

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Биореактор включал в себя две системы циркуляции. В каждой из них к резервуару с культуральной средой параллельно подключали две камеры. На пористую нижнюю часть культуральных камер помещали подложку, мембрану («MerckMilliporeLtd.», Ирландия), которая удерживала матрикс, биополимерный микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) (АО «Биомир сервис», г. Краснознаменск), с мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани человека (МСК ЖТч). Биореактор помещали в CO₂-инкубатор. Выбор материала для подложки был сделан на основании оценки цитотоксичности и матриксных свойств на фибробластах мыши линии 3T3, а оптимальный размер пор в ней по величине создаваемого давления в биореакторе, заполненного модельным раствором. Клеточно-инженерные конструкции (КИК) ЖТч первые сутки культивировали в ростовой среде MesenPRORS™ (Gibco® byLifeTechnologies™, США), затем помещали в проточный биореактор при скорости 0,5 мл/мин и объеме циркулирующей среды 110 мл. Через сутки ростовую среду заменяли на индукционную хондрогенную STEMPRO® (Gibco® byLifeTechnologies™, США). Жизнеспособность клеток оценивали методом флуоресцентного окрашивания «Live/Dead» («Invitrogen», США). Морфологическое исследование проводили, используя методы гистологического окрашивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. В качестве материала подложки для КИК выбрали нейлон, проявляющий биологическую инертность, так как поликарбонат, обладающий матриксными свойствами, мог бы повлиять на развитие КИК. Мембрана с размером пор 10 мкм создавала меньшее давление в системе, чем подложка с размером пор 5 мкм, и была выбрана для дальнейших экспериментов. Через 16 дней эксперимента наблюдали прогрессивное нарастание клеточной массы со значительным образованием внеклеточного матрикса (ВКМ), причем форма клеток изменилась до уплотненной и вытянутой, а соотношение клеток и ВКМ поменялось в пользу последнего.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. МСК ЖТч в БМКГ проявили высокую пролиферативную активность с формированием собственного ВКМ, что указывает на перспективность префузионного биореактора для создания ТИК ЖТч.

Финансирование исследования: *Госзадание Минздрава России; частично за счет средств гранта Российского фонда фундаментальных исследований (номер проекта 16-29-07322).*

Бахмет Е.И.¹, Назаров И.Б.¹, Кузьмин А.А.¹, Синенко С.А.¹, Артамонова Т.О.², Ходорковский М.А.², Томилин А.Н.¹

¹ ФГБУН «Институт цитологии РАН»

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
e.bakhmet@incras.ru

РОЛЬ HNRNP-K В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ OCT-4

Ген Pou5f1 кодирует ключевой для плюрипотентных стволовых клеток транскрипционный фактор Oct-4. Вместе с Sox2 они образуют гетеродимер и регулируют транскрипцию собственных генов, а также Nanog, Fgf4, Utf1, Fbx15. Oct-4 является незаме-

нимым при индуцировании плюрипотентности. Кроме того, нокадаун Pou5f1 ведет к дифференцировке плюрипотентных клеток. Регуляция гена Pou5f1 происходит через промотор, проксимальный энхансер и дистальный энхансер. Во время транскрипции Pou5f1, эти последовательности являются мишенями для связывания с регуляторными белками. На ранних стадиях эмбриогенеза до имплантации, а также в культивируемых эмбриональных стволовых клетках мыши ключевую роль играет дистальный энхансер, который в свою очередь имеет две важные последовательности – сайт 2A и сайт 2B. С сайтом 2B связывается уже описанный гетеродимер Oct-4-Sox2. При этом, точно не установлены белки-кандидаты на связывание с сайтом 2A (CCCCCCCC). В ходе наших *in vitro* исследований с помощью методов гель-ретардации, аффинной хроматографии и масс-спектрометрии, было выявлено несколько представителей семейства поли(Ц)-связывающих белков – hnRNPK, Pcbp1, Pcbp2. В первую очередь, они известны как РНК-связывающие белки, однако, есть данные и о транскрипционной регуляции посредством их связывания с ДНК. Была подтверждена их роль в регуляции экспрессии BRCA1 и муопиоидного рецептора. Более того, было показано, что во время нокадаун hnRNPK, падает экспрессия таких плюрипотентных маркеров, как Oct-4, Nanog и Rex1. В случае с Oct-4, это хорошо согласуется с полученными нами результатами. Мы также проверили влияние нокаута hnRNPK и Pcbp1 на экспрессию Oct-4 с помощью системы CRISPR-Cas9 на эмбриональных стволовых клетках мыши. Оказалось, что в отсутствие hnRNPK, через 4 дня снижается уровень Oct-4. При более длительном культивировании такой нокаут приводит к гибели клеток, что не связано с плюрипотентностью, т. к. такой же эффект наблюдался нами и на фибробластах линии NIH 3T3. При этом, нокаут Pcbp1 никак не отразился ни на экспрессии Oct-4, ни на жизнеспособности клеток. В настоящее время, мы работаем над подтверждением связи hnRNPK с дистальным энхансером *in vivo* с помощью метода хроматин-иммуннопреципитации.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом РФФИ 17-14-01407.*

Белоглазова И.Б.¹, Зубкова Е.С.¹, Коптелова Н.В.², Дыйканов Д.Т.², Дергилев К.В.¹, Ратнер Е.И.¹, Парфенова Е.В.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова
irene.beloglazova@gmail.com

УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА – ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОР СБОРКИ СОСУДИСТОЙ СЕТИ ПРИ КО-КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Для получения васкуляризированных тканеинженерных конструкций очень важно понимание клеточных и молекулярных событий, связанных с образованием сети кровеносных сосудов. Известно, что для полноценного заживления поврежденной ткани необходимым условием является быстрое восстановление ее кровоснабжения за счет формирова-

