имодействие с лимфоцитами приводило к увеличению экспрессии CD54 в 4 раза через сутки на МСК и ИЛ-МСК (p = 0,002). После взаимодействия с активированными лимфоцитами экспрессия CD54 превышала в 51, 35 и 53 раза (для МСК, ИЛ-МСК и γ-МСК) уровень экспрессии CD54 на МСК (без лимфоцитов).

ВЫВОДЫ. Полученные результаты свидетельствуют об изменении свойств МСК как после их активации с помощью ИФН-γ, так и после взаимодействия с лимфоцитами. Обработка ИЛ-1β не влияет на свойства культуры МСК, а при взаимодействии с лимфоцитами МСК остаются менее иммуногенными и демонстрируют меньшую экспрессию молекул клеточной адгезии ICAM-1. Успешность применения МСК в терапии может быть связана с балансом их адгезивных и иммуногенных свойств.

Финансирование исследования: *РФФИ грант № 16-04-00189.*

Капустянов И.А.[1], Пущина Е.В.[2], Вараксин А.А.[2], Обухов Д.К.[3]

[1] *Дальневосточный федеральный университет*
[2] *Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН*
[3] *Санкт-Петербургский государственный университет*
ilyaak9772@gmail.com

ИНДУКЦИЯ АПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МЕЗЕНЦЕФАЛИЧЕСКОГО ТЕГМЕНТУМА МОЛОДИ КЕТЫ ONCORHINCHUSKETA

Мозг рыб обладает высокой интенсивностью морфогенетических процессов и пролиферативной активностью, поэтому он является привлекательным объектом для исследования нейрогенетических процессов. У эволюционно древних форм, таких как семейство лососёвых рыб (Salmonidae), наблюдается высокая концентрация недифференцированных элементов, как в матричных зонах мозга, так и в паренхиме. Нейрогенные процессы, происходящие в покрышке среднего мозга рыб, малоизучены, но могут представлять значительный интерес, так как включают в себя эволюционно древнюю область — медиальную зону ретикулярной формации. С помощью маркирования апоптозных клеток методом TUNEL, а также докрашивания прилежащих областей мозга метиловым зеленым исследовали ранний апоптозный ответ в мезенцефалическом тегментуме молоди кеты Oncorhynchusketa после механической травмы. Уже через 2 часа после механического повреждения дорсального тегментума были выявлены интактные и TUNEL-позитивные клетки с различными морфологическими характеристиками, но при этом формирующие множество переходных форм, что свидетельствует в пользу гипотезы морфологического континуума. Апоптозный ответ, наблюдаемый в области повреждения, согласно полученным результатам характеризовался двухфазностью: в результате первой фазы наблюдалась элиминация мелких нейронов в области травмы, а во второй фазе апоптозу подвергались клетки микроглии, мигрирующие в зону травмы для утилизации апоптозных телец. В дорсальной медиальной ретикулярной формации (ДМРФ), прилежащей к гломерулярному ядру были обнаружены TUNEL-маркированные кластеры клеток, удаленные от места первичного повреждения. Вероятно, подобные вторичные очаги апоптоза могли возникнуть в ходе персистентного морфогенеза, или же в результате распространения каскадной апоптозной реакции при повреждении проекционных нейронов. Наряду с участками вторичного апоптоза в ДМРФ нами были выявлены центры клеточной дифференцировки, а также крупные клетки, находящиеся в состоянии персистентного роста и имеющие высокие ядерно-цитоплазматические отношения. Таким образом, уже через 2 ч. после механической травмы в дорсальном тегментуме молоди кеты обнаруживается выраженный апоптозный ответ, являющийся ответной реакцией на травму.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД 4318.2015.04) и Программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-I-6-116).*

Карагяур М.Н.[1], Дыйканов Д.Т.[2], Васильев П.А.[2], Тюрин-Кузьмин П.А.[2], Калинина Н.И.[2], Рубцов Ю.П.[2]

[1] *Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова*
[2] *Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова*
m.karagyaur@mail.ru

НОВОЕ СЕКРЕТИРУЕМОЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ БЛОКИРОВКИ СВЯЗЫВАНИЯ IL-2 С ВЫСОКОАФФИННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, СОДЕРЖАЩИМ СУБЪЕДИНИЦУ IL-2RA (CD25)

Пересадка органов нередко сопровождается отторжением, которое обусловлено несовпадением набора молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) донора с набором МНС реципиента. Вследствие этого Т-клетки реципиента воспринимают клетки трансплантата как «чужое», активируются и активно пролиферируют, что и приводит к отторжению трансплантата. Активация и пролиферация хелперных и цитотоксических Т-клеток зависит от рецепции цитокина IL-2, который сами Т-клетки и вырабатывают. Рецепция IL-2 осуществляется через тримерный рецептор, одна из субъединиц которого, IL-2R, отвечает за высокоаффинное связывание IL-2. Уровень IL-2R на поверхности активированных Т-клеток повышен для обеспечения сильного сигнала от IL-2, от которого зависит скорость деления и выживание пролиферирующих Т-клеток. Неудивительно, что уровень IL-2 резко возрастает и на ранних стадиях аутоиммунных заболеваний таких как сахарный диабет I-го типа, системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит). На сегодняшний день существуют специфические антагонисты IL-2R — полноразмерные моноклональные блокирующие антитела. Препараты на их основе (базиликсимаб и даклизумаб) довольно успешно используют для профилактики отторжения трансплантата и лечения аутоиммунных лимфопролиферативных заболеваний, однако они очень дороги (от 40 000 рублей за инъекцию) и, вследствие нестабильности, требуют многократного введения (минимум 2—3). Мы предлагаем более эффективный генотерапевтический подход, состоящий во введении в организм пациента генетических конструкций, обеспечивающих синтез в клетках и секрецию аналогов антител-блокаторов IL-2R, что позволит снизить стоимость лечения и увеличить продолжительность терапевтического эффекта после однократной инъекции. Цель дан-

