и при внутрикостной имплантации костная ткань образовывалась преимущественно в центре материала, формируя первичные остеоны и наслоения молодой пластинчатой костной ткани, соответственно составляя 17±10% и 25±11% относительно исходного объёма материала.

Работа выполнена за средства госзадания для ФГБНУ «МГНЦ».

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА CFTR НА МОДЕЛИ КИШЕЧНЫХ ОРГАНОИДОВ ПРИ НОВЫХ И РЕДКИХ МУТАЦИЯХ ГЕНА

Татьяна Борисовна Бухарова[1], Анна Сергеевна Ефремова[1], Наталья Вадимовна Булатенко[1], Юлия Леонидовна Мельяновская[1], Ника Валентиновна Петрова[1], Наталия Юрьевна Каширская[1], Елена Кястутисовна Жекайте[1,2], Рена Абульфазовна Зинченко[1], Елена Ивановна Кондратьева[1,2], Дмитрий Вадимович Гольдштейн[1]

[1] *ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова», Москва, Россия;*

[2] *ГБУЗ МО «Московский областной консультативно-диагностический центр для детей», МО, Мытищи, Россия*

bukharova-rmt@yandex.ru

Введение. Кишечные органоиды (КО) — это самоорганизующиеся структуры из однослойного эпителия по клеточному составу и выполняемым клетками функциям идентичные слизистой кишечника. Они являются 3-D тканеподобной in vitro моделью длительного культивирования, на которой проводят оценку функции белка CFTR для персонализированной диагностики муковисцидоза и изучения влияния таргетных препаратов. Известно более 2000 мутаций гена *CFTR*, большая часть из них редкие или даже уникальные. Форсколиновый тест на КО позволяет исследовать остаточную функцию белка CFTR при любых мутациях гена, в том числе редких или даже единичных, определить их патогенность. Степень набухания КО при стимуляции форсколином коррелирует с остаточной активностью канала CFTR. Кроме того, у органоидов с нарушенной функцией белка редуцирован размер внутренней полости (люмена).

Цель исследования. Оценить функциональную активность канала CFTR у больных муковисцидозом с редкими генетическими вариантами гена *CFTR* c.3274T>C, c.1083G>A и c.1735G>T.

Материалы и методы. Культуры КО получали по стандартным протоколам из ректальных биоптатов пациентов с редкими генетическими вариантами *CFTR* и пациента с распространенным генотипом c.[1521_1523delCTT];[c.1521_1523delCTT] в качестве контроля. Для оценки остаточной функции канала CFTR КО окрашивали Calcein AM и обрабатывали 5 мкМ форсколина в течение 1,5 ч. Использовали таргетные препараты VX-809 (корректор) и VX-770 (потенциатор). Изображения получали с помощью микроскопа Observer.D1 (Zeiss).

Результаты. Органоиды, полученные у пациентов с генетическими вариантами c.1083G>A и c.1735G>T, в ответ на действие форсколина не изменяли морфологию — набухания или увеличения люмена не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии функционального канала CFTR. Для КО с мутацией c.1083G>A было показано умеренное набухание при совместном воздействии VX-809 и форсколина (38±5,2%), что свидетельствует о частичном восстановлении активности CFTR корректором. Органоиды, полученные у пациента с мутацией c.3274T>C, имели сферическую форму, большой размер люмена, тонкие стенки и характеризовались высокой функциональной активностью CFTR. При этом VX-770 усиливал действие форсколина, а VX-809 не влиял на набухание.

Результаты форсколинового теста показывают, что мутации c.1083G>A и c.1735G>T являются «тяжелыми» патогенными и приводят к утрате функции канала CFTR, а мутация c.3274T>C не является клинически-значимой.

Исследование выполнено за счет средств Госзадания для ФГБНУ «МГНЦ».

