ТЕСТИРОВАНИЕ СИСТЕМ CRISPR/CAS НА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ КРЫСЫ

Владимир Владимирович Шерстюк[1–4], Гузель Ильдаровна Давлетшина[1, 3], Сурен Минасович Закиян[1–4]

[1] *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;*
[3] *Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;*
[4] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

vsherstyuk89@gmail.com

Лабораторная крыса является одним из основных объектов в области биологии и биомедицины. Данный объект широко используется для исследований в области физиологии, нейробиологии, фармакологии и изучения поведения, а также в области трансляционной медицины для изучения различных заболеваний человека и поиска подходов к их лечению. Для получения модельных животных применяют два подхода — это редактирование эмбрионов и внесение мутаций в плюрипотентные клетки с дальнейшей инъекцией в бластоцисту. Преимуществом использования плюрипотентных клеток является значительное сокращение количества необходимых для эксперимента животных. В настоящее время система CRISPR/Cas позволяет получать модели различных генетических заболеваний в достаточно короткие сроки. Однако для применения данной системы и редактирования генома в линиях плюрипотентных клеток крысы требуются эффективные подходы и протоколы. В данном исследовании была проведена работа по подбору оптимальных условий для внесения ДНК в плюрипотентные клетки крысы с помощью электропорации, а также по выбору наиболее эффективной системы CRISPR/Cas для редактирования генома плюрипотентных клеток крысы. В ходе работы были протестированы три системы со следующими нуклеазами: Streptococcus pyogenes Cas9 (SpCas9), Staphylococcus aureus CRISPR/Cas9 (SaCas9) и Acidaminococcus sp. BV3L6 Cas12a (AsCpf1). Для тестирования был выбран локус Rosa26, который является так называемым safe-harbor локусом и широко используется для внесения трансгенов в геном крысы. Для каждой системы были выбраны три протоспейсера в данном локусе. Оценку эффективности систем производили путем анализа образования инсерций и (или) делеций. В результате была выбрана оптимальная и эффективная система для редактирования генома плюрипотентных клеток крысы и, в частности, для внесения трансгенов в локус Rosa26 крысы.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-74-00022.

ГИСТОТИПИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ СУХОЖИЛЬНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Анатолий Борисович Шехтер[1], Владимир Иванович Тельпухов[2], Дмитрий Сергеевич Суслин[2], Наталия Николаевна Воробьева[4], Юрий Викторович Герасимов[3], Алла Германовна Грошева[3], Семен Николаевич Чурбанов[1, 4], Алексей Леонидович Файзуллин[1], Александра Валерьевна Бутенко[1], Петр Сергеевич Тимашев[1, 4], Рубен Карпович Чайлахян[1, 3]

[1] *Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;*
[2] *Отделение травматологии и ортопедии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;*
[3] *Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;*
[4] *ФНИЦ Институт фотонных технологий, Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и Фотоника» РАН, Москва, Россия*

a.shehter@yandex.ru

Проблема. Функциональное восстановление сухожилий после повреждений и разрывов остается весьма актуальной задачей. Использование методов тканевой инженерии считается одним из ведущих путей решения этой проблемы. Целью представленной работы было создание условий полного структурного восстановления сухожильной ткани и ее биомеханических функций в эксперименте на 24 кроликах.

Методы. Дефект среднего пучка ахиллова сухожилия замещался имплантатом, состоящим из синтетической сетки (Vicryl®) и коллагеновой губки, содержащей аутологичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (МСК КМ). В контрольной группе использовали бесклеточный скаффолд. Через 3 и 6 месяцев животных выводили из опыта и проводили гистологическое, гистохмическое и имунногистохимическое исследования, фазово-контрастную, темно-польную, поляризационную и сканирующую электронную микроскопию. Биомеханическое исследование (сопротивление на разрыв) проводили на 18 кроликах.

Результаты. Через 6 месяцев у большинства животных на месте дефекта среднего пучка в основном восстанавливалась сухожильная ткань, мало отличающаяся от интактных сухожилий: параллельные коллагеновые волокна и фибриллы, усиленный неоангиогенез. В контроле дефект был в основном заполнен неспецифической фиброзно-рубцовой тканью с небольшими участками регенерата. Биомеханические испытания показали, что максимальные растягивающие усилия на разрыв восстановленных сухожилий через 6 месяцев увеличились на 85% по сравнению с контролем и сравнялись с интактными сухожилиями или превосходили их.

Обсуждение. Полученные результаты позволяют заключить, что использование МСК КМ в данной тканеинженерной конструкции, предотвращающей первоначальное растяжение дефекта, после резорбции скаффолда приводит к полной регенерации (реституции) сухожильной ткани.