

четко разделить и визуализировать подсаженные и собственные клетки, а также понять, из каких клеток формируется костная ткань и кровеносные сосуды в месте дефекта. Через 6 нед. после операции на имплантатах были найдены подсаженные GFP(-) МСК и GFP(+)-МСК, при этом собственные МСК в месте дефекта не обнаруживались. Более того, изначально пустой скаффолд без подсаженных клеток так и оставался пустым. Морфологический анализ показал, что все скаффолды через 6 нед. сохраняли пористую структуру, значительная часть полимера скаффолда оставалась в неизменном виде. К 12 нед. на скаффолдах по-прежнему можно было видеть большое количество подсаженных GFP(-) МСК и GFP(+)-МСК. Важным является тот факт, что собственные клетки на скаффолдах в месте дефекта так же, как и через 6 нед., не обнаруживались. Скаффолды без подсаженных клеток оставались пустыми. Большая часть полимера скаффолдов с МСК резорбировалась, дефект заполнялся костной тканью. Кроме того, в месте дефекта на скаффолдах обнаруживалось большое количество сосудов, которые, предположительно, формировались также из подсаженных клеток. На скаффолдах с подсаженными GFP(+)-МСК в нефлуоресцентной мыши сосуды имели сильный флуоресцентный сигнал и, соответственно, состояли из GFP(+) клеток. И, напротив, на скаффолдах с GFP(-)-МСК в GFP(+) трансгенной мыши сосуды не флуоресцировали. Таким образом, показано, что подсаженные МСК в течение длительного времени способны сохранять свою активность на скаффолдах, а также непосредственно участвовать в образовании костной ткани и, предположительно, кровеносных сосудов в месте дефекта.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 13-02-12101 офи_м.*

Кукс Е.И., Шершакова Н.Н., Макарова Э.А., Андреев С.М., Хаитов М.Р.

ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»
ФМБА России
el.kuks@yandex.ru

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ФУЛЛЕРЕНА СТИМУЛИРОВАТЬ РЕГЕНЕРАЦИЮ КОЖНЫХ ПОРАЖЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ. Процесс регенерации поврежденной кожной ткани является сложнейшим биологическим процессом и остается актуальной медицинской проблемой во всем мире. При раневых поражениях, включая ожоги, нарастает активность окислительных реакций, приводя к истощению антиоксидантной защиты. Фуллерен C60 является мощным электронным акцептором, способным *in vivo* и *in vitro* эффективно инактивировать активные формы кислорода и свободные радикалы, что обуславливает его перспективность как основы лечебных препаратов для заживления кожных повреждений.

ЦЕЛЬ. Изучение способности водорастворимой формы C60 влиять на регенеративные процессы в кожной ткани мышей.

МЕТОДЫ. Препарат в форме водного раствора фуллерена (ВРФ) получали диализным методом, разработанным нами ранее. Для моделирования химического ожогового воспаления кожного покрова применяли NaOH (12,5 н.) и 99,5% уксусную кислоту. ВРФ наносили ежедневно в течение 14 дней

мышам BALB/c, подвергшимся щелочному ожогу и 18 дней мышам с кислотным ожогом. Для моделирования раневого поражения кожного покрова проводили иссечение кожного покрова на спине мышей. При этом терапевтическую обработку кожных ран начинали на следующий день после иссечения кожи и продолжали в течение 11 дней. Оценка способности фуллерена C60 влиять на уровень экспрессии генов проводилась методом ПЦР-РВ. Для визуального определения ранозаживляющей эффективности проводили измерение площадей раневой поверхности. Результаты. Эксперименты показали, что нанесение фуллерена C60 приводило к ускорению процесса заживления, как при раневом поражении, так и при ожоге NaOH. У мышей, получавших фуллерен, увеличивалась экспрессия генов HMGb1 и VEGF-A, что может свидетельствовать о наличии активного регенеративного процесса в коже. У животных также наблюдалось подавление экспрессии генов TNF α , IL1 α , IL1 β , IL6, ответственных за поддержания процесса воспаления. Кроме того, гистологические анализы, особенно при моделировании щелочного ожога, подтверждали заметное улучшение состояния кожного покрова.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что фуллерен C60 в форме водного раствора обладает противовоспалительной активностью и способен стимулировать регенеративные процессы в коже при раневых и химических поражениях.

