



Сборник материалов форума «Биомедицина-2016»



Организаторы:

- Министерство здравоохранения Российской Федерации
- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени акад. Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации
- Национальное общество регенеративной медицины
- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук
- Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
- Московский государственный университет, факультет фундаментальной медицины
- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
- Новосибирский государственный университет
- Технопарк новосибирского Академгородка

Ведущие модераторы:

- Ткачук В.А., акад. РАН, д.б.н., проф.
- Караськов А.М., акад. РАН, д.м.н., проф.
- Сухих Г.Т., акад. РАН, д.м.н., проф.
- Васильев А.В., д.б.н., проф.
- Власов В.В., акад. РАН, д.х.н., проф.
- Колчанов Н.А., акад. РАН, д.б.н., проф.
- Козлов В.А., акад. РАН, д.м.н.
- Парфенова Е.В., д.м.н., проф.
- Агладзе К.И., к.ф.-м.н., проф.
- Иллариошкин С.Н., д.м.н., проф.
- Томилин А.Н., чл. корр. РАН, д.б.н.
- Закиян С.М., д.б.н., проф.
- Покушалов Е.А., д.м.н., проф.
- Леонов С.В., к.б.н.
- Арутюнян Р.М., чл. корр. НАН Армении, д.б.н., проф.
- Нетесов С.В., чл. корр. РАН, д.б.н., проф.
- Гуляева Л.Ф., д.б.н., проф.
- Шевела А.И., д.м.н., проф.
- Рихтер В.А., к.б.н.
- Рзаев Д.А., к.м.н.
- Медведев С.П., к.б.н.

Секретариат форума:

- Васькова Е.А.
- Григорьева Е.В.
- Дементьева Е.В.
- Захарова И.С.
- Малахова А.А.
- Павлова С.В.

Волонтеры:

Байзитов Д.Р., Валетдинова К.Р., Вардапетян А., Елисафенко Е.А., Живень М.К., Мазурок Н.А., Маланханова Т.Б., Милевская Е.А., Немудрый А.А., Смирнова А.М., Сорокина А.Е., Стригина Е.В., Устьянцева Е.И., Шевченко А.И., Шерстюк В.В.

Содержание

Научная программа форума «Биомедицина-2016»	5
Тезисы пленарных докладов и сообщений на круглых столах	7
Тезисы постерных докладов	86
Авторский указатель	145
Рекламные страницы спонсоров	154

Научная программа форума «Биомедицина-2016»

Пленарные доклады

Агладзе К.И. «Зачем современной медицине тканевая инженерия»

Васильев А.В. «Достижение и перспективы клеточных технологий»

Власов В.В. «Клеточные технологии в медицине будущего»

Деев С.М. «Тераностика в современной биомедицине»

Жарков Д.О. «Редактирование эпигенома: можно ли и нужно ли»

Иллариошкин С.Н. «Новейшие молекулярные и клеточные технологии в изучении нейродегенеративных заболеваний»

Колчанов Н.А.

Лаврик О.И. «Системы репарации ДНК как платформы создания лекарств и повышения эффективности генной терапии»

Леонов С.В. «Возможно ли добиться нейрорегенерации при нейродегенеративных заболеваниях»

Макаревич П.И. «Генная терапия в регенеративной медицине: результаты и перспективы развития»

Медведев С.П. «CRISPR-революция в биологии и медицине»

Парфенова Е.В. «Перспективы регенерации миокарда»

Рубцов Н.Б. «Проблема генетического разнообразия и генетической нестабильности в исследованиях с использованием стволовых клеток человека»

Таранин А.В. «Иммунотерапия: новые молекулярные и клеточные инструменты в лечении рака»

Ткачук В.А. «Физиологические механизмы регуляции процессов обновления клеток и регенерации тканей: роль мезенхимных стромальных клеток»

Томилин А.Н. «Последние достижения новых технологий на основе плюрипотентных стволовых клеток»

Matsui H. «Drug discovery and research activities in Takeda»

Заседания круглых столов

«Биомедицина: взгляд клинициста»

