

### РЕГУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУТЕМ НОКДАУНА ГЕНА ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ КИНАЗЫ-3 $\beta$

Елена Валерьевна Галицына, Татьяна Борисовна Бухарова, Анастасия Витальевна Бобылева, Александр Сергеевич Дьяконов, Ирина Александровна Кривошеева, Михаил Юрьевич Скоблов, Дмитрий Вадимович Гольдштейн

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

snowbars888@yandex.ru

**Актуальность.** Разработка новых методов восполнения дефектов костной ткани, направленных на регуляцию дифференцировки остеогенных прогениторных клеток, является актуальной задачей регенеративной медицины. Одним из ингибиторов остеогенеза выступает гликогенсинтаза киназа GSK-3 $\beta$ , который посредством фосфорилирования  $\beta$ -катенина уменьшает уровень экспрессии ключевого транскрипционного фактора остеобластов Runx2. Снижение количества мРНК GSK-3 $\beta$  в результате нокдауна с помощью молекул siРНК может существенно повысить эффективность остеогенной дифференцировки клеток-предшественниц в процессе репаративного остеогенеза.

**Цель исследования.** Оценка влияния нокдауна GSK-3 $\beta$  на развитие остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

**Материалы и методы.** Для нокдауна GSK-3 $\beta$  были выбраны 4 молекулы siРНК, направленные на 4, 7, 8 и 10 экзоны в составе мРНК данного гена. ММСК жировой ткани человека на 3 пассаже инкубировали с полиплексами, состоящими из молекул siРНК и полимера TurboFect (TF) N/P 1:2 в 24-луночном планшете в течение 24 часов в среде Opti-MEM с 5% ЭТС. После трансфекции среду заменяли на ДМЕМ с 10% ЭТС, 4 mM L-глутамин, 100 мг/л амикацин. Эффективность трансфекции определяли с помощью контрольной молекулы siРНК, не направленной ни на один известный ген человека, с флуоресцентной меткой 6-FAM. Цитосовместимость полиплексов анализировали с помощью МТТ-теста на 1, 2 и 5 сутки после трансфекции. Уровень экспрессии мРНК GSK-3 $\beta$  и Runx2 оценивали с помощью РТ-ПЦР.

**Результаты.** По данным МТТ-теста была определена оптимальная концентрация siРНК — 50 пмоль/мл, при которой количество живых клеток на 5 сутки после трансфекции варьировалось от 71,7% до 87% от значений контрольной группы.

Эффективность трансфекции ММСК полиплексами, содержащими 50 пмоль/мл siРНК составила 97,2 $\pm$ 2,4%. На 5 сутки после проведения нокдауна уровень экспрессии GSK-3 $\beta$  снизился в 2,3–5,2 раза, а уровень экспрессии Runx2 вырос в 2,5–7 раз в зависимости от молекулы siРНК.

Таким образом, было показано, что эффективность остеогенной дифференцировки в культурах ММСК может быть повышена при нокдауне гена GSK-3 $\beta$  с помощью молекул siРНК.

Работа выполнена при поддержке госзадания для ФГБНУ «МГНЦ».

### ПРОАНГИОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫМИ АДЕНОВИРУСАМИ

Дилара Зильбаровна Гатина<sup>1</sup>, Екатерина Евгеньевна Гаранина<sup>1</sup>, Маргарита Николаевна Журавлева<sup>1</sup>, Ильназ Марселевич Газизов<sup>2</sup>, Ильнур Ильдусович Салафутдинов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт Фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

<sup>2</sup> Кафедра анатомии нормальной, Казанский Государственный Медицинский Университет, Казань, Россия

sal.ilnur@gmail.com

К настоящему времени предложено множество подходов для индукции терапевтического ангиогенеза включающие в себя разнообразные хирургические техники, применение специфических медикаментозных препаратов, белков индукторов ангиогенеза, рекомбинантных молекул ДНК и применение различных клеточных типов. При этом в качестве наиболее перспективных технологий могут рассматриваться подходы базирующиеся на использовании *ex vivo* генетически модифицированных клеток. В этом аспекте, мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека продолжают оставаться перспективными «инструментами» для доставки генно-инженерных систем и экспрессии рекомбинантных белков.

В исследовании мы определили влияние МККП гиперэкспрессирующих проангиогенные факторы на процессы индукции ангиогенеза. Получены МККП экспрессирующие сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), а также МККП одновременно секретирующие VEGF, основной фактор роста фибробластов (FGF2) и стромальный фактор роста 1 альфа (SDF1- $\alpha$ ) (МККП-VSF). В качестве групп сравнения использовали импланты матригеля с МККП-GFP и без МККП.

Спустя семь суток после имплантации выделенные фрагменты Матригеля имели вид правильных дисков. Верификация экспрессии рекомбинантных генов в имплантах, показала присутствие целевых мРНК. Цвет имплантов коррелировал со степенью васкуляризации и варьировал от молочного-белого (контрольный Матригель) до красно-коричневого (МККП-VSF). Показано, что концентрация гемоглобина в имплантах, содержащих МККП-VEGF, или МККП-VSF достоверно выше по сравнению с образцами содержащими фрагменты Матригеля с МККП-GFP и без МККП. Гистологические исследования выявили, что препараты Матригеля окружены тонкой соединительнотканной капсулой в глубь которых врастает соединительная ткань. В группах Матригеля без МККП (1,5 $\pm$ 0,5 ед./мм<sup>2</sup>) и МККП-GFP (7,5 $\pm$ 3 ед./мм<sup>2</sup>) наблюдались редкие капилляры. В группе МККП-VEGF присутствуют сосуды различного диаметра (16 $\pm$ 5 ед./мм<sup>2</sup>), проникающие в центральные области имплантата, клетки экспрессируют VEGF. МККП-VSF характеризуются вращением в глубь имплантатов соединительной ткани и формированием сосудов (23 $\pm$ 5 ед./мм<sup>2</sup>) различного калибра, которые проникают в центральные области имплантата, МККП позитивны в отношении VEGF, FGF2 и SDF1- $\alpha$ .

Таким образом, модификация МККП аденовирусами увеличивает экспрессию ими проангиогенных факторов.