

клональных культур, полученных из соответствующих субпопуляций CD57⁺. NK-клетки были выделены из периферических мононуклеаров здоровых доноров с помощью магнитной сепарации. Стимуляцию проводили IL-2 с использованием облученных фидерных клеток K562-mbIL21. С помощью клеточной сортировки было получено 6 коллекций клонов из NK-клеток CD57⁺, CD57⁺NKG2C⁻ и CD57⁺NKG2C⁺. Анализ фенотипа полученных культур был выполнен через 5 недель культивирования с помощью проточной цитометрии. Процентное содержание клеток, экспрессирующих маркер терминальной дифференцировки CD57, в клонах, полученных из субпопуляции CD57⁺, составляло 56.4 ± 8.7% (среднее ± SE). В то же время, доля CD57⁺-клеток отличалась в клонах, полученных из NK-клеток, различных по экспрессии NKG2C, составляя 43.2 ± 15.7% и 75.3 ± 9.3% для субпопуляций CD57⁺NKG2C⁻ и CD57⁺NKG2C⁺, соответственно. Более того, в 75% клонов, полученных из клеток CD57⁺NKG2C⁺, все клетки в культурах были CD57-позитивными. Интересно, что плотность поверхностной экспрессии активационного маркера HLA-DR была выше в клетках клонов, происходящих из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺, по сравнению с клонами из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁻, хотя не все клетки клонов экспрессировали этот маркер. При этом, плотность поверхностной экспрессии CD16 в этих клонах снижалась, что может быть связано с более интенсивной пролиферацией CD57⁺NKG2C⁻-NK-клеток в ответ на данный тип стимуляции. Приблизительно половина клонов из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁻ были полностью негативными по KIR2DL2/DL3, тогда как только 18% клонов, полученных из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺, не экспрессировало эти ингибирующие рецепторы. Таким образом, большая часть клональных культур, полученных из клеток CD57⁺NKG2C⁺, сохраняла такие фенотипические характеристики адаптивных NK-клеток, как экспрессию CD57 и KIR2DL2/DL3, обладала более высоким статусом активации, но более низким уровнем рецепторов антитело-зависимой цитотоксичности CD16.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 19-15-00439.

РЕПАРАТИВНЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ В МОЗЖЕКЕ МОЛОДИ СИМЫ ОНСОРНУНСНУS MASOU ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Мария Евгеньевна Стуканёва¹, Евгения Владиславовна Пуцина¹, Дмитрий Константинович Обухов²

¹ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского, Владивосток, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Stykanyova@mail.ru

Для исследования репаративного нейрогенеза в мозжке молодых симы были выбраны следующие молекулярные маркеры: для характеристики процессов пролиферации — PCNA и BrdU; глиогенеза и радиальной глиии — GFAP и GS, CBS — фермент синтеза сероводорода, нейродифференциации — HuCD. Нестин и виментин использовали для анализа распределения нейрональных клеток-предшественников. TUNEL анализ применялся для идентификации апоптозных элементов с помощью маркирования терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы. Путём прокалывания черепа рыбы тонкой иглой наносили рану глубиной в 1 мм в тело мозжечка. После

повреждения возрастало число TUNEL⁺ плотных апоптозных телец, представляющих собой финальные стадии крупнозернистой конденсации хроматина и апоптотической деградации клеток. Число GS⁺ клеток увеличивалось и мы полагаем, что GS может маркировать как глутамат-эргические нейроны, содержащие GS в качестве фермента, метаболизирующего глутамат, так и астроцитоподобные клетки, осуществляющие детоксикацию глутамата, захваченного из межклеточного пространства. После повреждения происходила реактивация конститутивных пролиферативных зон с последующей трансформацией в реактивные нейрогенные ниши, содержащие PCNA⁺, BrdU⁺, нестин⁺, виментин⁺ клетки. Возможно, мелкие клетки-предшественники фенотипически соответствуют популяциям нейрональных стволовых клеток, чья пролиферативная активность значительно увеличивается в случае травмы. Максимальная пролиферативная активность нейрогенных ниш и высокая концентрация CBS⁺ клеток в этих областях предполагает, что H₂S участвует в регуляции пролиферативной активности. В районе нейрогенных ниш выявлялись GFAP⁺ волокна радиальной глиии, в дорсальной матричной зоне (ДМЗ) они формировали разнонаправленно ориентированные пучки. По этим волокнам клетки из активированных нейрогенных ниш и ДМЗ мигрируют к месту нанесения травмы, восстанавливая поврежденную ткань. Наиболее крупным образом, содержащим пролиферирующие PCNA⁺, BrdU⁺, нестин⁺, виментин⁺ клетки, была ДМЗ. Вероятно, после повреждения мозжечка зоны пролиферации производят, в основном, HuCD⁺ нейроны, ускоряется нейрональная дифференциация клеток, которые интегрируются в зрелые нейронные сети. В ходе репаративного нейрогенеза поврежденные клетки уничтожаются путем апоптоза, нейтрализуются эффекты нейровоспаления, начинается активная пролиферация, глиогенез и ускоренная дифференциация новых клеток, которые мигрируют к месту повреждения, восстанавливая ткань.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ПРИМЕНЕНИЮ МИТОТИЧЕСКИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАСКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Алена Сергеевна Ступникова^{1,4}, Ирина Сергеевна Захарова¹⁻³, Александр Игоревич Швеценко¹⁻⁴, Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴

¹ Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

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

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

alena.st97@gmail.com

В настоящее время наблюдается рост числа заболеваний с патологией кровеносных сосудов. Различные типы васкулярных эндотелиальных и гладкомышечных клеток используются в качестве модельных систем для изучения ряда заболеваний и считаются перспективным источником для регенеративной медицины.