«Возможности и перспективы применения новых технологий в клинической неврологии»

«Иммунотерапия и молекулярная визуализация»

«Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека для регенеративной медицины. 10 лет со дня открытия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток»

«Клеточные технологии в современной медицине: настоящее и будущее»

«Клеточные технологии и тканевая инженерия в медицине»

«На пороге новой биомедицины - перспективы принятия законопроекта «Об обращении биомедицинских клеточных продуктов»

«Новые технологии в нейрохирургии»

«Норма и патология в современной цитогенетике»

«Персонафицированная неврология: современные возможности и перспективы»

«Перспективы и проблемы применения биоинформатики в Российских биомедицинских лабораториях»

«Противовирусные вакцины и противораковые вирусы»

«Расстройства движений. Диагностика и лечение»

«Современные технологии редактирования геномов в биомедицинских исследованиях»

«Таргетная терапия в онкологии. Вчера, сегодня, завтра»

«Трансляционные биомедицинские исследования. Интеграция усилий научных коллективов для решения медицинских задач»

Тезисы пленарных докладов и сообщений
на круглых столах

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ МОЗГОВЫХ КЛЕТОК ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ К ФРАГМЕНТАМ БЕЛКА RAGE НА ЖИВОТНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Аветисян А.В.^{1*}, Симонян Р.А.¹, Самохин А.Н.², Бобкова Н.В.²

1 НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

2 Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область, Россия

*e-mail: avetis@genebee.msu.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) является неизлечимым нейродегенеративным заболеванием, которым страдают миллионы пожилых людей во всем мире. Основная клиническая форма болезни спорадическая, в качестве адекватной модели которой служат мыши с ольфакторной бульбэктомией (ОБЭ). Двустороннее удаление обонятельных луковиц у половозрелых мышей линии NMRI вызывает в отдаленные сроки (4-5 недель) нейродегенерацию альцгеймеровского типа, характерные БА основные поведенческие и биохимические признаки, в том числе, потеря пространственной памяти, выраженный апоптоз нейронов, нарушение энергетического обмена, а также повышенный уровень мозгового амилоида- β и фосфо-Тau. На ранних стадиях развития болезни у ОБЭ мышей регистрируется выраженная дисфункция мозговых митохондрий, коррелирующей с высоким содержанием в них растворимого белка A β 1-40, и A β -индуцированный окислительный стресс. Изолированные из неокортекса и гиппокампа митохондрии демонстрируют такие функциональные нарушения, как, низкая скорость дыхания в состоянии 3 и 4, сниженный мембранный потенциал и дыхательный контроль, значительное падение активности комплексов I и IV электрон-транспортной цепи. Нарушение энергетического метаболизма сопровождается накоплением продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях, что свидетельствует о развитии окислительного стресса в неокортексе и гиппокампе ОБЭ мышей.

Известно, что в процессе накопления нейротоксического A β в мозговых клетках активно участвуют рецепторы конечных продуктов неферментативного гликирования RAGE, осуществляющие проникновение A β через гематоэнцефалический барьер в мозг. Одновременно различными клетками, в том числе нейронами, синтезируется и затем секретируется во внеклеточное пространство растворимая форма рецептора sRAGE, у которого отсутствует трансмембранный домен. sRAGE связываясь с A β , способствует их выносу в кровяное русло, тем самым очищая мозг от патогенных лигандов, что необходимо для терапии БА. Показано, что аналогичным действием обладают и короткие синтетические фрагменты sRAGE [Вольпина и др., 2015]. В качестве терапевтического средства для восстановления/улучшения оперативной памяти мышей, а заодно и митохондриальных функций, были протестированы 4 синтетические пептиды неструктурированных фрагментов рецептора RAGE. Для прямого действия пептидов применили интраназальное введение ОБЭ мышам в течение 19 дней с последующим изучением поведения, энергетического метаболизма. Все синтетические пептиды восстанавливали биоэнергетические характеристики митохондрий неокортекса и гиппокампа, участков мозга, отвечающих за оперативную память и обучение, почти до контрольного уровня. В то же время тестирование в водном лабиринте Морриса не выявило улучшения пространственной памяти и обучения ОБЭ мышей. Таким образом, восстановление энергетического метаболизма является необходимым, но недостаточным условием для предотвращения/лечения нейродегенерации в данной модели БА.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00944.

