками реабилитационного периода (клиническим эффектом терапии), возможностью прогнозирования степени воспалительного (остеолитического) ответа.

Материал и методы. Применяли подложки из наноструктурного титана с двусторонними КФ покрытиями, на которые наносили культуру пренатальных фибробластоподобных клеток легкого (источник ММСК) или мононуклеаров периферической крови здоровых добровольцев или пациентов с НО, полученных центрифугированием на градиенте плотности 1,077 г/см³ Ficoll-Paque. Культивирование мононуклеаров крови больных НО осуществляли на титановых дисках с дву-

сторонними композитными КФ и полимерными (тефлоновыми) покрытиями. Концентрацию молекулярных маркеров в супернатантах определяли с помощью наборов для ИФА. Морфологию окрашенных клеток на поверхности имплантатов исследовали с помощью растровой электронной и оптической микроскопии в отраженном свете.

Результаты. Согласно секреторной активности культуры клеток (остеокальцин, щелочная фосфатаза), ММСК, напрямую взаимодействующие с КФ дисками, получают преимущество в проявлении остеобластоподобной функциональной активности, по сравнению с культурой клеток на пластике. КФ шероховатые поверхности стимулируют формирование 3D-культуры фибробластоподобных клеток человека. Клетки, позитивно окрашивающиеся на кислую фосфатазу, располагаются на сферолитах, клетки, воспринимающие щелочную фосфатазу (ЩФ, маркер остеобластов), заселяют углубления («ниши») искусственной поверхности. При этом «ниша» для индукции остеогенной дифференцировки ММСК человека является, по-видимому, структурно-функциональным понятием, выражающимся в соотношении площади окраски клеток на ЩФ к площади занимаемой ею территории.

Тестируемые материалы обладают хорошей биосовместимостью на клеточно-молекулярном уровне, поскольку не вызывают увеличения апоптоза мононуклеаров крови и концентраций внутриклеточных АФК. Секреторная активность культуры стромальных клеток не зависела от шероховатости (Ra) КФ покрытий. В то же время, выявлена тесная связь Ra с секрецией мононуклеарами крови TNF α ($r = -0,80$; $p = 0,01$; $n = 9$), IL-2 ($r = 0,69$; $p = 0,04$; $n = 9$) и IL-4 ($r = 0,83$; $p = 0,006$; $n = 9$).

В периферической крови у больных НО циркулирует значительное количество клеток, проявляющих при культивировании в остеогенной среде на пластике фибробластоподобную морфологию, окраску на кислую фосфатазу, выраженную активность в отношении образования CrossLaps по мере нарастания клинической тяжести заболевания. Материал имплантата является триггером индивидуальных молекулярных процессов, связанных с соотношением остеолитических (CrossLaps) и остеобластических (остеокальцин) реакций, характерных для костного ремоделирования. При контакте *in vitro* мононуклеаров больных НО с композитными материалами экспрессия гена *RANTES* может оказаться эффективной в развитии методов прогнозирования степени воспалительного (остеолитического) ответа, тогда как экспрессия гена *CCR5* — репаративного ремоделирования костной ткани в ответ на клиническое применение различных имплантатов.

Выводы. 1. Клетками, регулирующими процессы приживления/отторжения имплантатов с разной шероховатостью, являются, в первую очередь, мононуклеары крови.

2. При контакте с искусственной поверхностью ММСК активно проявляют остеобластный фенотип при наличии структурно-функциональных единиц (искусственных остеогенных микротерриторий).

3. Выявленные изменения параметров культуры мононуклеарных клеток крови могут рассматриваться как вероятные маркеры и предикторы тяжести НО и сроков реабилитационного периода пациентов.

Исследование выполнено при поддержке ФЦП (госконтракт 02.512.11.2285 от 10.03.2009), грантов РФФИ № 09-04-00287а и № 09-04-99105-р_офи.

С.С. Целуйко, Н.П. Красавина, М.М. Горбунов

Стволовые клетки трахеи крыс при длительных холодовых воздействиях

ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия», Благовещенск, Россия
agma.agma@yandex.ru

S.S. Tseluyko, N.P. Krasavina, M.M. Gorbunov

Stems cells of the trachea of rats at the long cold influences

Цель исследования. В доступной нам литературе отсутствуют данные о состоянии стволовых клеток и «нишах», окружающих их в слизистой оболочке трахеи крыс, при холодовом воздействии, на фоне выраженного окислительного стресса, что и определило цель нашего исследования.

