

в геноме конструкцию *roGFP-Grx1*, с которой экспрессируется биосенсор окислительно-восстановительного потенциала глутатиона. Проведена направленная дифференцировка данных линий в дофаминергические нейроны и показано изменение спектра возбуждения редокс-зависимого флуоресцентного белка *roGFP* при добавлении в культуральную среду перекиси водорода. Таким образом, созданы предпосылки для дальнейших исследований вклада астроцитов в развитие окислительного стресса нейронов, полученных из ИПСК пациентов с наследственными нейродегенеративными заболеваниями. Данные инструменты открывают перспективы в исследовании молекулярно-генетических механизмов патологий нейродегенеративных болезней и поиске мишеней для их терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-10128П.

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС СТИМУЛИРУЕТ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В МЕЗЕНХИМНЫЕ КЛЕТКИ (ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМНЫЙ ПЕРЕХОД)

Ольга Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна Григорьева, Мария Александровна Кулебякина, Анастасия Юрьевна Ефименко

Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

go.grigorievaolga@gmail.com

Эндотелиально-мезенхимный переход (эндоМП) играет важную роль как в эмбриональном развитии организма, поддерживая миграционную способность клеток, так и во взрослом организме, где он задействован в процессах заживления ран, патогенетических механизмах сердечно-сосудистых заболеваний (в частности атеросклероза), метастазировании и инвазии опухолей, в процессах фиброза тканей — например, при фиброзе легких. Существенная часть миофибробластов, преобладающих в зоне фиброза, происходит из эндотелия сосудистого русла. Несмотря на доказанную роль эндоМП в развитии фиброза, механизмы этого процесса изучены крайне недостаточно.

Основным и наиболее изученным фактором, запускающим ЭндоМП, является трансформирующий фактор роста TGF- β , однако малоизученными остаются другие факторы и процессы, такие как, например, окислительный стресс. Для изучения вклада окислительного стресса в процесс ЭндоМП использовали клетки эндотелия пупочной вены (HUVEC), которые культивировали на среде с добавлением TGF- β , H₂O₂, или их смеси.

По окончании 5 дней культивирования наиболее активный процесс ЭндоМП наблюдался в присутствии смеси TGF- β +H₂O₂. Экспрессия одного из основных маркеров миофибробластов, α -гладкомышечного актина — α SMA, в клетках эндотелия наблюдалась по данным иммуноцитохимического исследования под действием H₂O₂ и TGF- β +H₂O₂, однако по данным ПЦР уровень мРНК α SMA увеличивался только при культивировании со смесью TGF- β +H₂O₂. Кроме того, добавление TGF- β , H₂O₂ и их смеси приводило к увеличению экспрессии генов EDA-фибронектина и коллагена I типа и росту его синтеза и секреции, но при этом

во всех случаях эндотелиоциты сохраняли экспрессию маркера эндотелия — CD31. Литературные данные отдельных исследований указывают на важную роль белков внеклеточного матрикса в регуляции эндоМП. Так, использование фибронектина для покрытия пластика приводило к тому, что ЭндоМП наблюдался при добавлении как TGF- β +H₂O₂, так и H₂O₂.

Полученные данные свидетельствуют о способности окислительного стресса индуцировать эндотелиально-мезенхимный переход, что может вносить значительный вклад в фиброзирование тканей. При этом следует отметить, что для эффективной трансдифференцировки эндотелиоцитов недостаточно одного фактора, а требуется создание комплекса условий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-0043719.

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ММСК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Ольга Сергеевна Гринаковская

ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

grinakovskaya@ya.ru

Костный мозг — уникальный источник клеток для регенеративной медицины. Считается, что мезенхимные клетки костного мозга, находясь в стволовых нишах обладают продолжительным жизненным циклом, за счет чего могут сохранять свою «незрелость». Показано, что при длительном культивировании *in vitro*, мезенхимные МСК сохраняют высокий пролиферативный потенциал в течение длительного времени.

В настоящее время проводятся исследования по изучению свойств и биологических характеристик мезенхимных клеток при культивировании, однако данных об их биологическом возрасте крайне мало.

Целью исследования являлось изучение изменения характеристик, отражающих биологический возраст длительно живущих культур *ex vivo*.

Клетки КМ человека выделяли по стандартной методике в градиенте плотности, затем переносили в культуральные флаконы и культивировали в питательной среде DMEM-F12 с добавлением 10% фетальной сыворотки. В работе использовали клетки 0 и 3 пассажей. Для проверки соответствия критериям ММСК, полученные клетки были охарактеризованы на проточном цитофлуориметре, по экспрессии маркеров (CD90, CD105, CD73, CD45) а также Oct-4 и SSEA-4. Для оценки количества SSEA4⁺ клеток использовали FAC-сортер.

Считается, что Oct4 и SSEA-4 — маркеры, характерные для эмбриональных стволовых клеток и iPS, свидетельствующие о высокой мультипотентной пластичности клеток, а также возможности дифференцировки клеток в экто- и мезодермальном направлениях. Последние исследования показали, что данные маркеры присутствуют также и на мультипотентных клетках, что подтверждается возможностью их дифференцировки как в эктодермальном, так и мезодермальном направлениях.