Серьезным препятствием для применения любого типа делящихся клеток в лечении заболеваний человека является риск того, что после введения в организм пациента они могут образовать опухоли. Поэтому важной задачей является исследование возможности

использования клеток человека, в которых инактивирована способность к митозу.

В этой связи целью данной работы является исследование регенеративного потенциала митотически инактивированных эндотелиальных и гладкомышечных клеток, выделенных из отходного послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека.

В результате выполнения работы создана методика получения митотически инактивированных пациент-специфических васкулярных клеток из материала кардиальных эксплантов человека. Показано, что, несмотря на инактивацию пролиферации, эндотелиальные и гладкомышечные клетки демонстрируют жизнеспособность на уровне более 92%. Полученные клетки сохраняют свои морфофункциональные свойства *in vitro*: в эндотелиальных клетках сохраняются факторы CD31, vWF и способность нарабатывать компоненты межклеточного матрикса: коллаген 4 типа, фибронектин. Гладкомышечные клетки позитивны по α -актину гладких мышц, тяжелой цепи гладкомышечного миозина, нарабатывают эластин; эндотелиальные клетки также сохраняют способность формировать капилляроподобные структуры в матриксе. Клеточные популяции митотически инактивированных эндотелиальных и гладкомышечных клеток демонстрируют высокий ангиогенный потенциал *in vivo* на модели иммунодефицитных мышей SCID. В составе тканеинженерных конструкций из поликапролактона и хитозана клетки сохраняют специфические поверхностные антигены и способность к наработке межклеточного матрикса.

Таким образом, митотически инактивированные васкулярные клетки человека потенциально могут быть применены для разработки методов терапевтического ангиогенеза в лечении ишемических поражений, а также для получения клеточно-заселенных тканеинженерных конструкций, пригодных для сосудистой хирургии. Разработанные в ходе реализации проекта методы могут быть применены для создания биомедицинского клеточного продукта.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НЕОДИМА НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ОТСУТСТВИЯ СВОБОДНЫХ ФОСФАТОВ

Анастасия Михайловна Суббот¹, Иван Александрович Новиков¹, Олег Александрович Гусев², Наталья Евгеньевна Гоголева², Елена Ильясовна Шагмарданова², Сабина Александровна Кондратьева²

¹ *Лаборатория фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ НИИ глазных болезней, Москва, Россия;*

² *Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

kletkagb@gmail.com

Введение. Данные о воздействии соединений редкоземельных элементов (РЗЭ) на культуры клеток разнятся. Описаны как стимуляция пролиферации, так и индукция апоптоза. В ряде случаев эффект дозозависимый, в других наблюдается гормезис. Естественно, часть данных явлений может зависеть от условий проведения эксперимента и выбранного клеточного типа. Тем не менее, интерпретация эффекта как правило сводится к индукции молекулярных ответов на блокировку РЗЭ кальций-зависимых

систем клетки, а другие события, возникающие при попадании растворимых соединений РЗЭ в питательную среду остаются без внимания. Так, известно, что при добавлении хлоридов лантаноидов к питательной среде в концентрации, превышающей десятки микромолей, происходит образование нерастворимых микрочастиц фосфатов лантаноидов, среда обедняется свободными фосфатами. Возможно, воздействие РЗЭ на клетки более объективно изучать в безфосфорных условиях, хотя такая постановка эксперимента и ограничивает исследователя относительно короткими экспозициями.

Материалы и методы. Было изучено воздействие изотонического раствора, содержащего Nd^{3+} в концентрации 50 мМ на клетки двух типов: фибробласты стромы роговицы и клеточная линия А549. После промывки 0,9% раствором NaCl клетки экспонировали в указанном растворе лантаноида от 30 сек. до 24 ч, после чего снова промывали 0,9% раствором NaCl и возвращали в питательную среду.

Результаты. Было обнаружено, что после экспозиции до 30 мин. жизнеспособность клеток обоих типов не отличается от интактных контролей (сохраняется пролиферативная, миграционная, митохондриальная, кальцеиновая активность, проницаемость мембран не изменяется). После 1 ч экспозиции в культурах наблюдались дегенеративные изменения, а после 24 ч экспозиции клетки утрачивали признаки жизнеспособности. При этом непосредственно во время экспозиции в клетках визуально не выявлялись динамические процессы (митоз и движение митохондрий), однако уже после промывки они возобновлялись.

Выводы. Было показано, что летального эффекта на клетки от кратковременного воздействия достаточно высоких концентраций РЗЭ в безфосфорных растворах не наблюдается, а часть наблюдений, описанных ранее, может быть обусловлена алиментарным недостатком свободных фосфатов в окружении клетки. Таким образом, необходимо с осторожностью интерпретировать цитотоксические эффекты РЗЭ. При помещении клетки в раствор РЗЭ наблюдается обратимая остановка динамических процессов, что может быть прим.мо в исследованиях гипобиоза.

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ В УСЛОВИЯХ НАРУШЕННОГО МИНЕРАЛЬНОГО БАЛАНСА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПАТОГЕНЕЗА КЕРАТОКОНУСА И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РОГОВИЦЫ

Анастасия Михайловна Суббот¹, Николай Михайлович Югай³, Юрий Михайлович Ефремов², Петр Сергеевич Тимашев², Иван Александрович Новиков¹

¹ *Лаборатория фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ НИИ глазных болезней, Москва, Россия;*

² *Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;*

³ *ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*

kletkagb@gmail.com

Введение. Ранее показана вовлеченность микроэлементов халькофильной группы Cu, Zn и Fe, в патогенез кератоконуса (КК) и рецидивирующей эрозии роговицы (РЭР). Вероятно, деструктивный эффект обеднения ткани