Материал и методы исследования. Работа выполнена на беспородных белых крысах. Возраст молодых половозрелых крыс, включенных в исследование, составил 3–4 мес., вес — в пределах 150,0–180,0 г.

Обосновывая выбранный нами температурный режим (-15°C) и экспозицию холодового воздействия (3 ч ежедневно с 8.00 до 11.00) мы исходили из того, что сильный холод вызывает изменения, соответствующие по морфологическим критериям острому и хроническому холодовому стрессу. Общее охлаждение осуществлялось в климатической камере (тип 3101, «Ika», Германия) по 3 ч ежедневно, в течение 10 и 30 сут. Трахеи крыс подвергались морфологическому исследованию на уровне световых и полутонких срезов. Материал экспериментальных исследований исследовали для трансмиссионной микроскопии (электронный микроскоп Tecnaï G2 Spirit TWIN, Голландия) по методу Coalson, Winteret et al. (1986). Для выявления камбиальных клеток воздухоносного отдела легких, претерпевающих эпидермоидную дифференцировку, мы применили антитела на «Cadherin-E» RB-9214-R, фирмы «Lab Vision» и набор реактивов фирмы «Хема» для иммуногистохимического окрашивания срезов тканей. Для ультрагистохимического выявления щелочной фосфатазы использовали модифицированный метод Гомори.

Результаты. Холодовой стресс изменяет процентное соотношение клеток однослойного многоядного реснитчатого эпителия в различных отделах трахеи при охлаждении организма в различные сроки. В краниальном отделе количество стволовых клеток при охлаждении изменяется незначительно, хотя имеет тенденцию к снижению. Число промежуточных клеток резко уменьшается при длительных сроках охлаждения. При анализе процентного состава элементов эпителия был отмечен более низкий уровень дифференцировки в каудальном отделе трахеи. Здесь число базальных и промежуточных клеток сохраняется на значительно более высоком уровне, чем в краниальном. Важно отметить, что дифференцировка эпителия краниального отдела трахеи в эксперименте направлена в сторону увеличения процента бокаловидных клеток, тогда как в каудальном отделе отмечается некоторый рост реснитчатых клеток.

По мере увеличения срока действия холодового фактора в составе эпителия трахеи появляются очаги метаплазии. Вначале подобные изменения выявляются в каудальном отделе, а в дальнейшем и в краниальном, что можно расценить как нарушение дифференцировки стволовых клеток в результате действия холода

в период регенераторной пролиферации. Эпителиальные клетки слизистой оболочки трахеи имеют двойной потенциал, который заключается в том, что они могут претерпевать эпидермальную дифференциацию и все же сохраняют способность вырабатывать мукоидные вещества. Эпидермальная дифференциация является типичной реакцией трахеобронхиального эпителия на холодовое воздействие. Для выявления стволовых клеток воздухоносного отдела легких, претерпевающих эпидермоидную дифференцировку, мы исследовали Е-кадгерин. Выраженная потеря экспрессии Е-кадгерина или ее снижение наблюдается при холодовом воздействии, что связано с низким уровнем дифференцировки камбиальных клеток трахеи. Полученные нами результаты исследований роли Е-кадгерина при эпидермальной дифференциации на фоне охлаждения определяют дальнейшее изучение комплекса Е-кадгерин/катенин, как возможного биомаркера стволовых клеток при холодовых воздействиях. Электронно-микроскопическое выявление типичного маркера плюрипотентных незрелых клеток — щелочной фосфатазы — при холодовых воздействиях показало изменение ее распределения. Количество гранул конечного продукта на щелочную фосфатазу уменьшается в клеточных мембранах стволовых клеток и в утолщенной базальной мембране. Характерно нарастание активности щелочной фосфатазы в тучных клетках, часть из которых мигрирует в эпителий трахеи. Этот механизм является универсальным и обеспечивает регуляцию регенерации функционально отживших эпителиальных клеток. Остается неясным, что же влияет на повышение миграционной активности тучных клеток в условиях холодового воздействия.