**Степанова А.В.¹, Кочегура Т.Н.²,
Ефименко А.Ю.³, Шестакова Е.А.⁴,
Скляник И.А.⁴, Кулебякин К.Ю.^{1,3}**

¹ Факультет фундаментальной медицины
МГУ им. М.В. Ломоносова

² Медицинский научно-образовательный центр
МГУ им. М.В. Ломоносова

³ Институт регенеративной медицины,
Медицинский научно-образовательный центр
МГУ им. М.В. Ломоносова

⁴ ФГБУ «Эндокринологический научный центр»
Минздрава России
konstantin-kuleb@mail.ru

ИЗМЕНЕНИЕ АДИПОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

На настоящий момент в литературе описано снижение пролиферативного потенциала и изменение биологических свойств мезенхимных стромальных клеток (МСК) при хронических заболеваниях. Однако недостаточно охарактеризованы особенности изменения МСК при метаболических и эндокринных нарушениях, в частности таких, как инсулинорезистентность (ИР), которая является важным фактором в патогенезе сахарного диабета 2 типа (СД2) и его связи с ожирением. По данным многих научных исследований функциональная активность МСК, выделенных из жировой ткани и костного мозга пациентов с длительным течением СД2 и плохо контролируемым показателями гликемии, значительно снижена. В нашей лаборатории было обнаружено, что количество циркулирующих прогениторных клеток в периферической крови больных ишемической болезнью сердца, сочетающейся с СД2, коррелирует с уровнем гипергликемии и степенью декомпенсации

нарушений углеводного обмена. Кроме того, при культивировании МСК в условиях высокой концентрации глюкозы (25 мМ) изменяется уровень экспрессии генов факторов, регулирующих ангиогенез, снижается способность МСК стимулировать рост новых сосудов. Таким образом, более подробное изучение особенностей влияния ИР на адипогенную дифференцировку МСК позволит лучше понять патогенез прогрессирования СД2 и роль МСК в этом процессе. Целью настоящей работы является изучение адипогенного потенциала МСК жировой ткани, полученных от пациентов с ИР. Степень ИР у пациентов оценивалась методом гиперинсулинемического-эугликемического клэмпса. МСК, выделенные по стандартному протоколу, подвергались дифференцировке в адипогенном направлении. ИР МСК была подтверждена снижением фосфорилирования протеинкиназы Б в ответ на стимуляцию инсулином. Оценка эффективности дифференцировки проводилась в динамике с помощью методов ПЦР в реальном времени по генетическим маркерам (PPARG, C/EBP β , Adiponectin) и морфологического окрашивания липидных капель (OilRedO). В результате нами было показано, что ИР значительно изменяет дифференцировочный потенциал МСК в адипогенном направлении. При цитохимическом окрашивании в формирующихся адипоцитах из МСК, полученных от здоровых доноров, наблюдается равномерное распределение мелких липидных капель в большинстве клеток, в отличие от адипоцитов, полученных от доноров с ИР, которые формируют кластеры клеток с крупными липидными каплями, окруженные недифференцированными клетками, лишенными липидных включений. В то же время, данные ПЦР демонстрируют значительно более высокую экспрессию адипогенных факторов в МСК от пациентов с ИР. Полученные результаты позволяют предположить, что при развитии инсулиновой резистентности происходит снижение адипогенного потенциала МСК, сопряженное с усилением накопления липидных капель в дифференцирующихся клетках.