НАИБОЛЕЕ ВАЖНЫЕ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ПРОТИВ КОТОРЫХ ЦЕЛЕСООБРАЗНО РАЗРАБАТЫВАТЬ ВАКЦИНЫ

Агафонов А.П.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

e-mail: agafonov@vector.nsc.ru

Борьба с инфекционными заболеваниями — одна из наиболее значимых, актуальных и приоритетных задач современного здравоохранения. Болезни, вызываемые инфекционными агентами, во многих странах являются главной причиной преждевременной смерти. В мире, в целом, на инфекционные заболевания приходится более 50% потерянных лет жизни. Даже в странах с высоким уровнем здравоохранения мероприятия по снижению бремени инфекционных заболеваний входят во все национальные программы социальной и медицинской направленности.

На сегодняшний день ВИЧ/СПИД, малярия, туберкулез и другие основные инфекционные болезни остаются наиболее распространенными заболеваниями в мире.

В странах с высоким уровнем доходов ведущей инфекционной причиной смерти являются инфекции нижних дыхательных путей. В странах с низким уровнем доходов люди умирают, главным образом, от инфекционных болезней: инфекции нижних дыхательных путей, ВИЧ/СПИД, диарейные заболевания, малярия и туберкулез являются причиной почти трети всех случаев смерти в этих странах.

Наиболее опасными вирусами являются ВИЧ (3,1 миллиона смертей в год), ротавирус, вирусы гепатита В, гепатита С, гриппа (около 0,5 млн. смертей в год каждый), корь (около 0,2 млн.), хантавирусы, вирусы бешенства, желтой лихорадки, денге (от 20 тыс. до 70 тыс. смертей ежегодно).

Реализация программы элиминации натуральной оспы, успехи в борьбе с полиомиелитом и корью доказывают возможность эффективной борьбы и даже полной эрадикации инфекционного заболевания. Важной проблемой является создание безопасных и эффективных вакцин против вновь возникающих инфекций.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК И ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКИ

Арутюнян Р.М.^{1*}, Арутюнян Т.А.¹, Лир Т.², Оганесян Г.Г.¹

1 Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

2 Институт генетики человека, Йена, Германия

*e-mail: rouben_a@hotmail.com

Повреждения хромосомной ДНК, индуцированные мутагенами, как правило, распределяются неравномерно по всему геному. Неслучайное распределение первичных поражений определяется структурой и локализацией хромосом в интерфазных ядрах в момент воздействия мутагена, а также активностью систем репарации в различных локусах генома. Прогресс в изучении локализации повреждений в геноме зависит от разработки новых подходов к их идентификации. Будут представлены результаты применения гибридных методов молекулярной цитогенетики, основанных на сочетании флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с методом ДНК-комет и микроядерным тестом. Эти методы позволяют одновременно выявлять и локализовать повреждения ДНК и хромосом на одних и тех же препаратах. Поэтапная гибридизация микроядер с центромерными и цельнохромосомными ДНК-пробами позволила впервые идентифицировать мишени действия цитостатиков: митомицина С и блеомицина на хромосомах, а также различить кластогенные и анеугенные эффекты. Выявлены различия состава микроядер в зависимости от специфики их индукции мутагенами. Показана эффективность комплексного применения центромерных и цельнохромосомных проб для оценки хромосомного состава микроядер. Метод ДНК-комет с использованием теломерных PNA проб позволил оценить уровень повреждений всей ДНК и теломерных участков хромосом в нормальных и трансформированных клетках. Этот подход рекомендуется для оценки специфики действия цитостатиков. Эпигенетическая активность афлатоксина В1 (АФВ1) была изучена методом ДНК-комет с использованием изошизомерных ферментов (HpaII/MspI), один из которых распознает метилированные участки. Впервые обнаружена способность АФВ1 модифицировать профиль глобального метилирования ДНК в клетках человека. Молекулярно-цитогенетические исследования с применением FISH показали способность АФВ1 индуцировать локус-специфические вариации числа копий участков ДНК (copy number variation). Полученные данные подтверждают эффект действия АФВ1 на хромосомные локусы за счет ингибирования процессов репликации. Представленные комплексные подходы существенно повышают чувствительность стандартных методов оценки действия мутагенов и являются перспективными для локализации повреждений ДНК и хромосом в геноме человека.

СВЯЗЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ КЛОФИБРАТОМ И АВАНДИЕЙ, С УРОВНЕМ ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗА У РАЗНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ

Багинская Н.В.*, Ильницкая С.И., Каледин В.И.

Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

*e-mail: bagin@bionet.nsc.ru

Препараты клофибрат и росиглитазон (авандия) — лиганды ядерных рецепторов активаторов пролиферации пероксисом, PPAR α и PPAR γ , — применяются для нормализации углеводно-жирового обмена при нарушениях, вызванных развитием метаболического синдрома. Есть основания считать, что, снижая выраженность признаков метаболического синдрома, эти препараты могут также влиять и на развитие опухолей у животных и человека (1).

В данном исследовании мы предприняли попытку проверить это предположение, изучая влияние хронического применения клофибрата и авандии на показатели обмена веществ и развитие опухолей печени, инициированных введением диэтилнитрозамина (ДЭНА) в раннем онтогенезе. В экспериментах были использованы 3 линии мышей: СЗН/Не и СВА – чувствительные и С57BL/6J – относительно резистентные к индукции опухолей печени. В возрасте 12-14 дней мышатам-самцам вводили ДЭНА в дозе 50 мг/кг веса тела. Начиная с 2-месячного возраста и до конца эксперимента, часть животных каждой линии получала с кормом препараты клофибрат (1 г/кг) или авандия (50 мг/кг). Контролем служили мыши, получившие только инъекцию ДЭНА, и интактные животные. Показатели обмена веществ оценивали в возрасте 3-4 месяцев, количество опухолей — в возрасте 8-10 месяцев. У мышей линии С57BL/6J при введении обоих препаратов были выявлены сходные признаки повышения чувствительности к инсулину в виде снижения уровней триглицеридов и инсулина в крови. У мышей линий СЗН/Не и СВА только авандия снижала уровень триглицеридов, тогда как клофибрат повышал содержание глюкозы и холестерина в крови, что может быть признаком снижения чувствительности к инсулину у этих животных. К 8-10-месячному возрасту клофибрат существенно повышал количество и размеры опухолей у мышей линий СЗН/Не и СВА, чувствительных к развитию опухолей печени, и не влиял на эти показатели у резистентной линии С57BL/6J. В то же время авандия уменьшала количество опухолей у всех 3 линий мышей, независимо от генотипа.

Таким образом, метаболические нарушения, вызванные клофибратом, на ранних стадиях канцерогенеза коррелируют с увеличением количества и размеров опухолей на поздних стадиях. Повышение чувствительности к инсулину при введении авандии ассоциировано с уменьшением количества опухолей как у резистентных, так и у чувствительных к гепатоканцерогенезу линий мышей. Из этого следует, что повышение чувствительности к инсулину при использовании авандии может быть одним из факторов устойчивости к индуцированному гепатоканцерогенезу.

1. Braun S., Bitton-Worms K., LeRoith Dk. The link between the metabolic syndrome and cancer. *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7(7): 1003-1015.

ДИЗАЙН ПОЛИЭПИТОПНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ИММУНОГЕНОВ – КАНДИДАТОВ ДНК-ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Бажан С.И.*, Антонец Д.В., Карпенко Л.И., Ильичев А.А.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

*e-mail: bazhan@vector.nsc.ru

Учитывая существующие в настоящее время проблемы в создании вакцин против онкологических и ряда инфекционных заболеваний, существует острая потребность в подходах, нацеленных на создание нового поколения эффективных и безопасных вакцин. В области создания Т-клеточных вакцин одним из новых и перспективных подходов является конструирование искусственных полиэпитопных иммуногенов, включающих широкий спектр проективных Т-клеточных эпитопов из вирусных или раковых антигенов.