Выводы. Длительное холодовое воздействие на слизистую оболочку трахеи снижает скорость дифференцировки клеточных элементов и изменяет взаимосвязи с клеточным окружением стволовых клеток (нишей). При использовании клеточных маркеров стволовых клеток (Е-кадгерина и щелочной фосфатазы) показано, что важным клеточным элементом «ниши», влияющим на дифференцировку стволовых клеток, являются тучные клетки, мигрирующие при холодовых воздействиях в эпителий.

Повышение миграции тучных клеток при холодовом воздействии в данном случае связано с передачей информационного воздействия на стволовые клетки через жидкую среду, которая уменьшает количество малодифференцированных клеток в эпителии.

В.А. Шаблій¹, Г.С. Лобынцева², М.Д. Кучма²,
Д.В. Лобынцев²

Получение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из криоконсервированной ткани плаценты

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

² ООО «Институт клеточной терапии», Киев, Украина

V.A. Shabliy, G.S. Lobyntseva, M.D. Kuchma, D.V. Lobyntsev
Isolation of mesenchymal stem cells from a placenta cryoconserved tissue

Для криоконсервирования ворсинчатой ткани плаценты применяли два вида криопротекторов: 1,5 и 0,7 М ДМСО; 1,5 ДМСО + 0,1 М сахараза и 1,5 М пропандиол. Тканевый материал замораживали в криоампулах (4,5 мл) по ступенчатой программе, в каждом варианте корректируя точку сидинга.

Целью исследования было подобрать криопротектор и режим, при котором после размораживания сохраняется морфологическая структура ткани и жизнеспособность клеток. Показателем жизнеспособности служила пролиферация МСК при культивировании, а ткань исследовали на гистологических срезах.

Плаценту размораживали в водяной бане +40°C до 0°C, постепенно добавляли раствор Хэнкса, снижая концентрацию криопротектора в 3 раза, переносили в 0,1% раствор коллагеназы и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Клетки выделяли на фиколле (1,077 г/л), отмывали в PBS, и сажали $1 \times 10^6/\text{см}^2$ в среду DMEM + 10% FBS на культуральный пластик, смену среды проводили каждые 3 сут.

При гистологическом исследовании особых нарушений структуры размороженной ткани не обнаружено, только при использовании пропандиола отмечена повышенная дегидратация ядер. В дальнейшем для криоконсервирования применяли программу с 0,7 М ДМСО.

При культивировании на 5–8 сут. появлялись колонии фибробластоподобных клеток, которые на протяжении 10–15 сут. образовывали монослой. При достижении 80% конфлюэнтного состояния клетки снимали раствором 0,25% трипсина с ЭДТА и проводили фенотипирование. Клетки имели фенотип МСК: CD105⁺, CD90⁺, CD73⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD14⁺. Культуру вели в течение 6 пассажей и замораживали.

Таким образом, метод криоконсервирования под защитой 0,7 М ДМСО позволяет сохранить ворсинчатую ткань плаценты и выделить из нее МСК. Возможность использования их в клинической практике требует более детального изучения.

А.К. Шафигуллина, А.А. Трондин, А.Р. Шайхутдинова,
М.С. Калигин, И.М. Газизов, А.А. Гумерова,
А.П. Киясов

Влияние растворимых факторов, вырабатываемых перисинусоидальными клетками печени, на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга крысы

ГОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет», Казань, Россия
sh.aygul@gmail.com

A.K. Shafigullina, A.A. Trondin, A.R. Shaihutdinova,
M.S. Kaligin, I.M. Gazizov, A.A. Gumerova, A.P. Kiyasov

Study of the influence of Hepatic Perisinusoidal Cells paracrine secretion on culture of Bone Marrow-derived mesenchymal stem cells

Перисинусоидальные клетки печени (ПКП) — популяция клеток, обладающая различными свойствами — накапливать витамин А, трансформироваться под воздействием неблагоприятных факторов в миофибробласты и продуцировать коллаген, являясь при этом источником соединительной ткани при фиброгенезе печени. В то же время, было высказано предположение, что ПКП, благодаря секреции факторов роста и прямых межклеточных контактов, создают микроокружение, необходимое для дифференцировки прогениторных клеток в гепатоциты.