ного проекта — дизайн и создание генетической конструкции, кодирующей рекомбинантное антитело, эффективно блокирующее взаимодействие IL-2 с IL-2R. На основе аминокислотной последовательности базиликсимаба мы создали его одноцепочечный аналог (ScFv) состоящий из фрагментов вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей, соединенных между собой линкером. Мы полагаем, что создаваемое ScFv будет эффективно блокировать связывание IL-2 с IL-2R, а за счет меньшего размера легче проникать в ткани (~35 кДа против 143 кДа у базиликсимаба), обладая притом большей стабильностью. Показано, что созданная плазмидная конструкция pVax-antiCD25-scFv после трансфекции обеспечивает высокий уровень продукции antiCD25-scFv в среду культивирования. В настоящий момент проходит оценка эффективности нового антитела in vitro. В случае эффективности pVax-antiCD25-scFv можно будет применить как генно-терапевтический препарат или же в виде генномодифицированных клеток, продуцирующих antiCD25-scFv. Например, с помощью данной конструкции при необходимости можно усилить иммуносупрессивные свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Предложенный подход можно использовать для создания доступных альтернатив дорогим терапевтическим антителам.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00439), с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029 и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

Карагяур М.Н.[1], Васильев П.А.[2], Дыйканов Д.Т.[2], Рысенкова К.Д.[2], Сёмина Е.В.[2], Кулебякин К.Ю.[1], Тюрин-Кузьмин П.А.[2], Александрушкина Н.А.[1], Шмакова А.А.[2], Рубцов Ю.П.[2]

[1] *Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова*
[2] *Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова*
m.karagyaur@mail.ru

ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОГО ВЫКЛЮЧЕНИЯ ГЕНОВ В КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ С НЕСТАБИЛЬНЫМ КАРИОТИПОМ

Клеточные линии являются удобной модельной системой для выяснения роли отдельных белков в развитии и патогенезе различных заболеваний. Для установления роли конкретного белка с помощью генетических методов, как правило, изменяют уровень синтеза белка интереса путем, в частности, увеличения уровня экспрессии кодирующего белок гена, либо, наоборот, снижения экспрессии гена или полного выключения синтеза белка путем генетического нокаута. Прицельное выключение конкретных генов, например с использованием технологии CRISPR/Cas9, достаточно просто, если модифицируемые клетки являются гаплоидными или диплоидными. Однако большинство популярных клеточных линий (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a и т.д.) характеризуются нестабильным кариотипом, т.е. различным количеством хромосом и числом копий генов (от 1 до 5 копий на клетку). Множественные копии генов практически невозможно выключить за один раунд генетической модификации, а разное количество генов в отдельных клетках делает популяции, полученные из них гетерогенными. Помимо этого, использование популяций клеток, происходящих из отдельных клонов, требует тщательной проверки на отсутствие нежелательных модификаций в геноме (т.н. off-target модификаций), поскольку все изменения в геноме, в том числе и нецелевые, будут содержать все клетки клона. В то же время, если клеточную популяцию получать, используя модификацию сразу большого числа клеток, минуя этап клонирования, влияние различной копийности генов и каждой конкретной нецелевой модификации генома не будет заметно из-за немногочисленности таких клеток в общем пуле. Однако выключение экспрессии генов в большой (многочисленной) популяции клеток с помощью CRISPR/Cas9 — это нетривиальная задача. В результате одного раунда трансфекции линий клеток (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a) плазмидой pX458, содержащей гены wtSpCas9, флуоресцентного маркера GFP и направляющей РНК (gRNA) к генам интереса, с последующим обогащением трансфицированных клеток по флуоресценции GFP, модификации подвержены лишь 20—50% аллелей. Целью данной работы было разработать эффективный и воспроизводимый протокол CRISPR/Cas9-опосредованной генной модификации популяции клеток, минуя этап клонирования. С помощью 2—3 циклов модификации с последующим обогащением по GFP нам удалось получить популяции клеток с выраженным (практически полным) подавлением экспрессии целевых генов. У полученных таким образом популяций клеток не наблюдали увеличения частоты нецелевой модификации ДНК. Получена новая информация о целесообразности применения различных вариантов системы модификации генома CRISPR/Cas9 в данном протоколе. Созданный протокол позволяет эффективно выключать гены в клеточных линиях с нестабильным кариотипом (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a) или в клеточных линиях, клонирование которых затруднено (HepG2).

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086), с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029 и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

Карагяур М.Н.[1], Стамбольский Д.В.[1], Балабаньян В.Ю.[1], Климович П.С.[2], Ростовцева А.И.[2], Сёмина Е.В.[2]

[1] *Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова*
[2] *Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова*
m.karagyaur@mail.ru

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ МОЗГОВОЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР И УРОКИНАЗНЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА, ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕИННЕРВАЦИИ

Травмы периферических нервов являются одной из значимых причин инвалидизации. Проблема неэффективной посттравматической реиннервации