чительно превышала 3 мес. в экспериментальных группах. Изучение биосовместимости в подкожных тестах на мышах BDF1 и остеопластических свойств в модельных дефектах большеберцовой кости крыс Wistar показало отсутствие негативных эффектов со стороны ванкомицина в составе напечатанных конструктов и развитие умеренных признаков асептического воспаления в случае низких концентраций доксорубицина. Таким образом, нами был разработан способ получения и последующей оценки персонализированных имплантатов, обладающих остеокондуктивными свойствами и антибактериальной или противопухолевой активностью.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки (соглашение № 14.604.21.0132 от 21 октября 2014 г. ID:RFMEFI60414X0132).*

Карпович В.Б.[1,2], Нащекина Ю.А.[2], Никонов П.О.[2], Юдинцева Н.М.[2]

[1] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова
[2] ФГБУН «Институт цитологии» РАН
kviccy@gmail.com

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНОГО СКАФФОЛДА И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

ВВЕДЕНИЕ. Главной причиной инвалидизации и смертности населения в развитых странах мира, по данным ВОЗ, являются заболевания сердечно-сосудистой системы. При этом ишемия органов и тканей — главный патофизиологический механизм. Основным способом лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с облитерацией кровеносных сосудов, являются шунтирующие операции. В качестве шунтов используют аутовены или аутоартерии. Однако при отсутствии собственных необходимых вен или артерий в результате проведения повторных операций или сопутствующей патологии сосудов в 30% случаев приводит к необходимости использования альтернативных сосудистых протезов. Несмотря на экономическую доступность и удобство в применении, синтетические и биологические протезы диаметром менее 6 мм не могут быть использованы в качестве шунтов, так как существует высокий риск их быстрой облитерации в результате обширной гиперплазии неоинтимы или тромбообразования. Таким образом, существует острая необходимость разработки альтернативных протезов малого диаметра (<6 мм).

ЦЕЛЬ. Создание искусственного биодеградируемого сосуда малого диаметра в условиях in vitro, заселенного мезенхимальными стромальными клетками (МСК) костного мозга.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. В качестве материала для создания сосуда использовался полимер молочной кислоты — поли L,L-лактид, который обладает рядом свойств, необходимых для использования в регенеративной медицине: отсутствие токсичности, механическая прочность, биодеградация и др. Было приготовлено два варианта каркасов с различной толщиной стенки. В приготовленные сосуды вносили суспензию МСК. В условиях CO_2-инкубатора сосуды оставляли на 3 ч. с целью создания условий для максимальной адгезии клеток, затем добавляли питательную среду (статический способ посева клеток). Подобную процедуру повторяли 3-кратно. После 7 дней культивирования с помощью криотома были сделаны криосрезы сосудов толщиной в 15–20 мкн и выполнена оценка присутствия и состояния клеток, окрашенных DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид), с помощью конфокального микроскопа (LeicaTCSSP5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ. В обоих исследуемых вариантах клетки адгезировали на стенки сосудов и образовывали плотный монослой. В настоящее время проводятся исследования по оценке физико-механических свойств приготовленных сосудов, а также разработка динамического способа заселения клеток и последующая имплантация наиболее оптимального варианта сосуда на модели лабораторных животных (крысы).

Финансирование исследования: *Грант РНФ № 14-50-00068.*

Касымов В.А., Доминова И.Н., Готовко О.В.

Балтийский федеральный университет им. И. Канта
vit.kasymov@gmail.com

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ И ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ТАРГЕТНОГО КОНТРОЛЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ ГЛИОМНЫХ ОПУХОЛЕЙ: К НОВЫМ ПОДХОДАМ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ.

Глиомы являются одними из самых опасных опухолей и, как правило, с довольно короткими периодами выживания пациента: менее 15 мес. после первоначального диагноза. Данные опухоли могут обладать различной степенью злокачественности и встречаются наиболее часто по сравнению с другими типами — примерно 30% всех случаев возникновения опухолей ЦНС и 80% всех злокачественных опухолей головного мозга. Стандартным подходом к лечению опухолей головного мозга является уменьшение опухоли в максимально возможной степени с помощью хирургии, лучевой терапии и химиотерапии. Однако, все эти подходы в большинстве случаев неэффективны. Инновационным подходом к терапии низкодифференцированных глиом является применение онколитических вирусов (ОВ). Генная терапия онкологических заболеваний предполагает доставку генов в клетки-мишени. Но ни ДНК, ни РНК не могут быть использованы в «голом виде» для достижения этой цели. Поэтому для доставки генов в эукариотические клетки, с начала 1980-х гг. разрабатываются векторные генетические конструкции на основе вирусов. Доклинические исследования на культурах опухолевых клеток и на животных с экспериментальными опухолями человека (включая экспериментальные глиомы) демонстрируют очень высокий терапевтический потенциал ОВ, превосходящий все существующие клинико-экспериментальные методы терапии. Малая вероятность формирования внутренней резистентности в опухолевых клетках к ОВ и отсутствие значительных побочных эффектов даже при высоких дозах системного введения, делает ОВ особо привлекательными для генно-инженерной разработки улучшенных вариантов с высокой терапевтической активностью (Fukuhara H., et. al. 2016). Первый лабораторный вирус для онколитической терапии был создан на основе Herpes simplex virus (HSV)