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК КАРДИОСФЕР

Ю.Д. Василец, К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова

ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

eleagnusom@gmail.com

Разработка новых подходов к восстановлению поврежденного миокарда является одной из важнейших задач современной кардиологии. Однако разработка средств таргетного воздействия требует наличия моделей, которые с определенной долей допущения соответствуют специфическому клеточному микроокружению — «клеточным нишам» (КН), содержащим прогениторные и поддерживающие клетки, компоненты матрикса, сгруппированные в 3D условиях. Подобной 3D моделью КН сердца могут служить кардиосферы (КС).

Цель: разработать метод получения и выполнить характеристику клеточного состава КС.

В работе использованы образцы миокарда мышей C57Bl6. Для получения эксплантной культуры использовалась среда IMDM, содержащая 20% фетальной сыворотки теленка (ФСТ), глутамин, 2-меркаптоэтанол (МЭ), антибиотики; для сборки КС — комбинированная среда 35% IMDM/65% DMEM–F12, содержащая 3% ФСТ, глутамин, МЭ, EGF, bFGF, кардиотрофин-1, тромбин, B27 и антибиотики. Исследование иммунофенотипа проводили с помощью метода иммунофлуоресцентного окрашивания. Пролиферацию оценивали MTT тестом, васкулогенные свойства — Tube assay.

Показано, что культивирование образцов миокарда в виде эксплантной культуры с последующим сбором кардиосферообразующих клеток и их культивированием в соответствующих условиях способствует сборке КС. КС представляют собой 3D сфероиды с высоким уровенем компактизации, состоящие из клеток и белков внеклеточного матрикса. В центральной части КС локализуются клетки, экспрессирующие маркеры стволовых клеток Oct4 и c-kit, которые окружены клетками мезенхимального фенотипа ($CD105^+$, $CD73^+$) и сосудистыми/кардиальными клетками-предшественницами ($Gata4^+$, $Pecam^+$, SMA^+). Пересадка сформированных КС в среду с высоким содержанием сыворотки способствует «разборке» КС и получению 2D гетерогенной культуры клеток. Эти клетки обладают клоногенностью и способностью к тубулогенезу при культивировании на чашках, покрытых Matrigel™. Тубулярные структуры окрашиваются на маркеры эндотелия, что свидетельствует об ангиогенном

потенциале клеток КС. Культивирование клеток КС на чашках, покрытых коллагеном 1 типа или фибронектином, усиливает их пролиферативную активность. Возвращение клеток в среду для КС способствует повторной сборке 3D КС.

Таким образом, нами разработан метод получения КС, которые имеют сходное строение с КН сердца, и могут быть использованы в качестве 3D модели для изучения их регуляции и тестирования фармакологических соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-015-00430.

ПОВЫШЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ТЕРМОТРОПНЫХ ХИТОЗАНОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ

Андрей Вячеславович Васильев[1, 2], Валерия Сергеевна Кузнецова[1], Татьяна Борисовна Бухарова[2], Юрий Дмитриевич Загоскин[3], Елена Валерьевна Галицына[2], Тимофей Евгеньевич Григорьев[3], Сергей Николаевич Чвалун[3], Дмитрий Вадимович Гольдштейн[2], Анатолий Алексеевич Кулаков[1]

[1] *ФГБУ «ЦНИИ Стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия;*
[2] *ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия;*
[3] *НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

vav-stom@yandex.ru

Актуальность. При использовании термотропных композиций на основе хитозановых гидрогелей и β-глицерофосфата в качестве основы для костно-пластического материала мы сталкивались с их низкой биосовместимостью, критическая оценка которой в литературе представлена скудно и не имеет систематических подходов к решению.

Цель исследования: повысить биосовместимость хитозановых гидрогелей за счёт: (1) повышения степени деацетилирования и уменьшения количества свободных аминогрупп; (2) диализа и отмывки буферными системами от остатков β-глицерофосфата и уксусной кислоты; (3) включения в состав гелей высокопористых полилактидных (PLA) гранул.

