

реализации цитотоксического эффекта сопровождающей фармакотерапии путем ее правильного подбора.

### **ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ, ПОЛУЧЕННОЙ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК ЧЕЛОВЕКА В ОСТЕОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ**

**Светлана Алексеевна Александрова<sup>1</sup>, Юлия Александровна Нащекина<sup>1</sup>, Михаил Георгиевич Хотин<sup>1</sup>, Сергей Викторович Надеждин<sup>2</sup>, Екатерина Владимировна Зубарева<sup>2</sup>, Любовь Анатольевна Покровская<sup>3</sup>, Миральда Ивановна Блинова<sup>1</sup>, Наталья Аркадьевна Михайлова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Белгородский национальный исследовательский университет, Белгород, Россия;

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

alekssvet2205@gmail.com

Изучение специфической активности секрета мезенхимных стволовых клеток (МСК) может представлять как фундаментальный, так и прикладной интерес. Целью настоящей работы являлась оценка влияния на адгезионные, пролиферативные и дифференцировочные свойства кондиционированной среды (КС), полученной в процессе культивирования МСК человека, направленных в остеогенную дифференцировку.

Клетки линии FetMSC (выделены из МСК костного мозга эмбриона человека, предоставлены РККП, ИИЦ РАН, Санкт-Петербург) культивировали с использованием роботизированной станции Compact Select T (Sartorius). Клетки культивировали в питательной среде с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки до клеточной массы  $7 \times 10^9$  клеток, затем инкубировали в остеогенной и бессывороточной средах. После сбора наработанной клетками КС она была отцентрифугирована, профильтрована и сконцентрирована. Полученный концентрат (ККС) подвергали диализу, высушивали и растворяли в бессывороточной среде ДМЕМ (Росмедбио, РФ).

Исследовали активность ККС при разведении его в 50 (0,66 мг/мл) и 100 (0,33 мг/мл) раз. Влияние ККС на адгезионные свойства FetMSC регистрировали после окраски цитоскелета клеток родамин-фаллоидином. Было выявлено усиление степени распластанности клеток через 2 ч инкубации по сравнению с контролем — в присутствии 0,33 мг/мл ККС клетки были распластаны в 3 раза больше, 0,66 мг/мл — почти в 4 раза. Пролиферативная активность FetMSC через 7 сут. инкубации в присутствии ККС (обеих концентраций) соответствовала уровню значений в контроле (МТТ-тест). Также было выявлено, что в присутствии ККС (0,66 мг/мл) без добавления остеоиндуктивных факторов МСК направляются в остеогенную дифференцировку. Так, с помощью конфокальной микроскопии было обнаружено превышение значений флуоресценции для факторов транскрипции Runx2, Osterix и YAP1 после 14 сут. культивирования по сравнению с контролем. Значения окраски на щелочную фосфатазу в клетках на 7 сут. была сравнима, а на 14 сут. — значительно превышала значения, полученные для положительного контроля. Уровень накопления ионов кальция в цитоплазме клеток на 14 сут. культивирования был одинаковым с положительным контролем.

Таким образом, экспериментальный образец ККС, полученный в процессе дифференцировки линии МСК человека в остеогенном направлении, обладает адгезионной, пролиферативной и остеоиндуктивной активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517XO164.

### **ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ПРОЛЕЖНЕВОГО ДЕФЕКТА**

**Наталья Андреевна Александровна<sup>1,2</sup>, Владимир Сергеевич Попов<sup>2</sup>, Наталия Владимировна Данилова<sup>1</sup>, Александр Вадимович Лобода<sup>2</sup>, Павел Георгиевич Мальков<sup>1,2</sup>, Павел Игоревич Макаревич<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

n.alexandrushkina@gmail.com

Трансплантация стволовых и дифференцированных клеток в организм человека с целью восстановления поврежденных тканей нашла широкое применение во многих областях медицины. Однако ограничения, связанные с массовой гибелью и низкой выживаемостью клеток при инъекционном введении, поставили новые задачи в этой области. Одним из решений стало применение клеточных пластов (КП) — многослойных конструкций из клеток и наработанного ими внеклеточного матрикса. Клетки в составе КП характеризуются высокой жизнеспособностью, а присутствие матрикса и заякоренных в нем растворимых факторов способствует большей эффективности при использовании в терапии.