в 1991 г. Martuza et al. В настоящее время известны более 20 потенциальных ОВ более чем из 10 различных вирусных семейств. В фазе клинических испытаний находятся ОВ, созданные на основе вирусов HSV, AdV, NDV, H1, MV и PV (Баклаушев В.П., и др. 2016). В рамках этого направления активно разрабатываются новые способы лечения, основанные на доставке и экспрессии терапевтических генов, которые могут привести к гибели опухолевых клеток, ингибировать сосудообразование в опухоли или активировать эффективный иммунный ответ против глиом. Наиболее исследованными с точки зрения генетики системами транспортировки генетической информации в клетку являются вирусные векторы. На основе аденоассоциированных и лентивирусных векторов возможно создать генетические конструкции для специфической доставки генетического материала в клетки строго определенного типа глиом. Это позволит дистанционно и прецизионно активировать или ингибировать определенные внутриклеточные сигнальные каскады для подавления пролиферативной функции глиомных клеток, экспрессировать флуоресцентные белки для четкого разделения пораженной и здоровой ткани, что позволит вывести на новый уровень диагностику и лечение глиомных опухолей.

Финансирование исследования: *Поддержано Министерством образования и науки РФ (соглашение 14.575.21.0036, УИН RFMEFI57514X0036).*

Кашапова И.С.[1], Косовский Г.Ю.[2]

[1] ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»
[2] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева
i-kashapova@rambler.ru

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА АДГЕЗИВНУЮ СПОСОБНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Адгезионные взаимодействия являются регулятором жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. Существуют два основных типа клеточной адгезии: клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс (ВКМ). ВКМ — зона трансмиссии, передачи сигналов от регуляторных систем организма к клеткам. Был проведен ряд экспериментов для определения уровня пролиферативной активности первичных популяций мезенхимных стволовых клеток (МСК) костного мозга (КМ) крысы с различным уровнем адгезии к желатину и фибронектину с целью выявления возможных различий. Клетки выделяли из костного мозга взрослых животных по методу Г.Ю. Косовского [1]. МСК КМ крысы первого пассажа в концентрации 200 000 кл/мл среды DMEM с глутамином (ПанЭко, Россия) с содержанием 10% FBS (HyClone, США) и 100-кратно разбавленного раствора антибиотиков-антимикотиков (Sigma, США) высевали на чашки Петри, покрытые желатином или фибронектином для инкубирования в условиях 5% CO_2 в атмосфере и температуре +37°С в течение 10 мин., после чего отбирали среду с не прикрепившимися за это время клетками в чашки Петри с желатином и фибронектином для последующего инкубирования в тех же условиях на протяжении 20 мин. По истечению 20 мин. не адгезировавшиеся за этот временной промежуток МСК также переносили в соответствующие новые чашки Петри с покрытием соответствующими белками внеклеточного матрикса и оставляли в CO_2-инкубаторе еще на 30 мин. Далее, отобранные популяции культивировали в течение 48 ч. в стандартных условиях. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева. Время удвоения клеточных популяций определяли по формуле:

$$td = (2 \cdot \Delta T \cdot Xo)/X,$$

где: ΔТ — время эксперимента, Хо — исходная концентрация клеток, Х — концентрация клеток через время Т.

Из полученных результатов следует, что к желатину за 10 мин. адгезируется 15% МСК КМ крысы, при этом слабо проявляющих пролиферативные свойства (td = 72,6 ч.), тем временем, как клетки, адгезирующиеся к желатину за 30 и 60 мин. (50% прикрепившихся МСК и 35% соответственно), обладают наивысшей скоростью пролиферации (td = 45,4 ч.). При культивировании МСК КМ крысы на фибронектине, адгезирующихся за 10 и 60 мин. (40% и 15% соответственно), среднее время удвоения популяции составляет 58,8 ч., в то время, как клетки, прикрепляющиеся за 30 мин. (45%), обладают низким пролиферативным потенциалом (td = 70,1ч.). Таким образом, показано, что скорость пролиферации первичных популяций МСК КМ крысы связана с адгезивными свойствами, на который также влияет используемый субстрат адгезии.

Литература:

1. Косовский Г.Ю. Методические рекомендации по выделению и культивированию мезенхимных стволовых клеток (МСК) из костного мозга животных. Российская академия сельскохозяйственных наук, отделение ветеринарной медицины, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. М., 2009, 20 с.

Финансирование исследования: *Пункт программы ФНИ государственных академий наук на 2013-2020 годы и наименование направления исследований «Биоинженерные методы, технологии получения трансгенных животных, птиц, рыб и насекомых с заданными свойствами» «Разработать методы имитации гистотипической архитектоники с использованием приемов направленной дифференцировки клеточных популяций с заданными свойствами, в условиях in vitro» (№ 0584-2014-0005).*

Квачева З.Б.[1], Василевич И.Б.[1], Полешко А.Г.[1], Пинчук С.В.[1], Чекина А.Ю.[2], Марченко Л.Н.[2], Волотовский И.Д.[1]

[1] ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии» НАН Беларуси
[2] Белорусский государственный медицинский университет
kvachzb@tut.by

ОПТИМИЗАЦИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ МОНОСЛОЙНЫХ КУЛЬТУР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ТКАНЕЙ ГЛАЗА, КАК БИОМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТО, С ЦЕЛЬЮ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

В настоящее время актуальной проблемой в офтальмологии является лечение заболеваний роговицы глаза, для чего требуется выполнение реконструктивных вмешательств с использованием донорских тканей. Высокая частота отторжения трансплантатов побуждает к поиску альтернативных методов лече-