паление в зоне инфаркта заставляет резидентные КСК внедряться внутрь сохранивших жизнеспособность КМ, временно выключая их из процесса регенерации. Однако последующий разрыв КВК и выход из них значительного количества (~200) ТК, которые способны к пролиферации и кардиодифференцировке, выдвигают их на первый план в качестве кандидатов для терапевтического воздействия на кардиомиогенез в ишемизированном сердце.

Финансирование исследования: *РФФИ (№ 12-04-00941 and 16-04-01424), Программа Президиума РАН ФН-Медицине (2012-2014) и Грант Правительства РФ 074-У01.*

Белякова М.Б., Костюк Н.В., Егорова Е.Н.

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России
mayabe@yandex.ru

ФЕНОМЕН СОХРАНЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНОСТИ КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ НЕСКОЛЬКИХ ЦИКЛОВ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Дедифференцированные жировые клетки (ДЖК) вызвали пристальный интерес исследователей в отношении их мультипотентных свойств. Было показано, что часть первичной культуры адипоцитов способна переходить в фибробластоподобное состояние, и затем дифференцироваться в адипоциты, остеоциты и хондроциты не только in vitro, но и in vivo (Wei S., 2013, Jumabay M., 2015). Методические трудности очистки адипоцитов от прогениторных клеток, на наш взгляд, требуют комбинировать ее с последующей селекцией популяции. В данной экспериментальной работе мы предлагаем никогда не применявшийся подход к изучению дедифференцировки адипоцитов, выявивший сохранение мультипотентных свойств при неоднократном обращении и повторении адипогенной дифференцировки. Объектом исследования являлись ДЖК из адипоцитов, как выделенных из жировой ткани крыс, так и полученных in vitro путем дифференцировки МСК-ЖТ. Метод потолочной культуры, дающий возможность флотирующим адипоцитам прикрепиться и продемонстрировавший их способность дедифференцироваться в среде DMEM\F12 (SugiharaH. et al.), был доработан нами для удобства микроскопии и манипуляций по переносу «потолочного» монослоя. Метод обеспечивает образование новой популяции из открепившихся адипоцитов, быстро погибающих в обычных условиях. С его применением нам удалось не только получить первичную культуру адипоцитов крысы, но и сформировать прикрепленный монослой из адипоцитов, образовавшихся в результате спонтанного (DMEM+10% FBS) и индуцированного гормонами (DMEM+10% FBS, инсулин, дексаметазон, IBMX) адипогенеза в культуре МСК-ЖТ. Микроскопический контроль за прикреплением флотировавших одиночных адипоцитов подтвердил отсутствие миграции с ними других клеток донного монослоя. Все потолочные культуры адипоцитов дедифференцировались 7 дней в бедной среде, постепенно теряя липиды и приобретая фибробластоподобную морфологию, пассировались и высевались как донная культура, после достижения конфлюэнтности вновь подвергались циклу адипогенной дифференцировки – флотации в потолочную культуру – дедифференцировки. Новую потолочную популяцию ДЖК помещали в условия, ограничивающие пролиферацию и развивающие контактное торможение (DMEM с 10% BS, инкубация 15–25 дней), предполагая обнаружить адипоцитарную редифференцировку. Неожиданно в этих морфологически гомогенных популяциях, независимо от происхождения ДЖК, спонтанно образовывались не только адипоциты (3–7%), но и морфологически типичные остеоциты (1–2%) и изогенные группы хондроцитов (1–2%). Таким образом, для различных клеток жировой ткани возможна не только редифференцировка ДЖК и дедифференцировка, причем с повторением изменения диффенцировочного статуса клетки, но и возврат в мультипотентное состояние после повторной дедифференцировки. Обнаруженный феномен показывает существенные перспективы использования адипоцитов в регенеративной медицине в качестве громадного ресурса для получения мультипотентных клеток.

Берченко Г.Н., Кесян Г.А.

Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова
berchenko@cito-bone.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА КОЛЛАПАН В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ ДЛЯ АКТИВИЗАЦИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Экспериментально-морфологическое и клиническое обоснование применения материала Коллапан для замещения дефектов костной ткани и активизации репаративного остеогенеза у больных с незаживающими переломами и ложными суставами длинных костей конечностей.

МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ. Экспериментально-морфологические исследования (осуществляются с 1993 г.) по влиянию Коллапана (кальций-фосфатный биокомпозиционный материал на основе синтетического гидроксиапатита, содержащий коллаген, антибиотики или наночастицы серебра) на активизацию репаративного остеогенеза в условиях условно асептических и инфицированных костных дефектов проведены более чем на 1500 животных (крысы, кролики, собаки). Клинический материал представлен более 630 больными с различными травматическими и ортопедическими заболеваниями, у которых при замещении дефектов костной ткани и активизации остеогенеза применяли материал Коллапан.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Экспериментально-морфологические исследования показали, что уже на 7–14 сут. после имплантации Коллапана в костный дефект, на его поверхности формировалась новообразованная остеоидная кость, признаки воспаления отсутствовали. В костном дефекте конгломераты имплантированного Коллапана служили многочисленными опорными точками, на поверхности которых формировались очаги остеогенеза. К 30–45 сут. в новообразованных костных трабекулах, подверженных созреванию, отмечалась постепенная биорезорбция гранул имплантата с их замещением новообразованной костью. Полученные в эксперименте данные об антимикробных, остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойствах Коллапана послужили основанием для его использования в клинической практике в качестве пластического материала при замещении дефектов костной ткани и стимуляции репаративного

остеогенеза. В последнее время на основании экспериментальных данных при остеосинтезе используется метод сочетанного применения Коллапана и обогащённой тромбоцитами аутоплазмы (PRP). Применение данного метода в комплексном лечении более 280 травматолого-ортопедических больных позволило добиться положительных результатов в 96,8% случаях при лечении высокоэнергетических и незаживающих переломов, ложных суставов длинных костей конечностей. Заключение. Коллапан является идеальным материалом в инжиниринге костной ткани при замещении костных дефектов, подавлении и предупреждении развития гнойных осложнений, стимуляции остеогенеза. Лечение незаживающих переломов и ложных суставов длинных костей конечностей с помощью остеосинтеза и сочетанного применения Коллапана с PRP, является безопасным и эффективным методом активизации репаративной регенерации кости, приводящим к уменьшению количества повторных госпитализаций этих больных.

