

распределение клеток по верхнему слою матрицы в обеих группах. Морфологический анализ мазков выявил дифференцировку сперматогоний во 2-й группе. На 7 сут. сокультивирования сперматогоний и клеток Сертоли в метилцеллюлозе происходило объединение клеток в группы, формирование цепочек и тяжей, а на 21 сут. формирование структур, подобных семенным канальцам *in vivo*. Клеточный состав образованных на 21 сут. семенных канальцев характеризовался гетерогенностью и был представлен сперматогониями (5%), сперматоцитами 1-го и 2-го порядка (17%), округлыми сперматидами (33%), удлинёнными сперматидами (6%) и клетками Сертоли (39%). Клеточная популяция первой экспериментальной группы характеризовалась гомогенностью и отсутствием дифференцировки на 21 сут. трехмерного культивирования. Оценка пролиферации выявила увеличение численности сперматогоний в первой группе в 2,5 раза. Таким образом, совместное культивирование сперматогоний хряка и клеток Сертоли в 2,5% растворе метилцеллюлозы, способствует дифференцировке сперматогоний до стадии удлинённых сперматид на 21 сут и формированию семенных канальцев *in vitro*.

Финансирование исследования: *Средства государственного бюджета.*

Васина Е.В., Костюнина В.С., Гончарова Н.В., Северин И.Н., Петёвка Н.В.

*Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Республика Беларусь
vasina@blood.by*

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА ПОДДЕРЖИВАЮТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ CD34+ КЛЕТК ПУПОВИННОЙ КРОВИ В ГРАНУЛОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНОМ НАПРАВЛЕНИИ

Разработка технологии получения *ex vivo* клеток гранулоцитарно-моноцитарного ряда из стволовых клеток пуповинной крови может быть востребована в трансфузиологии, где заготовка, хранение и использование зрелых донорских гранулоцитов имеет ряд ограничений. Для поддержания жизнеспособности созревающих в культуре стволовых (CD34+) клеток и стимуляции пролиферации и дифференцировки можно использовать сокультивирование с поддерживающими мезенхимными стромальными клетками (МСК) различного тканевого происхождения. Перспективным источником МСК являются ткани пуповинно-плацентарного комплекса, вследствие безопасности их получения для донора и меньшего риска вирусной контаминации.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ. Сравнить способность МСК пуповинно-плацентарного происхождения и МСК костного мозга (КМ) поддерживать гранулоцитарно-моноцитарную дифференцировку CD34+ клеток пуповинной крови при сокультивировании *in vitro*. МСК КМ, пуповины либо плаценты получали стандартными методами из материала доноров с их информированного согласия. Плодовую принадлежность МСК плаценты подтверждали методом нестед-ПЦР гена амелогенина. В культуральной среде монослоя МСК определяли уровень секреции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего

фактора (ГМ-КСФ) методом иммуноферментного анализа. CD34+ клетки пуповинной крови культивировали в питательной среде IMDM с добавлением 2% сыворотки крови человека группы АВ (IV), Г-КСФ, фактора стволовых клеток, интерлейкина 3 на монослое МСК КМ, пуповины или плаценты. Дифференцировку гемопоэтических клеток в гранулоцитарно-моноцитарном направлении подтверждали методом проточной цитометрии по наличию маркеров CD13, CD15, CD45. Каждое исследование проводилось в 3–4 повторностях. МСК плаценты характеризовались наиболее высоким уровнем секреции Г-КСФ ($0,42 \pm 0,07$ нг/мл против – $0,23 \pm 0,03$ нг/мл для МСК пуповины). Монослой МСК КМ секретировал Г-КСФ ниже предела чувствительности тест-системы (менее 20 пг/мл). ГМ-КСФ секретировался на уровне $5,0 \pm 2,5$ пг/мл 1,7 \pm 0,4 пг/мл и 1,1 \pm 0,2 пг/мл МСК плаценты, МСК пуповины и МСК КМ соответственно. Повышенная секреция данных факторов позволяет предполагать больший потенциал МСК плаценты в поддержании предшественников гранулоцитарного роста. В результате 7-дневного сокультивирования доля клеток с фенотипом CD13+CD15+CD45+ составила 36,5 \pm 0,5% при использовании МСК плаценты, 33 \pm 3% в варианте с МСК КМ и 23 \pm 4% с МСК пуповины. Наибольший прирост общего числа гемопоэтических клеток также достигнут на подложке МСК плаценты (106 \pm 20 раз), тогда как в присутствии МСК КМ – 63,7 \pm 0,8 раз и МСК пуповины – 20,5 \pm 3,5 раз. В результате прирост целевых CD13+CD15+CD45+ клеток составил 38,8 \pm 8 раз, 21 \pm 1,6 раз и 4,6 \pm 0,1 раз для вариантов с МСК плаценты, МСК КМ и МСК пуповины соответственно. МСК плаценты способствуют наибольшему приросту предшественников гранулоцитарно-моноцитарного роста дифференцировки с фенотипом CD13+CD15+CD45+, в сравнении с МСК КМ и пуповины в аналогичных условиях.