Цель исследования: изучить влияние растворимых факторов, вырабатываемых перисинусоидальными клетками печени на мезенхимальные стволовые клетки костного мозга крысы в условиях *in vitro*.

Материал и методы: перисинусоидальные клетки печени были выделены методом коллагеназно-пропазовой перфузии печени крысы с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга крысы были выделены путем селективной адгезии к пластику. Далее было проведено культивирование ММСК клеток на среде ПКП. В качестве контроля ММСК культивировали в питательной среде DMEM (Sigma, США) с 10% содержанием бычьей сыворотки и 100 Ед/мл пенициллина — 100 мкг/мл стрептомицина. Морфологические признаки клеток оценивали методами фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Фенотипические признаки выделенных клеток изучали методами иммуноцитохимического анализа и ПЦР в реальном времени.

Результаты. Из первичной культуры ММСК и ПКП была выделена мРНК для последующего анализа экспрессии генов СК19 и V-CAM. Согласно данным РТ-ПЦР экспрессия мРНК СК19 отсутствовала в культуре ММСК и была отмечена в культуре ПКП. По данным ПЦР в реальном времени экспрессия мРНК V-CAM в культуре ПКП была в 100 раз выше, чем в культуре ММСК.

На 2-е сут. культивирования ММСК в среде ПКП было отмечено изменение их морфологии — уменьшение размеров клеток и укорочение их отростков, в то время как в контроле они были вытянутой веретенообразной формы. На 5-е сут. культивирования ММСК в среде клеток ПКП было отмечено повышение пролиферативной активности ММСК по сравнению с контролем. Изменений со стороны экспрессии маркеров мезенхимальных клеток (виментин, десмин, α -ГМА) и C-kit не было.

На 21-е сутки культивирования ММСК в среде ПКП было отмечено появление экспрессии эпителиальных маркеров СК18, СК19. На 28-е сут. экспрессия СК18 и СК19 была и в контрольной группе клеток, что свидетельствует о спонтанной эпителиальной дифференцировке клеток. В опытной культуре клеток на 28-е сут. было выявлено наличие экспрессии ESA, Bcl-2 и C-met и экспрессия маркеров гепатобластов/гепатоцитов HSA и α -FP, что свидетельствует о возможности гепатоцитарной дифференцировки ММСК. В контрольной группе экспрессии данных маркеров не было.

Выводы. В ходе экспериментов по изучению паракринных влияний со стороны ПКП на ММСК были выявлены повышение уровня их пролиферации, изменения морфологии и фенотипа ММСК. Появление экспрессии эпителиальных маркеров ESA, СК18 и СК19 и гепатоцитарных маркеров HSA и α -FP свидетельствует о способности ММСК к гепатоцитарной дифференцировке при паракринной регуляции со стороны ПКП. Полученные данные подтверждают гипотезу о роли ПКП в создании микроокружения для прогениторных клеток и их влиянии на дифференцировку данных клеток в гепатоциты.

Ю.А. Швед^{1, 2}, М.И. Блинова¹, А.Ю. Билибин²,
Г.П. Пинаев¹

**Создание клеточного продукта на основе
клеток кожи человека – кератиноцитов
и биodeградируемой полимерной плёнки**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

ulychka@mail.ru

Yu. A. Shved, M. I. Blinova, A. Yu. Bilibin, G. P. Pinaev

**Engineering a cell-based product from human
skin cells – keratinocytes – and a biodegradable
polymeric film**

Проблема восстановления повреждённых тканей и органов является перспективным направлением современной регенеративной медицины. Одним из приоритетных направлений регенеративной медицины является восстановление структурной целостности кожных покровов, повреждённых в результате ожогов, трофических язв и воздействий другого рода. Для этой цели выращенный *in vitro* клеточный пласт эпителиальных клеток – кератиноцитов, должен быть перенесён на поражённый участок кожи. Однако для отделения клеточного пласта от поверхности культурального сосуда, необходима обработка протеолитическими ферментами. Такая обработка приводит к частичному повреждению рецепторов, находящихся на поверхности клеток. Полимерные матрицы, позволяющие культивировать на них кератиноциты человека с образованием многослойного клеточного пласта, при совместном переносе их в область повреждения, позволят исключить процедуру обработки клеток, выращиваемых по известным технологиям, протеолитическими ферментами и ускорить процесс заживления ран.