Для изучения эффективности мезенхимных стромальных клеток (МСК) для заживления пролежней нами была использована мышьяная модель пролежневого дефекта. Трансплантацию сингенных МСК осуществляли путем микроинъекций в края раны или аппликацией КП на ее поверхность. В группе сравнения использовали введение кондиционированной среды МСК, содержащей растворимые факторы, вырабатываемые клетками. Заживление дефекта оценивали по скорости уменьшения площади дефекта на макрофотографиях и по динамике изменения толщины грануляционной ткани (ГТ), а также плотности сосудов и зоны фиброза на 3, 7, 14 и 21 сутки на срезах ткани.

Трансплантация КП значительно ускорила заживление дефекта по сравнению с контролем и другими группами — к 21 дню в группе КП у 100% животных наблюдалось полное закрытие дефекта. Морфометрический анализ гистологических срезов показал, что толщина ГТ в зоне дефекта значимо увеличена в группе применения КП на 7 день наблюдения по сравнению с остальными группами. Кроме того, трансплантация КП приводит к ускорению процесса фиброобразования ткани — уже на 14 день наблюдалось активное созревание ГТ с образованием рубца, в то время как в остальных группах процесс был либо слабо выражен (суспензия МСК, кондиционированная среда), либо отсутствовал (группа без терапии).

Применение КП из МСК продемонстрировало высокую эффективность в заживлении пролежневого дефекта по сравнению с отрицательным контролем и применением клеток в суспензии (по скорости закрытия дефекта, показателям формирования ГТ и рубца), что подтверждает перспективность применения КП для стимуляции заживления пролежней, а также дает возможность более детально изучить механизмы, ответственные за эти процессы.

*Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова и поддержано грантами РФФИ № 17-04-01452 и Президента РФ № МК-1068.2019.7.*

### **ВЛИЯНИЕ КОРОТКОГО ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ФЕНОТИП И СЕКРЕТОМ МОНОЦИТ-ПРОИЗВОДНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ**

**Ольга Юрьевна Алексеева, Полина Ивановна Бобылева, Елена Ромуальдовна Андреева**

*ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

alekseeva.olgay@gmail.com

Гипоксические условия оказывают значимое регуляторное воздействие на свойства мезенхимальных стромальных клеток (МСК), а также моноцитпроизводных макрофагов (МН/МФ), что может повлиять на результат взаимодействия этих клеток.

**Цель:** изучение влияния гипоксического стресса на фенотип и секретом МН/МФ при прямом и паракринном взаимодействии с МСК *in vitro*.

Моноциты (МН) выделяли из фракции мононуклеаров периферической крови человека, а МСК из жировой ткани человека и культивировали в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Для оценки функционального статуса и активности МН/МФ проводили их со-культивирование с МСК. Со-культивирование проводили в течение 6 дней, после чего клетки подвергались короткому (24 ч) гипоксическому воздействию (1% O<sub>2</sub>). Фенотип МН и МН/МФ был охарактеризован методом проточной цитометрии по следующим маркерам — созреванию (CD11b), провоспалительная активация (CD80, CD86, HLA-DR) и M2 (противовоспалительный) фенотип (CD163, CD206). Изменение экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов определяли при помощи полимеразно-цепной реакции. Паракринный профиль МН/МФ оценивали по внутриклеточному содержанию цитокинов с помощью твердофазного иммуно-ферментного анализа.

В присутствии МСК МН/МФ проявляли признаки M2 поляризации, о чем свидетельствовало увеличение экспрессии CD163 и CD206.