Цель наших исследований состояла в поиске рациональных подходов к созданию полиэпитопных вакцин, индуцирующих ответы Т-лимфоцитов на все эпитопы, включенные в состав конструкций. Для достижения этой цели в данной работе проведено конструирование и сравнительное исследование иммуногенности набора полиэпитопных конструкций, спроектированных так, чтобы обеспечить различные стратегии процессинга полиэпитопных конструкций и презентацию освободившихся эпитопов CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитам с использованием современных знаний о механизмах презентации Т-клеточных антигенов по пути МНС I и II классов.

Полученные результаты показали, что существует вполне закономерная взаимосвязь между структурой полиэпитопной конструкции и ее антигенными и иммуногенными характеристиками. В частности, мы показали, что:

- 1) путем оптимизации структуры иммуногена с помощью спейсерных последовательностей, содержащих мотивы для связывания с TAP и сайты протеасомного и лизосомного расщепления, фланкирующие ЦТЛ и Т-хелперные эпитопы в составе полиэпитопной конструкции, можно значительно повысить иммуногенный потенциал целевой полиэпитопной вакцины;
- 2) убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопа на протеасому является более эффективной стратегией для стимуляции специфического Т-клеточного иммунного ответа, по сравнению с LAMP-зависимым нацеливанием на лизосому.

Полученные результаты поддерживают концепцию рационального дизайна вакцин, основанную на имеющихся знаниях о механизмах презентации Т-клеточных антигенов по пути МНС I и II класса.

Для конструирования полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов мы разработали оригинальное программное обеспечение TEpredict и PolyCTLDesigner, которое мы позиционируем как универсальную платформу для рационального проектирования полиэпитопных иммуногенов – кандидатов ДНК-вакцин для индукции Т-клеточного иммунитета против инфекционных и онкологических заболеваний. С использованием этого программного обеспечения проведено проектирование ряда полиэпитопных иммуногенов — кандидатных ДНК-вакцин против инфекционных и онкологических заболеваний, в том числе против ВИЧ-1, гриппа, меланомы и рака молочной железы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00047).

ПИЛОТНОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ СО СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМОЙ: РЕЗУЛЬТАТЫ НАБЛЮДЕНИЯ В ТЕЧЕНИЕ ГОДА

Дуров О.В.¹, Аверьянов А.В.¹, Баклаушев В.П.^{1*}, Тихоновский М.А.¹, Коноплянников М.А.¹, Кальсин В.А.¹, Ahlfors J.E.²

1 ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи ФМБА России, Москва, Россия

2 New World Laboratories Inc., Montreal, Canada

*e-mail: serpoff@mail.ru

Актуальность. Позвоночно-спинномозговая травма (ПСМТ) является вторым после инсульта заболеванием как по частоте (0,6-1,0 на 10 000 населения), так и по тяжести инвалидизации и отсутствию эффективных методов терапии неврологических осложнений. Лишь около 20% пациентов после ПСМТ способны хотя бы частично восстановить неврологический дефицит с помощью нейрореабилитации. Для остальных единственной надеждой на восстановление утраченных функций является регенеративная медицина. Доклинические исследования показали, что нейральные стволовые клетки (НСК) способствуют регенерации поврежденного спинного мозга у животных. Описаны отдельные случаи успешного применения НСК, в частности из обонятельной луковицы, для лечения неврологических осложнений ПСМТ у человека, однако системные исследования по разработке регенеративной технологии для лечения ПСМТ пока отсутствуют. Целью нашей работы было оценить безопасность и эффективность трансплантации первично репрограммированных аутологичных НСК у пациентов с хронической ПСМТ на уровне грудного отдела позвоночника.