Цель исследования – разработка биodeградируемой полимерной матрицы, предназначенной для культивирования клеток кожи человека с целью их трансплантации на повреждённый участок кожи.

В процессе исследования были решены следующие задачи: отработаны условия формирования полимерных плёнок для свободного доступа к клеткам питательных веществ и отвода продуктов метаболизма и определена скорость их деградации в условиях культивирования клеток и после имплантации в организм лабораторных животных. Разработаны методы модификации поверхности полимерных плёнок и подобраны оптимальные условия для культивирования клеток кожи на этих плёнках.

В.И. Шепитько, Е.С. Якушко

**Влияние трансплантации криоконсервированной
плаценты на течение экспериментального
неврита зрительного нерва**

Высшее государственное учебное заведение Украины
«Украинская медицинская стоматологическая академия»,
Полтава, Украина

svi_umsa@mail.ru, alyasv@yahoo.com

V. I. Shepit'ko, Ye. S. Yakushko

**The influence of cryopreserved placenta transplantation
on the flow of optic nerve's experimental neuritis**

Исследования последних лет показали, что криоконсервированные препараты плаценты при их трансплантации выступают в роле естественных стимуляторов защитных сил организма, оказывают иммунокорриги-

рующее, радиопротекторное, противоопухолевое, противовоспалительное действие. В то же время, механизм противовоспалительного эффекта криоконсервированной плаценты изучен недостаточно.

Целью нашего исследования было изучение влияния трансплантации криоконсервированной плаценты на морфофункциональное состояние зрительного нерва крыс при остром асептическом неврите в отдаленные сроки эксперимента.

Экспериментальная работа проведена на 60 половозрелых крысах линии «Вистар». Материалом для исследования служила ретробульбарная часть зрительного нерва крыс. Животные были распределены по трем группам: 1 группа – контрольная (20 крыс), во 2-й группе – животным (20 крысам) однократно внутривентриально был введен л-каррагинан (5 мг в 1 мл физиологического раствора), в 3-й группе (20 крыс) – на фоне вызванного асептического воспаления однократно подочно трансплантирована криоконсервированная плацента размерами 0,5×0,5×0,5 см. Выведение животных из эксперимента было произведено путем передозировки наркоза на 10, 14, 21 и 30-е сут. эксперимента. Материал обрабатывали по общепринятой методике, принятой в электронной микроскопии. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим, полихромным красителем и изучали в световом микроскопе.

На 10-е сут. у животных 3-й экспериментальной группы наблюдали постепенное восстановление морфологических структур зрительного нерва, в отличие от 2-й группы. Было отмечено восстановление микроскопического строения оболочек зрительного нерва. Диаметры артериол и капилляров в них не отличались от группы контроля. Венулы были еще немного расширены. Значения толщины соединительнотканых септ внутри нерва статистически не отличались от контроля. Нервные волокна на поперечных срезах были округлой формы, покрыты миелиновой оболочкой, их средний диаметр соответствовал диаметру нервных волокон группы контроля. Объем ядер клеток макроглии и ядерно-цитоплазматическое отношение были меньше по сравнению с контролем, но достоверно больше, чем в группе животных с асептическим воспалением, что говорит о более раннем восстановлении функций клеток.

14 сут. характеризовались дальнейшим возобновлением структуры сосудисто-стромального и паренхиматозного компонентов зрительного нерва крыс 3-й экспериментальной группы. В этот период в зрительном нерве животных 2-й группы наблюдались изменения подобные таковым в 3-й группе на 10-е сут. эксперимента.

На 30-е сут. мы наблюдали практически полное восстановление морфологической структуры зрительного нерва животных, которым на фоне асептического неврита была трансплантирована криоконсервированная плацента. Во 2-й группе после экспериментального неврита восстановились мозговые оболочки, микроциркуляторное русло зрительного нерва. Нервные волокна были неправильной формы, меньшего по сравнению с контролем диаметра. Ядра клеток макроглии имели меньший, чем в контроле, объем и ядерно-цитоплазматическое отношение.