Финансирование исследования: *Исследования выполнены за счет гранта РФФИ № 14-35-00026 и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Дыйканов Д.Т.¹, Кулебякина М.А.¹,
Кулебякин К.Ю.¹, Рубцов Ю.П.¹, Семина Е.В.²,
Ткачук В.А.²**

¹ Факультет фундаментальной медицины
МГУ им. М.В. Ломоносова

² ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр кардиологии»
Минздрава России
surina.mary@gmail.com

ВЛИЯНИЕ УРОКИНАЗЫ И УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ IN VIVO

Система активаторов плазминогена урокиназного типа, или урокиназная система, включает в себя сериновую протеазу урокиназу (uPA), урокиназный рецептор (uPAR) и ингибиторы (PAI1 и PAI2). Урокиназная система осуществляет запуск каскадов внеклеточного протеолиза и внутриклеточной сигнализации, опосредуя миграцию, пролиферацию

и выживаемость клеток. В нескольких работах была показана важная роль урокиназной системы в регуляции адаптивного иммунного ответа, в частности, в регуляции активности Т-хелперных лимфоцитов первого (Gyetkoetal 2002, PMID:11777975) и второго (Gyetkoetal 2004, PMID:14688127) типов, а также в активации регуляторных Т-лимфоцитов (Heetal 2012, PMID:23169000). Несмотря на эти данные, молекулярные механизмы участия uPA и uPAR в регуляции иммунного ответа до конца не изучены; кроме того, недостаточно данных о влиянии uPA и uPAR на цитотоксические (CD8⁺) Т-лимфоциты, которые обеспечивают клеточный цитотоксический иммунный ответ, а также участвуют в патогенезе посттрансплантационных осложнений и аутоиммунных заболеваний. Целью данной работы стала оценка влияния uPA и uPAR на функционирование CD8⁺ лимфоцитов мыши. В работе использовали мышей нескольких линий: нокаутированных по гену урокиназного рецептора (линия uPAR-KO), нокаутированных по гену урокиназы (линия uPA-KO), а также линии мышей дикого типа (WT). Суспензию белых клеток селезенки получали по стандартному протоколу, после чего окрашивали с использованием антител, специфичных к CD8 α . Анализ окрашивания проводили методом проточной цитометрии. Оценка уровня экспрессии CTLA-4 (молекулы, экспрессируемой активированными Т-лимфоцитами и ингибирующей их пролиферацию) на уровне мРНК осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени. Для этого CD8⁺ лимфоциты выделяли из суспензии белых клеток селезенки на клеточном сортере (FACS Aria, BDBiosystems), после чего из CD8⁺ лимфоцитов выделяли тотальную РНК. Нами было обнаружено, что у uPAR-KO мышей (в возрасте 8 нед.) наблюдается повышенное содержание CD8⁺ клеток в селезенке по сравнению с мышами дикого типа (9,84 \pm 0,2 млн у uPAR-KO, 4,07 \pm 0,28 млн у WT). Однако в более молодом возрасте (2 нед.) содержание CD8⁺ клеток у животных дикого типа и uPAR-KO мышей статистически не различается (0,75 \pm 0,06 млн у uPAR-KO, 0,82 \pm 0,14 млн у WT). Анализ содержания мРНК Ctla4 показал, что у uPAR-KO мышей (в возрасте 8 нед.) его экспрессия в 2,9 раза ниже по сравнению с мышами WT. У uPA-KO мышей в возрасте 8 недель также наблюдается повышенное содержание CD8⁺ лимфоцитов по сравнению с контрольными животными (5,72 \pm 0,89 млн у uPA-KO, 1,46 \pm 0,44 млн у WT). Экспрессия гена Ctla4 в субпопуляции CD8⁺ лимфоцитов у uPA-KO мышей по сравнению с WT мышами также снижена в 4,04 раза. Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие экспрессии урокиназы и урокиназного рецептора повышают пролиферацию CD8⁺ Т-лимфоцитов. В обоих случаях это происходит по механизму, связанному с изменением уровня экспрессии гена Ctla4.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086) и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*