Фенотип клеток на 0 и 3 пассаже был CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺, CD45⁻. Количество клеток, на которых экспрессируется Oct-4 и SSEA-4 на 0 пассаже составляло менее 10% от общего числа ММСК. На 3 пассаже было показано увеличение числа SSEA-4⁺ клеток до 35%, причем все эти клетки были также Oct-4-положительны.

Таким образом, исследование показало, что в процессе культивирования увеличивается доля мультипотентных Oct4⁺SSEA-4⁺ клеток в культуре, что, вероятно связано с сохранением раннего биологического возраста.

ПЕРТУРБАНТЫ ЦИТОСКЕЛЕТА ВЛИЯЮТ НА СЛИЯНИЕ И РАСПЛАСТЫВАНИЕ ХОНДРОСФЕР

Анна Александровна Грядунова^{1,2}, Сергей Александрович Родионов³, Елизавета Валерьевна Кудан², Юсеф Джорджевич Хесуани², Владимир Александрович Миронов¹⁻³, Елена Анатольевна Буланова²

¹ Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² ЧУ «Лаборатория биотехнологических исследований «ЗД Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия;

³ Лаборатория соединительной ткани с группой клинической генетики, ФГБУ «НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, Россия

agryadunova@bioprinting.ru

Тканевые сфероиды представляют собой трехмерные плотно упакованные агрегаты клеток шарообразной формы. Одним из видов тканевых сфероидов являются хондросферы, состоящие из хондроцитов. К важнейшим свойствам хондросфер относится способность к слиянию и распластыванию на адгезивной поверхности, благодаря чему они находят широкое применение в замещении дефектов хрящевой ткани у пациентов с повреждениями суставного хряща. Несмотря на большое значение слияния и распластывания, до сих пор не проводилось систематического исследования влияния компонентов цитоскелета на течение данных процессов в трехмерной культуре. Данная работа посвящена изучению влияния пертурбантов цитоскелета на кинетику слияния и распластывания хондросфер.

В качестве источника клеток использовали первичные хондроциты барана. Тканевые сфероиды с концентрацией 8000 кл./сфероид получали с использованием планшетов с низкоадгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates (Corning, кат. #4520). В качестве пертурбантов цитоскелета использовали цитохалазин Д (Sigma-Aldrich, кат. #C8273) и нокодазол (Sigma-Aldrich, кат. #M1404) в концентрациях 10 μ M и 1 μ M, соответственно. Слияние хондросфер изучали, помещая сфероиды попарно в ячейки планшетов с низкоадгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates (Corning, кат. #4520). Распластывание хондросфер проводили в ячейках 96-луночного планшета с плоским дном (Corning, кат. #3595).

Анализ кинетики слияния хондросфер в точках 0, 24, 48 и 144 часа показал, что при обработке цитохалазином Д, вызывающим деполимеризацию микрофиламентов, происходит полная остановка слияния: помещенные рядом тканевые сфероиды соприкасаются друг с другом, но не формируют единый конструктор в течение 144 часов культивирования. В то же время, обработка нокодазолом, инициирующим деполимеризацию микротрубочек, не оказывает существенного влияния на процесс слияния по сравнению с контрольной группой. При этом при анализе кинетики распластывания

хондросфер в тех же временных точках было обнаружено, что оба агента обладают ингибирующим влиянием на распластывание сфероидов.

Таким образом, в ходе данного исследования было установлено, что в процессе слияния хондросфер значительную роль играют актиновые микрофиламенты, при деполимеризации которых происходит полная остановка слияния; тогда как на кинетику распластывания хондросфер в равной мере влияют и микрофиламенты, и микротрубочки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90017.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПОТОКОВ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В КАРДИОМИОЦИТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Елена Вячеславовна Дементьева¹⁻³, Михаил Михайлович Слотвицкий⁴, Юрий Викторович Вяткин^{5,6}, Евгений Иванович Кретов², Виктория Романовна Коваленко^{1-3,5}, Сергей Петрович Медведев^{1-3,5}, Дмитрий Николаевич Штокало^{6,7}, Сурен Минасович Закиян^{1-3,5}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

² Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение РАН, Новосибирск, Россия;

⁴ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., Россия;

⁵ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

⁶ ООО Новые программные системы, Новосибирск, Россия;

⁷ Институт систем информатики им. А.П. Ершова, Сибирское отделение РАН, Новосибирск, Россия

dementyeva_elena@mail.ru

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) — одно из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний, однако механизмы его развития до сих пор недостаточно хорошо изучены. Для кардиомиоцитов пациентов с ГКМП характерны увеличенный размер, дезорганизация саркомеров и миофибрилл, более высокая частота аритмических событий. Гипертрофическое ремоделирование кардиомиоцитов и их склонность к аритмиям обусловлены повышенной внутриклеточной концентрацией ионов кальция, которая является следствием нарушения динамики потоков ионов кальция в кардиомиоцитах.

В данной работе было проведено исследование динамики потоков ионов кальция в кардиомиоцитах, полученных с помощью направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с ГКМП. Генетический анализ 15 пациентов с ГКМП выявил мутации в генах, ассоциированных с данным заболеванием. От пациентов с мутациями p.M659I в гене MYH7 и p.R326Q в гене MYBPC3 получены пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В результате направленной