Таким образом, при трансплантации криоконсервированной плаценты зрительный нерв крыс после экспериментального неврита восстанавливался практически полностью. Морфофункциональных изменений в нервных волокнах и клетках макроглии не наблюдалось.

Е. И. Шишацкая, Т.Г. Волова

**Полигидроксиалканоаты как матрикс
в клеточных технологиях**

Институт биофизики СО РАН,
Красноярск, Россия
shishatskaya@inbox.ru

E.I. Schischatskaya, T.G. Volova

**Polihidroxyalkanoates as a scaffolds
in cell technologies**

Необходимость адекватного носителя для клеток для реализации стратегий тканевой инженерии не вызывает сомнений. Материалами для создания таких носителей могут быть металлы, натуральные и синтетические кальций-фосфаты, керамики, полимеры, а так же их различные композиции. Особенности строения стромы каждой воспроизводимой ткани или органа диктуют свои требования к материалу, из которого готовится такой каркас — строма — «scaffold». Физико-механические свойства сырья должны позволять обрабатывать его определенным образом и получать конструкции с заданной геометрией, эластичностью, гибкостью, прочностью и др. Полимерные материалы благодаря своим свойствам занимают здесь заслуженное место. Однако полимеры, претендующие на роль искусственного внеклеточного матрикса, обязаны соответствовать ему и по биологическим свойствам — быть биосовместимыми, и в идеале, биodeградируемыми — что бы по прошествии необходимого периода времени уступить место новообразованным живым тканям.

Для этой цели мы изучили возможность использования полигидроксиалканоатов (ПГА) — линейных полиэфиров микробного происхождения, российского производства, имеющих торговую марку «БИОПЛАСТ-ТОТАН» — аналогов зарубежных Biopol®, Biopol™, Mirel™, TefhaFLEX™, DegraPol/btc®, Nodax™. Это новый класс термостабильных, механически прочных, биосовместимых и биорезорбируемых полиэфиров.

Материал и методы. Исследованы образцы ПГА, полученные в Институте биофизики СО РАН. Полимеры синтезированы бактериями *Ralstonia eutropha* B5786. Исследованы полимер β-гидроксимасляной кислоты (полигидроксибутират, ПГБ) молекулярная масса 340 кДа, кристалличность 72%, температура плавления 170°C и сополимеры полигидроксибутирата и полигидроксивалерата (ПГВ) с включением ПГВ 5–30 мол%, молекулярная масса 120–240 кДа, кристалличность 56–64%, температура плавления 152–160°C. Химическую структуру образцов и наличие микропримесей определяли после предварительного метанолиза проб по метиловым эфирам ЖК на хромато-масс-спектрометре GCD plus (Hewlett Packard, США). Плоские пленочные матриксы получали методом полива раствора полимеров. Пористые пленки (мембраны) получали с использованием техники выщелачивания. Ультратонкие волокна получены методом электростатического формования, с источником постоянного высокого напряжения до 30 кВ. Определяли толщину и поверхностные характеристики пленок. Объемные плотные и пористые матриксы конструировали из собственно ПГА и в композиции с другими материалами, прямым холодным прессованием под давлением до 127,2 кгс/см², коллагеновой губки пропитывали полимерными растворами. Микроструктуру всех матриксов анализировали с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Оценку биосовместимости разработанных конструкций проводили с использованием стандарта ИСО 10 993. Цитотоксичность исследовали в фибробластах мыши NIH 3T3, первичных культурах гепатоцитов и эндотелиоцитах печени мыши, а также культуре остеобластоподобных клеток, полученных ведением ММСК костного мозга крыс в остеогенной среде. Оценивали морфологию клеток, их жизнеспособность, пролиферативную активность по тесту-MTT (Sigma, США) и по включению меченого радионуклидами предшественника синтеза ДНК, ³H-тимидина. Для изучения пригодности матрикса для костной ткани проведены тесты с остеобластоподобными клетками *in vitro* и эксперименты *in vivo* с использованием объемных матриксов из ПГБ, ПГБ/ГАП, ПГБ/коллаген, засеянных остеобластоподобными клетками. После 10 сут. культивирования проводили MMT-тест и определяли активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в реакции с пара-нитрофенолфосфатом. В тесте сегментарной остеотомии с заполнением дефектов имплантатами разных типов, изготовленных из ПГБ, композита ПГБ-80%/гидроксиапатит-20%, и ПГБ с рекомбинантным костным морфогенетическим белком человека (rhBMP-2, ProSpec-Tany TechnoGene Ltd, Израиль). Состояние тканей оценивали при окрашивании препаратов гематоксилином и эозином, проводили морфометрию с применением поляризационного микроскопа проходящего света Axioskop 40 Pol. (Karl Zeiss) с AxioCam MRc-5. В качестве материалов сравнения использовали коммерческие композит «гидроксиапатит/коллаген» и препарат аллокости.

