

ем инфраструктуры ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова».

**Шаронов Г.В.¹, Балацкая М.Н.²,
Гончарук С.А.³, Белоглазова И.Б.⁴**

¹ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН

² Факультет фундаментальной медицины
МГУ им. М.В. Ломоносова

³ Биологический факультет
МГУ им. М.В. Ломоносова

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр кардиологии»
Минздрава России
sharonov@gmail.com

ЛИПИД-ОПОСРЕДОВАННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ НАВИГАЦИОННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ, ИХ МЕХАНИЗМЫ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В МОРФОГЕНЕЗЕ КЛЕТКИ

В живом организме все процессы скоординированы. Координация есть на всех уровнях структурной организации, в том числе на клеточном и субклеточном. Движение и изменение формы клетки в процессе морфогенеза является ярким примером координации множества молекулярных реакций во всех областях клетки, для чего существуют механизмы быстрой коммуникации между разными участками клетки. Некоторые посредники такой коммуникации хорошо известны — это кальций, цАМФ, пероксид водорода, инозит-3-фосфат. Однако, их недостаточно для координации морфогенеза клетки, при котором основная активность сосредоточена на плазматической мембране. В исследованиях клеточного морфогенеза сейчас все большее внимание уделяют коммуникациям посредством липидов и цитоскелета, однако их механизмы остаются неясными. В своей работе мы изучали навигационные рецепторы, т.е. рецепторы, инициирующие изменение морфологии и/или положения клетки в ответ на внешние стимулы. Это были рецепторы из различных суперсемейств: рецепторная тирозиназная киназа EphA2, рецептор нейротрофических факторов p75NTR, гликозилфосфатидилинозит-заякоренные белки эфрин-A1 и uPAR. Мы обнаружили, что активность и свойства этих рецепторов взаимозависимы. Установлено, что экспрессия p75NTR влияет на уровень поверхностной экспрессии, подвижность и активность других рецепторов. Активация p75NTR фактором роста нервов снимает эти эффекты и даже изменяет их знак. При этом прямого взаимодействия между рецепторами не выявлено, а их взаимное влияние более выражено при низких уровнях экспрессии. Мы предположили, что взаимосвязь между рецепторами опосредована фосфатидилинозит-фосфатами (ФИФ). Известно, что ФИФ взаимодействуют с исследуемыми рецепторами и влияют на их поверхностную экспрессию, подвижность и активность. Ограниченное количество ФИФ на плазматической мембране приводит к конкуренции рецепторов за этот компонент, что объясняет зависимость взаимовлияния рецепторов от уровня их экспрессии. Для проверки гипотезы об участии ФИФ в коммуникации между рецепторами мы ввели точечные аминокислотные замены в p75NTR и EphA2, дестабилизирующие их взаимодействие с ФИФ. Мутантные фор-

мы рецепторов утратили чувствительность к другим рецепторам, что свидетельствует в пользу нашей гипотезы. ФИФ является необходимым кофактором ГТФаз, регулирующих перестройку примембранного цитоскелета и везикулярного транспорта — процессов, играющих центральную роль в морфогенезе клетки. На основании наших и литературных данных мы предлагаем схему координации клеточной адгезии, перестройки примембранного цитоскелета и везикулярного мембранного транспорта, учитывающую конкуренцию ключевых регуляторов этих процессов за ФИФ.

Финансирование исследования: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-24-00086) и частично с использованием оборудования ЦКП ИБХ (УИН RFMEFI62117X0018).

Шафеев Е.В.

Институт биологии развития им. Кольцова
elenamallakhova@gmail.com

КЛЕТКИ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO ПРОЯВЛЯЮТ СПОСОБНОСТЬ К НЕЙРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) образуется из одной нейрозпителиальной закладки с нейронами сетчатки, благодаря этому клетки РПЭ могут быть использованы для терапии сетчатки после повреждений. В определенных условиях РПЭ может проявлять пластичность, меняя свой путь дифференцировки. Так, РПЭ низших позвоночных способен репрограммироваться в мультипотентные клетки, способные дифференцироваться во все типы клеток сетчатки и полностью восстанавливать её после повреждений (Grigoryan, 2015). Одним из ключевых факторов де- и трансдифференцировки является основной фактор роста фибробластов (bFGF). Целью работы было исследовать возможности к нейральной дифференцировке клеток РПЭ человека под влиянием bFGF. В работе была использована линия клеток РПЭ человека ARPE-19. Культивирование осуществляли в среде DMEM/F-12, дополненной 10% ЭТС, L-глутамином, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C и 5% CO₂. Пассирование клеток проводили смесью растворов 0.25% трипсина и 0.48 mM версена в соотношении 1:3. Для оценки действия bFGF добавляли в количестве 20 нг/мл в ростовую среду того же состава, но с разным содержанием ЭТС (0 или 1%). Контролем служили клетки, культивированные без bFGF. Для оценки дифференцировки использовали иммуноцитохимическое окрашивание и ПЦР в реальном времени. Оценка пролиферативной активности клеток проводили с помощью МТТ-теста. Данные иммуноцитохимического анализа выявили понижение эпителиальной и начало нейрональной дифференцировки ARPE-19 под действием bFGF. По мере культивирования снижалась интенсивность окрашивания на Sx43 (ключевой белок щелевых контактов, играющий важную роль в дифференцировке РПЭ) и увеличивалась интенсивность окрашивания на TUBB3 (маркер ранней фазы дифференцировки нейронов сетчатки: колбочек, горизонтальных, амакриновых и ганглиозных клеток), в том числе в клетках с аксоноподобными отростками. Через 120 ч. Sx43-окрашивание определялось на поверхности лишь небольшого числа клеток. Около 20% клеток