Бигильдеев А.Е.[1], Пилунов А.М.[2], Логачёва М.Д.[3], Федотова А.В.[3], Касьянов А.С.[4], Петинати Н.А.[1], Сац Н.В.[1], Сурин В.Л.[1], Дризе Н.И.[1]

[1] ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России
[2] МГУ им. М.В. Ломоносова
[3] НИИ физико-химической биологии МГУ им. М.В. Ломоносова
[4] Институт общей генетики РАН
bigildeev.ae@gmail.com

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ШТРИХ-КОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛОНАЛЬНОГО СОСТАВА И ЕГО ДИНАМИКИ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Знание о том, как устроена стромальная ткань костного мозга на клональном уровне, расширит возможности лечения гематологических заболеваний, связанных с поражением стромы. Исследование клонального состава стромы будет продуктивным, если будут разработаны эффективные методы маркирования индивидуальных мезенхимных клеток-предшественниц. Создание таких методов является актуальной задачей гематологии и регенеративной медицины. В работе изучали динамику изменения клонального состава мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека, маркированных с помощью лентивирусных векторов, несущих генетические штрих-коды. МСК были получены от 6 здоровых доноров. По 105 клеток каждого донора были заражены клонированной библиотекой самоинактивирующихся лентивирусных векторов 4-го поколения, несущих генетические штрих-коды. Библиотека содержала 671 неповторяющийся штрих-код, представляющих собой последовательности из 35 нуклеотидов. При каждом пассировании культуры 120 клеток клонировали в 96-лучные планшеты по 1 клетке на лунку. Подсчитывали эффективность клонирования и эффективность маркирования клоногенных клеток. Из клеточных колоний-клонов выделяли ДНК и идентифицировали штрих-коды с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Из общей клеточной популяции МСК каждого пассажа также выделяли ДНК и секвенировали совокупность штрих-кодов с помощью метода глубокого секвенирования на платформе Illumina. Было показано, что маркирование МСК лентивирусными векторами является стабильным и не снижает пролиферацию клеток. Анализ штрих-кодов в отдельных клеточных клонах показал, что МСК представляют собой поликлональную популяцию. При пассировании культуры её состав существенным образом меняется вследствие истощения пролиферативного потенциала большинства клеток. Результаты глубокого секвенирования подтвердили данные об изменении клонального состава МСК. Со временем в культуре увеличивается доля штрих-кодов, вносящих незначительный вклад в общую популяцию (с 10% до 20%), и наоборот, снижается доля штрих-кодов, вносящих существенный вклад (с 8% до 1%). Максимальный вклад штрих-кодов в общий пул составляет 1-2%, что соответствует 3000–6000 клеток. Медиана вклада штрих-кодов находится на уровне 0,1%, что соответствует 300 клеткам. Основная популяция МСК состоит из клеточных клонов, не превышающих по размеру 500 клеток. Вклад штрих-кодов в общую популяцию увеличивается по мере пассирования, что свидетельствует о том, что не делящиеся клетки в основном остаются в культуре. Результаты указывают на то, что популяция МСК поликлональна и в основном состоит из небольших клеточных клонов, проделавших не больше 9 делений. МСК содержат лишь небольшое количество клеток с высоким пролиферативным потенциалом, среди которых могут быть и стволовые. Маркирование МСК штрих-кодами позволит выявить и охарактеризовать настоящую субпопуляцию мезенхимных стволовых клеток.

Финансирование исследования: *Грант РФФИ № 13-04-00085, ООО «Гематолог».*

Билялов А.И.[1], Абызова М.С.[2], Титова А.А.[1], Мавликеев М.О.[1], Бозо И.Я.[3], Деев Р.В.[4]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет
[2] Казанский государственный медицинский университет
[3] ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека»
[4] Рязанский государственный медицинский университет
BilyalovAir@yandex.ru

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПЛАЗМИДОЙ PCMV-VEGF165 ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ПОЛНОСЛОЙНОГО ДЕФЕКТА КОЖИ У КРЫС ПОСЛЕ АУТОДЕРМОПЛАСТИКИ

ЦЕЛЬ исследования состояла в оценке влияния генной терапии плазмидой pCMV-VEGF165 на заживление дефекта кожи после аутодермопластики у крыс. Под эфирным наркозом на предварительно выбритом участке межлопаточной области у крыс (n = 16) выполняли отсепаровку полнослойного кожного лоскута размерами 2×2 см, который реплантировали и фиксировали по периметру узловыми швами. Животным экспериментальной группы внутрикожно вводили 1 мл раствора, содержащего 0,3 мг сверхскрученной плазмиды pCMV-VEGF165, по периферии дефекта кожи в восемь точек (по 125 мкл на одну точку) сразу после проведения операции. Животным контрольной группы (n = 8) производили инъекцию 1 мл 0,9% раствора NaCl. Оценку результатов и забор материала (аутотрансплантата и части интактной кожи) производили на 3, 6, 9 12,