Результаты. Исследования полученных матриксов в виде пленок и мембран показало, что они обладают высокой биосовместимостью по отношению к культивируемым клеткам. Фибробласты мыши линии NIH 3T3 хорошо адгезировались к поверхности полимерных матриксов из ПГБ и сополимеров. Количество клеток, адгезированных на поверхности матриксов после стерилизации, также было сопоставимо с контролем (стекло, полистерин). Морфология культивируемых клеток не отличалась от таковой в контроле. Оценка жизнеспособности клеток по прижизненному окрашиванию трипановым синим показала, что 99,8±0,2% клеток при прямом контакте с ПГБ и ПГБ/ПГВ не включали краситель, то есть сохраняли жизнеспособность. При анализе синтеза ДНК клетками в эксперименте и контроле, не обнаружено снижения включения ³H-тимидина ядрами всех типов клеток, соответственно, ингибирования синтеза (фибробластов, гепатоцитов и клеток эндотелия) по сравнению с контролем. Культивирование фибробластов и гепатоцитов в течение 3 сут. на поверхности данных матриксов не влияло на время генерации клеток и синтез белка. Отмечено, что количество пролиферирующих остеобластоподобных клеток на экспериментальных матриксах, сравнимо с контролем (полистерин), и было достоверно выше на всех образцах композита ПГБ/ГАП по сравнению с чистым ПГБ. Наибольший прирост клеток зафиксирован на образцах композита с содержанием гидроксиапатита 10 и 20%, соответственно, 240–260×10⁶. Та же тенденция была характерна для активности щелочной фосфатазы (4,2 и 4,6 мМ/мин×клетка).

Результаты опыта сегментарной остеотомии показали, что в присутствии имплантатов из ПГА происходит новообразование костной ткани в порах матрикса на фоне его постепенной резорбции, а «качество» ткани во многом оценено как лучшее по сравнению с конт-

рольными материалами, по структуре и организации. Этот факт объясняется хорошими барьерными свойствами экспериментальных матриц, препятствующих прорастанию в зону дефекта рыхлой соединительной ткани, что способствовало костеобразованию, а также хорошими биосовместимыми свойствами материалов по отношению к остеобластам клеток.

Исследованный биоматериал обладает выраженными остеопластическими свойствами, медленно, адекватно росту новой костной ткани деградирует *in vivo*, постепенно замещается ею, обеспечивая нормальное протекание репаративного остеогенеза. Показана возможность получения плоских и трехмерных матриц разных типов и их пригодность для выращивания клеток *in vitro*. Таким образом, мы можем заключить, что «БИОПЛАСТОАН» может быть использован в качестве клеточного носителя в современных восстановительных технологиях.

Е.А. Щепкина^{1, 3}, П.В. Кругляков², Л.Н. Соломин¹,
А.Ю. Зарицкий³, В.А. Назаров¹, Р.М. Тихилов¹,
Д.Г. Польшинцев²

Возможности оптимизации репаративного остеогенеза путем трансплантации аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на деминерализованном костном матриксе при лечении ложных суставов трубчатых костей (результаты ограниченных клинических исследований)

¹ ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росмедтехнологий», Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия

³ ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава», Санкт-Петербург, Россия
reposition@yandex.ru

E.A. Shchepkina, P.V. Kruglyakov, L.N. Solomin, A.Yu. Zaritsky,
V.A. Nazarov, R.M. Tythilov, D.G. Polyntsev

Opportunities of reparative osteogenesis optimization by transplantation of autologous mesenchymal stem cells on demineralized bone matrix in long-bone non-unions treatment (results of limited clinical studies)

Потенциальные возможности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) к остеогенной дифференцировке определяют высокий интерес к исследованиям по их применению для оптимизации репаративных процессов в костной ткани. На основе экспериментальных исследований (Кругляков П.В. и соавт., 2005), в которых было получено костеобразование в заселенном сингенными мезенхимальными стволовыми клетками деминерализованном костном трансплантате при замещении костных дефектов, нами разработан способ лечения ложных суставов (патент РФ № 2309756).