приобрели нейроноподобную морфологию и длинные аксоноподобные отростки, дающие выраженное положительное окрашивание на маркеры нейральной дифференцировки. ПЦР в реальном времени подтвердил данные иммуноцитохимического исследования. Впервые показано, что после добавления bFGF в клетки РПЗ резко возростала экспрессия мРНК гена плюрипотентности KLF4, которое сопровождалось значимым падением экспрессии PAX6, MITF и OTX2, что свидетельствовало о дедифференцировке РПЗ. С течением времени уровень экспрессии мРНК KLF4 снижался, что сопровождалось трехкратным ростом экспрессии мРНК TUBB3, и одновременно возвратом экспрессии PAX6, MITF и OTX2 к базовому уровню. Проведенное исследование показало, что bFGF имеет двойственное влияние на ARPE-19: активировать мультипотентный статус клеток, а затем направлять их по пути нейральной дифференцировки.

**Онопrienko Г.А., Волошин В.П.,
Шевырев К.В.**

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
skv-moniki@yandex.ru

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Проведен комплекс экспериментальных исследований на животных (собаки) по моделированию различных повреждений и последствий повреждений длинных трубчатых костей, наиболее распространенных в клинической практике. Визуализация микроциркуляторного русла костной ткани осуществлена с использованием собственных оригинальных методик. Выявлена высокая устойчивость компактной костной ткани диафиза к продолжительной посттравматической ишемии за счет возможности интерстициального пространства костного матрикса обеспечивать адекватный объем внесосудистой микроциркуляции кровеносной плазмы и тканевой жидкости. Установлено также длительное сохранение функции микроциркуляторного русла костной ткани до восстановления естественного кровотока по мере развития сосудистых коллатералей. При диафизарных переломах динамика репаративных процессов в условиях обеспечения и сохранения плотного контакта костных фрагментов на весь период консолидации стереотипна и наблюдается практически после всех видов стабильного остеосинтеза (включая интрамедуллярный с рассверливанием внутрикостной полости). При этом констатируется прямой остеогенез, где пролиферирующая микроваскулярная сеть и остеогенная клеточно-волоконистая ткань, исходящие из медуллярной полости и гаверсовой системы кортикальных пластинок концов отломков, формируют эндостально-кортикальный костный регенерат небольшого объема и без соединительнотканых элементов, а также без заметного периостального костеобразования. Различия — лишь в сроках и масштабах репаративных процессов, которые полностью обусловлены «первичными» циркуляторными расстройствами, т.е. наступившими однократно в результате непосредственно травмы и последующего хирургического вмешательства (osteosynthesis). Проведенные экспериментальные исследования косвенно свидетельствуют о наличии взаимно-oste-

оиндуцирующего воздействия концов костных фрагментов. С учетом данных литературы, это может быть обусловлено мощным остеиндуцирующим воздействием костных морфологических белков «молекулярных регуляторов остеогенеза». Остеиндуцирующее взаимодействие костных фрагментов максимально при наличии их плотного контакта и минимально при диастазе до величины поперечника диафиза. В случаях наступления нестабильности остеосинтеза непрерывный поток клеточного расхода индуцирует избыточную сосудистую пролиферацию на фоне сохранения тканевой гипоксии, отсутствия оксигенической среды для реализации остеобластогенеза. Пролиферирующий пул стволовых стромальных клеток-предшественников на периостальной поверхности концов отломков дифференцируется в направлении фибро- и хондрогенеза. Периостальный остеогенез при этом является фактически резервным источником костеобразования, который проявляется в недостаточно стабильных условиях. Наибольшие деструктивные последствия наступают при нестабильности металлического имплантата.

Шехтер А.Б., Курков А.В., Файзуллин А.Л.

Институт регенеративной медицины,
ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет)
a.shehter@yandex.ru

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Тканевая инженерия в настоящее время считается ведущим направлением в регенеративной медицине. Тканеинженерные конструкции (ТИК), состоящие из скаффолдов (матриц) и культивируемых на них клеток, используются в реконструктивных операциях в разных областях медицины. Предложены многочисленные скаффолды из самых разнообразных натуральных, синтетических и гибридных биоматериалов. К скаффолдам предъявляют следующие требования: 1) адекватные механические свойства; 2) биосовместимость (отсутствие токсигенных, иммуногенных и аллергенных свойств); 3) регулируемая биodeградация; 4) отсутствие выраженных воспалительных и дистрофических тканевых реакций; 5) замещение в нужные сроки тканями организма без рубцевания. Желательно, чтобы скаффолд обладал пористой структурой, обеспечивающей прорастание сосудов и клеток реципиента. Для адекватной оценки перспективности скаффолдов необходимы сравнительные морфологические исследования самих скаффолдов и тканевой реакции на их имплантацию *in vivo*. К сожалению, такие исследования в научной литературе немногочисленны. Мы располагаем большим опытом морфологического исследования различных скаффолдов на основе коллагена, гиалуроновой кислоты, хитозана, растворимых полимеров, а также гибридных материалов с использованием гистохимии, специальных светоптических методик, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, мультиспектральной и атомно-силовой микроскопии. Изучалась структура скаффолдов, их биосовместимость, биodeградация и тканевая реакция при имплантации в жировую клетчатку и в мышцы, а также при тканевой инженерии уретры, трахеи, хряща и кости. Проводилось сравнительное изучение скаффолдов на основе ре-