Материалы и методы. Для получения гидрогелей хитозан растворяли в 0,1 М уксусной кислоте и добавляли 95% водный раствор β-глицерофосфата при 4°С. Для уменьшения степени деацетилирования (DD%) исходный хитозан реацетилировали с 65 до 20 DD%. Для удаления остатков реагентов проводили диализ против воды в течение 3 сут. или добавляли 0,1 М раствора NaOH и 0,1М буфера $NaHCO_3$. Высокопористые PLA-гранулы были получены распылением замороженных эмульсий с применением сублимационной сушки и смешивались с гидрогелем в концентрации 4%, 8%, 16% по массе. Материалы исследовали на модели подкожной имплантации у крыс Wistar. Забор некропсий осуществляли на 14 сут. При гистологическом исследовании таксис лейкоцитов оценивали в баллах от 0 до 5 (1 — единичные лейкоциты; 2 — незначительное скопление лейкоцитов; 3 — множество лейкоцитов по периферии материала; 4 — лейкоцитарный детрит внутри материала; 5 — перифокальная инфильтрация).

Результаты. Исходный уровень лейкоцитарной инфильтрации при имплантации хитозановых гидрогелей в среднем составлял 4,5 балла. Снижение степени деацетилирования до 35% приводило к статистически значимому снижению лейкоцитарной инфильтрации до 2 баллов. При 20 DD% число лейкоцитов снижалось и соответствовало 1 баллу. Диализ гидрогелей хитозанов снижал лейкоцитарную инфильтрацию до 3 баллов, а при добавлении β-глицерофосфата с последующим диализом до 1 балла. Применение раствора щёлочи NaOH и буфера $NaHCO_3$ напротив усиливало воспалительный ответ. Наиболее выраженное снижение уровня лейкоцитарной инфильтрации (до 2 баллов) наблюдалось при насыщении гидрогелей PLA-гранулами до 16%, что предположительно связано с уменьшением объёма гидрогеля и увеличением площади его взаимодействия с белками плазмы крови, снижающими положительный заряд хитозана.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-00298-П.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И КОЛЛАГЕНА НА МОДЕЛИ ЭКСТРАКЦИОННОЙ ЛУНКИ КАРЛИКОВЫХ СВИНЕЙ

Андрей Вячеславович Васильев[1, 2], Валерия Сергеевна Кузнецова[1], Татьяна Борисовна Бухарова[2], Юрий Дмитриевич Загоскин[3], Тимофей Евгеньевич Григорьев[3], Егор Олегович Осидак[4], Сергей Петрович Домогатский[4], Игорь Иванович Бабиченко[1], Андрей Геннадьевич Надточий[1], Сергей Николаевич Чвалун[3], Дмитрий Вадимович Гольдштейн[2], Анатолий Алексеевич Кулаков[1]

[1] *ФГБУ «ЦНИИ Стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия;*
[2] *ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия;*
[3] *НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;*
[4] *ООО фирмы «ИМТЕК», Москва, Россия*

vav-stom@yandex.ru

Актуальность. Популярность применения природных полимеров в качестве основы для активированных костно-пластических материалов обусловлена их высокой биологической совместимостью. Однако для придания материалам остеоиндуктивных свойств требуется введение в состав факторов роста с контролируемым периодом высвобождения. Ранее нами была показана способность пролонгированного высвобождения BMP-2 из композиционных материалов на основе хитозанового гидрогеля, наполненного высокопористыми полилактидными гранулами, и коллагенового гидрогеля. Данные композиции отверждаются при 37°С и сохраняют заданную форму, что позволяет использовать их без армирующих конструкций. Определение эффективности применения разработанных материалов требует исследований in vivo на моделях крупных лабораторных животных в условиях, приближенных к реальным клиническим ситуациям.

Цель. Оценить биосовместимость и способность композиционных материалов на основе хитозанового и коллагенового гидрогелей, импрегнированных rhBMP-2, индуцировать неоостеогенез на модели экстракционной лунки карликовых свиней.