Целью клинического исследования являлось сравнение процессов костной репарации при лечении ложных суставов бедренной и большеберцовой костей предложенным способом и при использовании деминерализованного костного трансплантата (контрольная группа).

Аутогенные ММСК выделяли из костного мозга пациента. Путем пункции подвздошной кости забирали 15–30 мл костного мозга, фракционировали методом центрифугирования на фиколле. Отобранную мононуклеарную фракцию отмывали питательной средой DMEM.

После центрифугирования клеточный осадок помещали в среду культивирования, содержащую DMEM и 20% сыворотки эмбрионов коров. Клетки культивировали в монослое, пересевая каждые 7 сут., охарактеризовывали по фенотипу CD34⁺, CD45⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁺. Фенотипирование проводили после второго посева культуры и перед подготовкой биотрансплантата. При подготовке биотрансплантата ММСК заселяли на деминерализованные костные аллотрансплантаты (ДКТ) с плотностью 7–10 млн на 1 см³. Подготовленные трансплантаты использовали для костной пластики после резекции ложного сустава и открытой адаптации фрагментов. Во всех случаях применяли чрескостный остеосинтез. Аппараты внешней фиксации демонтировали после проведения клинической пробы при рентгенологической картине консолидации. Дополнительной иммобилизации после демонтажа аппаратов внешней фиксации не применяли. По предложенному методу оперировано 15 пациентов в возрасте от 25 до 59 лет с ложными суставами бедренной и большеберцовой костей. Сравнение процессов костной репарации и результатов лечения проведено в 2-х группах больных: 10 пациентов лечились по предложенному методу, и у 10 больных произведена костная пластика деминерализованным костным трансплантатом без заселения МСК. Рентгенографию и компьютерную томографию (КТ) выполняли раз в месяц.

Сроки демонтажа аппарата внешней фиксации в основной группе соответствовали срокам сращения переломов (18,9±4,7 нед. ($p < 5\%$)) и были в 1,7 раза меньше, чем в контрольной группе (32,85±2,03 нед. ($p < 2,3\%$)). При анализе данных рентгенологического исследования и компьютерной томографии в случаях применения трансплантатов, заселенных аутогенными ММСК, отмечены следующие особенности: сращение происходило преимущественно через костный трансплантат, в котором быстрее происходило образование компактной кости; в трансплантате отмечено формирование очагов остеогенеза с последующим их слиянием; отсутствовала выраженная периостальная мозоль; выявлено формирование костномозгового канала на всем протяжении костной мозоли и области костной пластики в сроки от 6 мес. до 4 лет; плотность трансплантатов сохранялась более высокой, чем в прилежащих участках костных фрагментов в отдаленном периоде. В контрольной группе рентгенография и компьютерная томография показали постепенное замещение трансплантата костной тканью со стороны костных фрагментов; отмечено формирование выраженного периостального компонента костной мозоли, которая сохраняется и в отдаленном периоде; восстановления костномозгового канала не отмечено в сроке до 4-х лет.

Заселенный ММСК деминерализованный костный аллотрансплантат проявляет как остеоиндуктивные, так и остеокондуктивные свойства, в нем формируются самостоятельные очаги остеогенеза, в более ранние сроки начинает восстанавливаться структура кости как органа с формированием костномозгового канала. Сокращение сроков фиксации, соответствующих достижению консолидации в области ложного сустава, по сравнению с контрольной группой в 1,7 раза свидетельствует о целесообразности дальнейших исследований по применению ММСК на деминерализованном костном матриксе при лечении ложных суставов с последующим внедрением в клиническую практику.