Материалы и методы исследования. Первично репрограммированные НСК из костного мозга пациентов были получены по технологии J.E. Ahlfors (Canada) с помощью запатентованного коктейля репрограммирования. В исследовании приняли участие 4 пациента с ПСМТ на грудном уровне в среднем спустя год после травмы со сформированным неврологическим дефицитом и исчерпанными возможностями нейрореабилитации (140-210 баллов по шкале ISNCSCI, ASIA). Трем пациентам перед операцией было присвоено значение ASIA A (полный перерыв спинного мозга), одному — ASIA B (неполный перерыв спинного мозга). Пациентам выполняли открытую операцию, частичное иссечение рубцовой ткани и имплантацию в спинной мозг аутологичных НСК вместе с регенеративным матриксом (NWL, Canada). В течение 6 месяцев проводили клиническое наблюдение с оценкой по шкале ASIA, а также анализом данных МРТ, ЭМГ и биомеханики движений в динамике.

Результаты. Показана безопасность имплантации первично репрограммированных НСК в течение года после операции. У всех 4 пациентов наблюдалось повышение показателей шкалы ASIA в среднем на 20 баллов. Уровень анестезии в течение периода наблюдения уменьшился на 1-3 сегмента как для поверхностной, так и для глубокой чувствительности. Для двигательной активности нижних конечностей был показан прогресс по шкале ASIA с 0 баллов до операции до 6-14 баллов через 6 месяцев. Поверхностная ЭМГ и анализ биомеханики движений показали угасание спонтанной клонусовидной биоэлектрической активности и появление произвольной активности в прямых и приводящих мышцах бедра. Контроль за функциями тазовых органов в течение 6 месяцев после операции, в целом, не изменялся, хотя у части пациентов наблюдалась нормализация тонуса наружного сфинктера прямой кишки и появление анального рефлекса.

Выводы. Показана безопасность трансплантации первично репрограммированных НСК в течение года после операции. В существующем виде данная технология приводит к частичному регрессу неврологического дефицита у пациентов с хронической ПСМТ. Технология регенеративной терапии ПСМТ требует дальнейшей оптимизации как с точки зрения нейрохирургической техники, так и выбора оптимального срока травмы для трансплантации НСК.

ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Валетдинова К.Р.^{1,2,3,4*}, Григорьева Е.В.^{1,2,3}, Закиян С.М.^{1,2,3,4}

1 Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

3 Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

4 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: valetdinova@bionet.nsc.ru

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — наследственное нейродегенеративное заболевание, вызванное гибелью периферических моторных нейронов. В зависимости от тяжести и времени начала проявления симптомов различают четыре типа СМА, при этом наиболее тяжелыми формами являются I и II тип, развивающиеся в раннем детском возрасте. В среднем один из 6000-10000 детей рождается со СМА, при этом около 50% больных детей не доживают до двух лет. Генетической причиной этого заболевания являются мутации в гене *SMN1*, эффекты которых до конца не известны, что затрудняет поиск оптимального метода лечения. Поэтому актуальной задачей является получение адекватной модельной системы СМА. В данной работе предлагается получение клеточной модели СМА на основе пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. Дифференцированные производные ИПСК — моторные нейроны, воспроизводящие фенотип данного заболевания, могут быть использованы в исследованиях патогенетических механизмов, приводящих к избирательной гибели данного типа нервных клеток, и поиске эффективных средств терапии СМА.

