ВЛИЯНИЕ 3D-МАТРИКСОВ, ИМИТИРУЮЩИХ РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТНУЮ ТКАНЬ, НА ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Кристина Алексеевна Юрова[1], Валерия Владимировна Шуплецова[1], Ольга Геннадьевна Хазиахматова[1], Владимир Владимирович Малащенко[1], Егор Олегович Шунькин[1], Юрий Петрович Шаркеев[2], Екатерина Геннадьевна Комарова[2], Валентина Вадимовна Чебодаева[2], Павел Александрович Иванов[1], Игорь Альбертович Хлусов[3], Лариса Сергеевна Литвинова[1]

[1] *Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, Россия;*

[2] *Институт физики прочности и материаловедения, Томск, Россия;*

[3] *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

kristina_kofanova@mail.ru

Повреждение костной ткани вызывает активацию каскадного механизма регенерации. При проведении остеосинтеза костных переломов с использованием кальций-фосфатных (КФ) материалов медицинского назначения, клиническая эффективность их применения определяется соотношением специфической остеогенной активности и потенциальной токсичности фосфатов кальция, высвобождающихся при биодеградации имплантата.

В связи с этим, in vitro исследование поведения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в присутствии искусственных материалов является важным этапом оценки цитотоксичности и (или) специфической активности имплантатов, предлагаемых к использованию в травматологии и ортопедии.

Эксперимент проведен с помощью разработанной модели трехмерного (3D) культивирования клеток in vitro с использованием подложек (10×10×1 мм^3) из коммерчески чистого титана с шероховатым (Ra=2–5 мкм) КФ покрытием. Клеточная линия ММСК жировой ткани (ММСК-ЖТ) была получена из липоаспирата человека. Иммунофенотипирование ММСК-ЖТ проводили на проточном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). До начала культивирования число клеток, несущих молекулы CD105, CD73 и CD90 составляло более 95%, клеток, экспрессирующих маркеры CD45, CD34, CD20 и CD14 — менее 4%. Клетки инкубировали в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (Gibco Life Technologies, США) в течение 14–21 суток при 37°С, 100% влажности в атмосфере 5% CO_2.

После окончания времени инкубации (14 суток) исследование фенотипического профиля культуры CD73CD90CD105$^+$ клеток после 14 дней культивирования не выявило статистически значимых различий при культивирования клеток в присутствии 3D-матриксов. В 2D-культуре на пластике доля живых клеток варьировала в пределах 87–98%. После 14-дневного сокультивирования ММСК-ЖТ с 3D-матриксами доля жизнеспособных клеток при окрашивании 0,4% трипановым синим, составила 82–95%. Негативное влияние шероховатости КФ покрытия на выживаемость клеток не установлено.

Через 21 сутки в 3D-культуре резко возрастала окраска межклеточного матрикса ализариновым красным, что свидетельствует в пользу дифференцировки ММСК в секретирующие остеобласты.

Таким образом, титановые подложки с рельефным КФ покрытием показали полезные остеоиндуктивные свойства при отсутствии цитотоксичности в отношении ММСК, что раскрывает их известную клиническую эффективность при остеосинтезе в случае переломов и заболеваний костной ткани.

Исследование выполнено при поддержке Гранта Президента (проект № МК-2452.2019.4).

СЕКРЕЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ, УЧАСТВУЮЩИМИ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Кристина Алексеевна Юрова[1], Валерия Владимировна Шуплецова[1], Ольга Геннадьевна Хазиахматова[1], Елена Сергеевна Мелащенко[1], Юрий Петрович Шаркеев[2], Владимир Владимирович Малащенко[1], Егор Олегович Шунькин[1], Екатерина Геннадьевна Комарова[2], Валентина Вадимовна Чебодаева[2], Павел Александрович Иванов[1], Игорь Альбертович Хлусов[3], Лариса Сергеевна Литвинова[1]

[1] *Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, Россия;*

[2] *Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия;*

[3] *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

larisalitvinova@yandex.ru

Повреждение костной ткани инициирует сигнальные каскады, запускающие механизм ее репаративной регенерации (Wang Y. et al., 2018). Мы предполагаем, что продукция провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6, TNF-α) при остеосинтезе переломов зависит от типа клеток (мононуклеарные лейкоциты крови (МНК); мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК)) и свойств имплантатов с кальцийфосфатной (КФ) поверхностью.

В эксперименте были использованы подложки (10×10×1 мм^3) из коммерчески чистого титана, несущих рельефное (индекс шероховатости Ra = 2–5 мкм) КФ покрытие.

Выделение МНК проводилось методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин (р=1,077 г/см3). Клетки (на 98–99% CD45CD3$^+$) и инкубировали в полной питательной среде 48 часов при 37°С, 5% CO_2 во влажной атмосфере. CD73CD90CD105$^+$ ММСК выделяли из жировой ткани человека (Litvinova L.S. et al., 2018) инкубировали 14 суток. Иммунофенотипирование клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии (MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия) и анализировали с помощью «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США). Концентрации цитокинов (IL-1b, IL-6, TNF-α; пг/мл) определяли методом проточной флюориметрии (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США).

По истечении времени культивирования в присутствии 3D-матриксов было выявлено увеличение числа МНК с фенотипом CD3CD4CD71$^+$ и резкое увеличение остеогенной дифференцировки ММСК. Число МНК, экспрессирующих маркеры активации (CD25, CD95) и дифференцировки (CD45RO, CD45RA), оставалось на уровне контрольных значений. В культуре МНК уровень провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6) был повышен в 50 раз (P<0,05) в сравнении с 2D-культурами.

