

## ДЕЙСТВИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ОПЕРАЦИОННОЙ РАНЫ У КРЫС

Заира Магомедовна Абдулатипова,  
Ирина Евгеньевна Трубицына

ГБУЗ Московский клинический научный центр  
им. А.С. Логинова ДЗМ, Москва, Россия

z.abdulatipova@mknc.ru

**Введение.** Отсутствует ясность и понимание механизмов «качественного» и «некачественного» заживления. Вопросы регенерации и репарации тканей базируются на фундаментальных научных исследованиях молекулярной и клеточной биологии. В последние годы во всем мире стали активно изучать и применять клеточные технологии для индукции восстановительных процессов. Применение новых технологий может стать наиболее эффективным методом лечения.

**Цель.** Изучить механизмы повреждения и защиты, обусловленные БАС в слизистой оболочке желудка и периферической крови, их изменения при хирургических ранах желудка в эксперименте на разных этапах патологического процесса.

**Материал и методы.** Использовали 60 белых крыс линии Wistar. Создана модель послеоперационной раны желудка. Выполнено 2 серии опытов: с однократным и двукратным введением аллогенных МСК. Введение аллогенных МСК КМ, как и физиологического раствора, осуществляли внутривентриально. В первой серии опытов клеточный препарат в дозе 3,5 млн. клеток вводили крысам однократно на 3 сутки после операции. Во второй серии опытов аллогенные МСК вводили крысам дважды на 3 сутки и на 6 сутки. Контроль – интактным одно- или двукратно вводили физиологического раствор.

**Результаты и обсуждение.** В группе контроля в 40% выявлена воспалительная реакция и расхождение швов. В серии исследований с однократным введением МСК на 3 сутки воспаление и расхождение шва было в 10% животных. В группе животных при двукратном введении осложнений не было. Для оценки цитокинового статуса в сыворотке крови животных определяли содержание про- (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) и противовоспалительных цитокинов (IL-4). Через 24 часа после ушивания операционной раны в сыворотке крови повышалась концентрация провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ). При низком содержании ротивовоспалительного интерлейкина (IL-4). После введения аллогенных МСК снижалось содержание TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IFN $\gamma$  и повышался IL-4.

**Заключение.** Установлена положительная динамика регенераторных процессов в зоне операционной раны под влиянием МСК. Эти процессы связаны с позитивным иммунорегуляторным действием МСК. После введения МСК восстанавливается соотношение про- и противовоспалительных цитокинов и активируется морфогенетическая функция иммуноцитов. Отражением этих процессов является отсутствие поздних осложнений заживления операционной раны.

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА GFAP — СПЕЦИФИЧЕСКОГО МАРКЕРА АСТРОЦИТОВ

Александр Андреевич Авдеев<sup>1</sup>, Елена Викторовна Григорьева<sup>1-4</sup>, Софья Викторовна Павлова<sup>1-3</sup>, Сергей Петрович Медведев<sup>1-4</sup>, Анастасия Александровна Малахова<sup>1-4</sup>, Сурен Минасович Закиян<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия;

<sup>4</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

avdeev@bionet.nsc.ru

Исследование астроглиальных клеток представляет большой интерес при изучении процессов нейродегенерации и нейропластичности. Клетки астроглии выполняют важные функции в гомеостазе нейронов и регуляции синаптической пластичности, влияют на выброс проапоптотических факторов. Для изучения механизмов взаимодействия астроглии с нейронами *in vitro* важным условием является получение чистых популяций целевых типов клеток. Несовершенство протоколов дифференцировки ИПСК приводит к незначительному выходу релевантных типов клеток. Решением этой проблемы может стать отбор целевых клеток с использованием интегрированных в геном флуоресцентных репортеров, которые помогают осуществлять визуализацию экспрессии специфических генов-маркеров. Ранее нами была получена линия ИПСК, в которой репортерный ген *RFP* маркировал экспрессию астроцит-специфического гена *GFAP*. ОТ-ПЦР анализ выявил наличие РНК-продукта гена *RFP* в дифференцированных производных, однако свечение флуоресцентного белка не регистрировалось. Вероятно, это связано с низкой активностью промотора гена *GFAP*, недостаточной для визуализации свечения *RFP* при помощи флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. В настоящей работе проведена оптимизация системы визуализации экспрессии целевого гена. В локус *AAVS1* при помощи системы CRISPR/Cas9 внесли репортерную конструкцию *LoxP-GFP-LoxP-RFP* под контролем конститутивного промотора *Pgk1*. Непосредственно за маркерным геном *GFAP* через 2A-пептид помещена последовательность гена *Cre*-рекомбиназы. В отсутствие активности гена *GFAP* в клетках экспрессируется белок *GFP*. После активации *GFAP* в клетках нарабатывается *Cre*-рекомбиназа, обеспечивающая удаление последовательности гена *GFP* вместе со стоп-кодоном из генома. В результате активируется ген *RFP*, и клетки приобретают красное свечение. Активность репортерной системы подтверждена на клетках линии HEK293A, в геном которой внесли конструкцию *LoxP-GFP-LoxP-RFP*. Временная экспрессия *Cre*-рекомбиназы осуществлялась с плазмиды *pCAG-Cre:GFP* (Addgene #13776). Для подтверждения работы созданной нами системы визуализации необходима интеграция обоих трансгенов в геном ИПСК и проведение направленной дифференцировки. Система позволит выявить наличие астроглиальных производных в смешанной популяции дифференцированных клеток человека.

*Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН 1.2.44 и бюджетным проектом 0259-2019-0002.*

### **ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ВЕГЕТАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У КРЫС ЛИНИИ SHR**

**Виктория Сергеевна Айдарова, Владислав Георгиевич Бабийчук, Иван Иванович Ломакин, Ольга Валентиновна Кудокоцева**

*Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины, Харьков, Украина*

aidarova@karazin.ua

Анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) позволяет оценить состояние и общую активность в организме человека и животных механизмов регуляции физиологических функций и его адаптационных резервов. Цель — изучить влияние последовательного применения краниocereбральной гипотермии (КЦГ) и криоконсервированных клеток пуповинной крови (кПК) на показатели ВСР у крыс линии SHR с генетически детерминированной АГ.

Объект исследования — 12-месячные крысы SHR, которым проводили сеанс КЦГ на аппарате «Флюидокраниотерм ПГВ-02», после чего внутривентриально вводили суспензию кПК человека ( $5 \times 10^8$  клеток/кг). Регистрацию ЭКГ у животных осуществляли на 7 и 30 сутки после проведения КЦГ и введения кПК на электрокардиографе серии «Поли-Спектр» («Нейро-Софт», Россия) во 2-м стандартном отведении. Спектральный анализ ВСР проводили с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм».

Показано, что у крыс SHR отмечаются изменения вегетативного баланса, выражающиеся в низкой синхронизации регуляторных составляющих и возрастании симпатического звена, что свидетельствует о снижении уровня нейрогуморальной регуляции и наличии явлений перенапряжения и астенизации в регуляторных отделах ЦНС у животных с хронической формой АГ. Анализ характера изменений ВСР на 7 сутки после применения КЦГ и кПК позволил оценить последовательные воздействия как факторы, направленные на активацию адаптационно-компенсаторных процессов со сбалансированностью ваго-симпатических взаимоотношений и нейрогуморальных факторов регуляции. К 30 суткам после воздействий у крыс с АГ отмечалось снижение симпатикотонических влияний. Снижение значимости нейро-гуморальной составляющей в регуляции сердечного ритма сопровождалось сохранением преобладания вагусной составляющей (по соотношению общих значений и динамики изменений LF и HF). Таким образом, возможности адаптационно-компенсаторных реакций у крыс линии SHR после сочетанного применения КЦГ и кПК сохраняются на более высоком уровне, чем в группе контроля без воздействий.

### **ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕГМЕНТА ТРАХЕИ ПРИМАТОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ТРАНСПЛАНТАТА**

**Андрей Леонидович Акопов<sup>1</sup>, Гарри Вазгенович Папаян<sup>1</sup>, Станислав Дмитриевич Горбунков<sup>1</sup>, Д.Д. Карал-Оглы<sup>2</sup>, П.А. Капланян<sup>2</sup>, Сергей Владимирович Орлов<sup>2</sup>, Елена Александровна Губарева<sup>3</sup>, Елена Вячеславовна Куведза<sup>3</sup>, Дарья Михайловна Кузнецова<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;*

<sup>2</sup> *НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия;*

<sup>3</sup> *Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия*

akopovand@mail.ru

Циркулярная резекция трахеи при удалении более 50% ее длины связана со значительными рисками развития осложнений и летальности. Путь к решению данной проблемы, возможно, лежит в создании тканеинженерной конструкции трахеи, которая может быть использована для замещения удаленного участка. Основной причиной неудач при трансплантации является потеря каркасной функции и недостаточное формирования эпителиальной выстилки на внутренней поверхности трахеи. Для предупреждения осложнений необходимо, как минимум, добиться ревазуляризации трансплантированного органа, с целью чего предложено производить предварительную гетеротопическую имплантацию донорского органа в хорошо васкуляризованные ткани реципиента. Обычным визуальным осмотром доказать наличие хорошей ревазуляризации трансплантата *in vivo* не удается. Эту задачу можно решить методом индоцианиновой ангиографии, основанной на системном вводе в кровотоки индоцианина зеленого, с последующим наблюдением зоны интереса в свете инфракрасной флуоресценции.

В эксперименте использовались донорские трахеи двух самцов павиана гамадрила. Децеллюляризацию обеих трахей проводили по единому протоколу с использованием детергент-энзиматического метода. В качестве реципиентов выбраны два здоровых павиана гамадрила. Проведена имплантация в участок широчайшей мышцы спины двух реципиентов (павианы гамадрилы) сегментов трахеи длиной 4 см до и после рецеллюляризации. Наличие ревазуляризации в трансплантате трахеи оценивали через 60 суток после операции с использованием индоцианиновой флуоресцентной ангиографии.

Через 60 суток после имплантации фрагменты трахеи обнаружены у обоих животных, хрящевой каркас макроскопически представлялся сохраненным, плотно интегрированным в мышечную ткань, естественного цвета, однако мембранозная стенка трахеи и просвет трахеи отсутствовали. Методом индоцианиновой флуоресценции у обоих животных удалось визуализировать сосуды трахеи, а также четко различить межхрящевые сосуды и участки хрящевых полуколец, лишенные сосудов. Имплантированные сегменты практически равномерно васкуляризованы, локальных нарушений кровоснабжения не отмечалось.

Имплантация тканеинженерного комплекса трахеи, как подвергнутого рецеллюляризации, так и без нее, сопровождается включением трансплантированного сегмента трахеи в кровотоки через 60 суток после имплантации. Флуоресцентная ангиография является информативным методом оценки ревазуляризации трахеи приматов без эвтаназии животного.