ния функциональной сосудистой сети, которое происходит при взаимодействии эндотелиальных (ЭК) и муральных клеток (МК). Среди МК особая роль в регуляции ангиогенеза принадлежит мезенхимальным стволовым (стромальным) клетками (МСК), которые локализируются в сосудистом компартменте тканей и органов, принимая активное участие в репарации ткани, прежде всего через регуляцию ангиогенеза и воспалительного и иммунного ответа на повреждение. Целью нашей работы было исследование механизмов, посредством которых МСК могут координировать образование первичной сосудистой сети ЭК. Было обнаружено, что в условиях контактного ко-культивирования на непокрытом пластике, МСК, полученные из жировой ткани, способствуют формированию ЭК (HUVEC) сосудоподобной сети (СПС). Этого не происходит при бесконтактном ко-культивировании этих клеток в трансвеллах с размером пор 4 мкм. Формирование СПС начинается после 14 ч. ко-культивирования ЭК и МСК, что совпадает по времени с синтезом и секрецией внеклеточного матрикса (ВМ) ко-культурой. После 24 ч. в ко-культуре отчетливо видны фибронектиновые филаменты, которые являются основой для сборки ВМ посредством связывания с другими матриксными белками. Однако, без МСК ЭК не образовывали СПС даже при помещении их на ВМ, синтезированный как монокультурами ЭК и МСК, так и ко-культурой в течение 48 ч. В то же время, если МСК культивировали в течение 48 ч., а затем высаживали на них ЭК, то формирование СПС наблюдалось уже через 24 ч. При контактном ко-культивировании ЭК с МСК происходило повышение секреции урокиназы (uPA) и экспрессии ее рецептора (uPAR) на поверхности ЭК, что важно для формирования СПС, так как блокирование uPAR с помощью специфических антител ингибировало этот процесс. Более того, антитела к αv -субъединице интегрина также ингибировали образование СПС, что также может свидетельствовать об участии uPAR в данном процессе посредством его взаимодействия с витронектином, который взаимодействует с αv -интегриновыми рецепторами. Важное значение для формирования СПС в присутствии МСК имеет также эндцитоз, поскольку добавление антагониста LRP – RAP, ингибитора внутриклеточного транспорта белков – монензина или ингибитора полимеризации микротрубочек колхицина – тормозили этот процесс. Антитела к ингибитору урокиназы PAI-1 также подавляли формирование СПС. Полученные результаты, свидетельствующие о важности прямых контактов между ЭК и МСК для формирования сосудистой сети и роли урокиназной системы в этом процессе, могут иметь значение для разработки технологий получения васкуляризированных тканеинженерных конструкций.

Финансирование исследования: РФФИ 16-04-01699.

Белостоцкая Г.Б.¹, Галагудза М.М.², Сонин Д.Л.², Почкаева Е.И.²

¹ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России
gbelost@mail.ru

МЕХАНИЗМЫ КАРДИОМИОГЕНЕЗА В НОРМЕ И ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА: СМЕНА ПАРАДИГМЫ

За последнее десятилетие трансплантация стволовых клеток (СК) стала перспективной стратегией лечения острого коронарного синдрома и постинфарктной сердечной недостаточности. При этом, несмотря на временное улучшение сократительной функции миокарда за счет паракринного эффекта трансплантированных клеток, не было зарегистрировано формирование новых кардиомиоцитов (КМ) в зоне повреждения. Это обстоятельство повернуло вектор исследований в сторону изучения факторов, секретируемых СК. К этим факторам, в совокупности называемым секретом СК, относят различные цитокины и факторы роста, мРНК и микроРНК, поступающие во внеклеточное пространство как в свободном виде, так и в составе мембранных везикул. Установлено, что секретируемые факторы могут подавлять воспаление и апоптоз, стимулировать ангиогенез, а также усиливать пролиферацию и дифференцировку кардиальных резидентных СК (КСК). В связи с этим в последнее время экзосомы, обогащенные белками, мРНК и микроРНК СК, рассматриваются в качестве потенциального терапевтического средства, обеспечивающего регенерацию миокарда. При этом поиск стимуляторов кардиомиогенеза продолжается на фоне непрекращающихся споров относительно возможности деления или дедифференцировки зрелых КМ, трансдифференцировки каких-либо клеток в КМ, а также способности резидентных КСК дифференцироваться в зрелые КМ. Однако отсутствие ответов на эти вопросы свидетельствует о том, что пора пересмотреть парадигму сложившихся представлений и стереотипов. Нужны либо новые кандидаты на роль клеток, способных дифференцироваться в КМ, либо новые знания о тех процессах, которые происходят в здоровом и поврежденном сердце. При этом данные последних лет о наличии в миокарде взрослых млекопитающих мелких (~10–18 мкм в диаметре) кардиально-позитивных клеток, способных к пролиферации и дифференцировке, а также тот факт, что их количество возрастает после гипоксии, ишемии и инфаркта, до сих пор не нашли объяснения. В связи с этим заслуживают внимания наши данные о внутриклеточном развитии КСК в КМ с образованием структур типа “клетка-внутри-клетки” (КВК) с последующим делением КСК и их частичной кардиомиогенной дифференцировкой, приводящей к формированию пула транзиторных клеток (ТК), выходящих из зрелых кардиомиоцитов в интерстиций миокарда. Показано, что имитация ишемии *in vitro* (гипоксия, ацидоз) приводила к 5–10-кратному увеличению количества КВК, а перманентная ишемия миокарда у взрослых крыс SPF категории показала 1,5-кратное увеличение количества КВК в зоне инфаркта по сравнению с контролем через 2 нед. после коронарной окклюзии. Эти данные позволили предположить, что вос-