Продукция TNF-α увеличилась в 1,5 раза в экспериментальных группах и достоверно отличалась от контрольных значений (P<0,05).

ММСК либо не реагировали (IL-1b, IL-6), либо значительно (в 4 раза) снижали (TNF-α) секреторную активность в 3D-культуре.

Вывод. Клетками-мишенями, реагирующими на топографию КФ поверхности усилением провоспалительной активности в течении первых 14 суток, являются Т-лимфоциты, но не ММСК. Увеличение числа CD3CD4CD71$^+$ клеток и концентраций провоспалительных цитокинов способствует инициации сигнального каскада, клиренсу очага повреждения от возможных патогенов и может быть триггером хоминга ММСК в очаг повреждения, что обеспечивает процесс репаративной регенерации костной ткани при остеосинтезе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10031).

ПРИМЕНЕНИЕ CRISPR-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВАЦИИ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ И ПРОВЕРКИ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Иван Антонович Яковлев[1–3], Ирина Георгиевна Старостина[2], Дарья Сергеевна Чулпанова[2], Алиса Алмазовна Шаймарданова[2], Валерия Владимировна Соловьева[2], Альберт Анатольевич Ризванов[2], Роман Вадимович Деев[1, 4], Артур Александрович Исаев[1]

[1] *Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия;*
[2] *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;*
[3] *ООО «Генотаргет», Москва, Россия;*
[4] *Северо-Западный медицинский государственный медицинский ниверситет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия*

ivan@ivan-ya.ru

Мышечные дистрофии характеризуются первичным поражением мышечной ткани, развивающимся непрерывно-прогредиентно, зачастую приводя к инвалидности в трудоспособном возрасте, а также к смерти в детском и подростковом возрасте. Общая распространенность мышечных дистрофий составляет 19.8–25.1:100000, высоко распространена группа поясно-конечностных мышечных дистрофий (от 1:14500 до 1:123000). Этиотропного лечения этих заболеваний на сегодняшний день не существует. Учитывая то, что миодистрофии вызваны мутациями в генах, кодирующих мышечные белки, наиболее оптимальным подходом является генная терапия, позволяющая корректировать генетический материал клетки. В исследованиях по разработке генной терапии мышечных дистрофий возникает необходимость рассмотреть тот или иной подход (редактирование ДНК, РНК, оверэкспрессия, а также доставка терапевтических молекул различными векторами) не только теоретически, но и проанализировать in vitro. Учитывая распространенность миодистрофий, зачастую «труднодоступность» пациентов, многообразие мутаций и форм заболеваний, взятие биоптата для выделения и культивирования клеток в условиях лаборатории зачастую весьма затруднительно, или невозможно. Кроме этого, для создания молекул, действующих целенаправленно, на определенный участок ДНК или РНК, требуются образцы клеток, имеющих соответствующую мутацию. Таким образом, необходимо создание клеточных тест-систем (моделей заболеваний) в условиях лаборатории из уже имеющегося или легкодоступного биоматериала. Оптимальным сегодня является применение системы геномного редактирования CRISPRCas9.

Нами выполнен дизайн молекулярного инструмента и получены лентивирусные частицы, содержащие трехкомпонентную систему транскрипционной активации CRIPSRCas9-SAM, в основе которой инактивированная нуклеаза Cas9 и факторы VP64, P65 и HSF1. В фибробластах, полученных от пациента с поясно-конечностной мышечной дистрофией 2Б (дисферлинопатией) с мутацией в 26 экзоне гена, кодирующего мышечный белок дисферлин (DYSF) был активирован ген DYSF. Селекцию трансдуцированных клеток последовательно проводили антибиотиками (гигромицин, зеоцин, бластицидин). Уровень мРНК измерялся с помощью ОТ-ПЦР и составил около 40% от контрольного. Экспрессия дисферлина в контрольных фибробластах была подтверждена с помощью иммуноблоттинга. Таким образом, нами получена in vitro тест-система для отработки точных молекулярных инструментов для редактирования ДНК и РНК, а также подходов, связанных с оверэкспрессией белка дисферлина.

3D-КОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ВИРУСНЫХ НАНОЧАСТИЦ ВТМ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Игорь Владимирович Яминский[1, 2], Ольга Валентиновна Синицына[2], Наталья Олеговна Калинина[4], Михаил Эммануилович Тальянский[3, 5]

[1] *Физический и химический факультеты, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*
[2] *Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия;*
[3] *The James Hutton Institute, Dundee DD2 5DA, UK;*
[4] *Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, Москва, Россия;*
[5] *ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

yaminsky@nanoscopy.ru

Вирусные наночастицы перспективны для бионанотехнологии. Они монодисперсны, стабильны и могут быть получены в больших количествах. Поверхность вирусных частиц может быть модифицирована с целью придания ей дополнительных функций. Вирус табачной мозаики (ВТМ) — наиболее исследованный и используемый в бионанотехнологии вирус, имеющий палочкообразную форму диаметром 18 нм и длиной 300 нм. ВТМ был успешно применен в задачах тканевой инженерии. В работе из ВТМ сформировали 3D-каркас, который способствовал остеогенной дифференцировке стволовых клеток и последующей минерализации матрикса. В работе [3] показано in vivo, что композиты на основе гидрогеля и ВТМ могут быть использованы для замещения костной ткани и не вызывают системной токсичности.

Нами предложено использовать наноцеллюлозу и вирусоподобные частицы из модифицированного белка оболочки ВТМ для создания материалов, перспективных для замены костной ткани. Вирусоподобные частицы связывались с волокнами наноцеллюлозы и способствовали ее минерализации с образование гидроксилапатита. Детальное исследование методом атомно-силовой