Поляризация фенотипа МН/МФ в присутствии МСК, как считается, сопровождается сдвигом профиля продукции растворимых медиаторов. Мы не обнаружили при взаимодействии МН/МФ с МСК изменения транскрипционной активности *IL10*, *IL12*, *TNFA*. В тоже время, отмечено достоверное увеличение транскрипционной активности *IL6* при паракринном взаимодействии с МСК. Гипоксический стресс вызывал достоверное повышение экспрессии *IL6* в МН/МФ.

Оценка внутриклеточного содержания цитокинов *IL-6*, *IL-10*, *TNF-α* в МН/МФ показала многократное увеличение концентрации *IL-6* при взаимодействии с МСК, что

подтвердило формирование МН/МФ фенотипа, обозначаемого как МСК-обученные макрофаги. Мы не выявили изменение внутриклеточного содержания *IL-10* и *TNF-α* в МН/МФ. Короткий гипоксический стресс не влиял на уровень цитокинов *IL-6*, *IL-10*, *TNFα* в МН/МФ в монокультуре и при сокультивировании с МСК.

Короткое гипоксическое воздействие не влияло на фенотип макрофагов, а взаимодействие с МСК усиливало формирование M2 фенотипа и их функциональную активность.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-00942.*

### **ИЗМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ В УСЛОВИЯХ 2D И 3D КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПОСЛЕ СУБЛЕТАЛЬНОГО ТЕПЛООВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

**Лариса Леонидовна Алексеенко, Алиса Павловна Домнина, Ольга Геннадиевна Люблинская, Ирина Викторовна Кожухарова, Наталья Алексеевна Пуговкина, Ирина Исааковна Фридлянская, Николай Николаевич Никольский**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

al.l@mail.ru

Возможность использования мезенхимных стволовых клеток (МСК) для клеточной терапии различных заболеваний является предметом интенсивных исследований. Одним из способов повышения выживаемости трансплантированных клеток является культивирование МСК в виде трехмерных (3D) клеточных агрегатов — сфероидов. Цель настоящей работы — изучение молекулярно-генетического профиля МСК в сфероидах (3D МСК) и монослойных МСК (2D МСК), подвергнутых тепловому стрессу (45°C, 30 мин.). Исследования проводились на мезенхимных стволовых клетках эндометрия человека (эмСК). Для получения 3D сфероидов, эмСК культивировали в висячих каплях. Методами Real-Time PCR и ELISA в 3D эмСК было обнаружено усиление экспрессии противовоспалительных и ангиогенных факторов (TSG-6, HGF, EP2 и VEGF) по сравнению с 2D эмСК. Культивирование клеток в сфероидах приводило к изменению экспрессии генов ремоделирования хроматина (SMARCA1, CHD1, KMT2B и др.), генов EMT/MET переходов (E-cadherin, N-cadherin, TWIST1 и др.) и повышению уровня маркеров плюрипотентности. В 2D и 3D эмСК тепловой шок (ТШ) вызывал активацию защитных механизмов клеток. Через 3 часа после ТШ многократно усиливалась экспрессия генов белков теплового шока (БТШ) HSP40, HSP70 и HSP90, однако паттерн экспрессии БТШ в 3D и 2D эмСК различался. Через 3–6 часов после ТШ была обнаружена гибель 3D эмСК за счет активации апоптозных путей: наблюдалось появление annexin V<sup>+</sup> клеток и активация caspase-3. Жизнеспособность 2D эмСК не отличалась от контрольного уровня, однако в течение нескольких суток после ТШ проявились признаки стресс-индуцированного преждевременного старения (SIPS): арест клеточного цикла, усиление экспрессии p21, изменение клеточной морфологии и появление β-галактозидазной активности. Результаты наших исследований выявили различия в паттерне экспрессии генов, составе секретируемых факторов, а также реализации стресс-активируемых защитных механизмов в 2D и 3D эмСК. При одинаковом тепловом воздействии 3D эмСК