Финансирование исследования: *Государственная программа научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», подпрограмма 2 «Диагностика и терапия заболеваний».*

Вахрушев И.В.¹, Раева О.С.¹, Суббот А.М.², Новиков И.А.², Антонов Е.Н.³, Попов В.К.³, Комлев В.С.⁴, Наместникова Д.Д.⁵, Губский И.Л.⁵, Сухинич К.К.⁶, Ярыгин К.Н.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней»

³ Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» РАН

⁴ ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН

⁵ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

⁶ ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН

vakhrunya@gmail.com

ПУЛЬПА МОЛОЧНОГО ЗУБА КАК ИСТОЧНИК МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) пульпы молочного зуба представляют собой перспективный материал для применения в регенера-

тивной медицине, поскольку способы их получения не включают инвазивных процедур забора материала, а также не обременены этическими ограничениями. Настоящая работа посвящена характеристике свойств первичных культур МСК пульпы молочного зуба, разработке технологий создания на их основе различных тканеинженерных конструкций, а также применению клеток данного типа в качестве экспериментальной модели для изучения процессов хоуминга и миграции мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации. Источником клеточных культур послужили молочные зубы, полученные в результате естественного выпадения. Выделение клеток осуществляли путем ферментативной обработки фрагментов пульпы. Анализ уровня экспрессии поверхностных маркеров, проведенный методом проточной цитофлуориметрии, показал, что клетки обладали фенотипом CD29+, CD34-, CD44+, CD45, CD49b+, CD73+, CD90+, HLA-DR-. Далее была продемонстрирована способность клеток к дифференцировке в трех различных направлениях. После культивирования в остеогенной среде в культурах появлялись локусы остошения с отложениями минерализованного матрикса, а также возрастала активность щелочной фосфатазы. В результате хондрогенной дифференцировки в микросферах наблюдалась продукция кислых гликозаминогликанов, характерных для межклеточного вещества хрящевой ткани. Индукция адипогенеза приводила к накоплению в клетках жировых вакуолей. Таким образом было показано, что клетки полученных культур обладают всеми признаками мультипотентных мезенхимальных клеток. На основе полученных культур МСК пульпы молочного зуба в комплексе с разнообразными трехмерными скаффолдами были созданы экспериментальные образцы тканеинженерных конструкций. Исследование жизнеспособности и наблюдение за морфологией клеток в условиях продолжительного трёхмерного культивирования на скаффолдах осуществляли при помощи биохимических тестов, а также с применением конфокальной и сканирующей электронной микроскопии. Результаты позволили сравнить матриксные свойства разрабатываемых клеточных носителей и оценить перспективность их использования в тканевой инженерии. Помимо вышперечисленного, было проведено исследование поведения МСК пульпы молочного зуба в условиях их трансплантации *in vivo*. Для этого был разработан оригинальный экспериментальный подход, основанный на мечении клеток магнитными флуоресцентными частицами. Он дает возможность отслеживания введенных клеток как прижизненно (методом МРТ), так и на гистологических препаратах (с помощью флуоресцентной микроскопии). Меченые МСК вводили в головной мозг крысам, после чего наблюдали их инкорпорацию в окружающие ткани. На основании полученных результатов можно заключить, что пульпа молочного зуба является эффективным источником МСК как для терапевтического применения, так и для экспериментальных исследований.

Финансирование исследования: *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 16-29-07322 ОФИ_М).*

**Великанова Е.А., Матвеева В.Г.,
Антонова Л.В., Севостьянова В.В.,
Мионов А.В., Кривкина Е.О., Глушкова Т.В.,
Барбараш Л.С.**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

velikanova_ea@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ ТКАНИ DE NOVO НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА РАЗЛИЧНОГО ПОЛИМЕРНОГО СОСТАВА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ RGD-ПЕПТИДАМИ

В настоящее время ведется активная разработка полимерных протезов сосудов малого диаметра. Модификация биологически активными пептидами может повысить биосовместимость и снизить тромбогенность поверхности за счет селективного связывания с эндотелиальными клетками, привлеченными из кровотока.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Оценить влияние модификации RGD-пептидами на морфологию и механические свойства биodeградируемых сосудистых графтов малого диаметра различного полимерного состава, а также особенности формирования на их основе новообразованной ткани после имплантации графтов в сосудистое русло мелких лабораторных животных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Графты ($d = 2$ мм) были изготовлены методом электроспиннинга из поликапролактона (PCL) и композиции полигидроксibuтирата/валерата (PHBV) и PCL. Поверхность части графтов модифицировали RGD-пептидами посредством карбодиимидного связывания с последующей детекцией с помощью окраски оранжем II и нингидринового теста. Исследована морфология графтов сканирующей электронной микроскопией и механические свойства с использованием образцов *a. tammaria* в качестве контроля. Графты PHBV/PCL, PHBV/PCL/RGD, PCL, и PCL/RGD имплантировали в брюшную аорту крыс на 1, 3, 6, 9 мес. Эксплантированные образцы окрашивали гематоксилином и эозином, проводили иммунофлуоресцентную окраску на фактор фон Виллебранда, CD31 и CD34, коллаген I и IV типа. Ядра клеток окрашивали DAPI. Результаты. Обработка оранжем II позволила обнаружить первичные амины на графтах с RGD-пептидами. Нингидриновый тест подтвердил повышение концентрации аминокрупп от немодифицированных к RGD-модифицированным образцам. Немодифицированные графты и графты с RGD обладали однородной высокопористой структурой. Прочность модифицированных графтов была ниже, чем немодифицированных ($p < 0,05$), но при этом приближалась к аналогичным показателям *a. tammaria*. Особенностью тканевой реакции на имплантацию немодифицированных графтов PCL явилось развитие хронического гранулематозного воспаления в стенке графтов. В графтах PHBV/PCL подобной картины не наблюдалось. Модификация поверхности PCL графтов RGD-пептидами в 2 раза снизила частоту развития гранулематозного воспаления в стенке. Модификация RGD-пептидами графтов PHBV/PCL и PCL ускорила заселение графтов эндотелиальными прогениторными клетками (EPC) и их дифференцировку в зрелые на ранних этапах имплантации. Через 6 мес. наблюдения разница