В результате репрограммирования фибробластов линии f1SMA от пациента со СМА I типа, m3SMA от пациента со СМА II типа и m34Sk от здорового человека получено порядка тридцати стабильных линий ИПСК. Клетки схожи по морфологии с плюрипотентными стволовыми клетками человека и экспрессируют эндогенную щелочную фосфатазу. С помощью ПЦР-ПДРФ анализа показано, что во всех линиях ИПСК, полученных от пациентов со СМА I и II типов, имеется гомозиготная делеция в 7 экзоне гена *SMN1*, при этом линии ИПСК, полученные от здорового человека имеют нормальный генотип. С помощью мультиплексной ПЦР в реальном времени показано, что в линиях ИПСК, полученных от пациента со СМА I типа содержится две копии гена *SMN2* — основного гена-модификатора при СМА. Для доказательства плюрипотентного статуса полученных ИПСК выбрано по три линии от каждого пациента. Линии ИПСК, взятые в анализ, демонстрируют экспрессию основных маркеров плюрипотентных клеток, таких как поверхностные антигены SSEA4, TRA1-60, транскрипционные факторы *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*, *FGF4*, *NODAL* и ряд других генов. С помощью иммуноцитохимического анализа и ОТ-ПЦР показана экспрессия маркеров производных трех зародышевых листков: эктодермы (*NF200*, *TuJ1*, *PAX6*, *MAP2*, *GFAP*), мезодермы (α SMA, *CD31*, *BRACHYURY*) и энтодермы (*CollagenI*, *Fibronectin*, *KRT18*, *SOX17*, *FOXA2*, *AFP*) при спонтанной дифференцировке *in vitro* в эмбрионидных тельцах. Гистологический анализ срезов тератом, полученных при спонтанной дифференцировке *in vivo*, выявил присутствие производных экто-, энто- и мезодермы, а также экстраэмбриональных тканей. Полученные линии ИПСК дифференцированы в моторные нейроны, демонстрирующие экспрессию основных маркеров данного типа клеток.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ КАК ОБЪЕКТЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Васькова Е.А.

ФГБНУ “ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН”, Новосибирск, Россия
Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им.
акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

e-mail: vaskova@bionet.nsc.ru

Появление технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток открыло большие возможности для их использования в различных областях, таких как создание модельных систем для изучения молекулярных основ развития заболеваний, возможностей их терапии, скрининга библиотек лекарственных заболеваний и ряда других. Однако, несмотря на огромные преимущества данных моделей, существуют и ограничения. Так, условия *in vitro* неспособны отразить в полной мере все взаимодействия различных типов клеток и тканей живого организма. Совместить биомедицинские исследования, проводимые *in vitro* и *in vivo*, возможно при использовании животных для моделирования заболеваний. В настоящее время уже получен огромный массив линий животных, на которых моделируются приобретенные и наследственные заболевания человека.

В данной работе будет представлен обзор последних достижений в области получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток различных видов животных и их использования для решения ряда биомедицинских задач.

ЦИФРОВАЯ КАПЕЛЬНАЯ ПЦР И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Вернер А.Э.

ООО «Био-Рад Лаборатории», Москва, Россия

e-mail: andrey_verner@bio-rad.com

Методы геномного редактирования переживают период необычайного прогресса, а области их применения постоянно расширяются. Тем примечательнее, что новый метод в молекулярной биологии — цифровая капельная ПЦР (ddPCR) — оказался идеальной сопутствующей технологией для оптимизации условий проведения геномного редактирования и для отбора трансформированных клеток, содержащих целевую последовательность ДНК. Стратегии использования ddPCR варьируют в зависимости от того, какой подход, NHEJ или HDR, используется в редактировании генома.

Являясь методом прямого количественного определения ДНК (без использования калибровочной кривой), ddPCR обеспечивает высокую чувствительность (<0.2% минорного генома) и высочайшую точность и воспроизводимость результатов. В сочетании с быстротой получения результата (в течение одного дня) и относительной дешевизной метод является прекрасной альтернативой другим, более традиционным, методам тестирования результатов геномного редактирования: секвенированию по Сэнгеру, NGS и эдонуклеаза T7/Surveyor детекции.

Эффективность использования CRISPR/Cas9 в сочетании с ddPCR была продемонстрирована в серии интересных публикаций и становится общепринятым подходом при решении задач геномного редактирования.

NGS-ТЕХНОЛОГИИ И ПЕРСОНИФИЦИРОВАННАЯ НЕВРОЛОГИЯ: НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ

Ветчинова А.С.*, Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Ключников С.А.,
Кунецкий В.Е., Иллариошкин С.Н.

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

*e-mail: annvet@mail.ru

Диагностика и профилактика дегенеративных заболеваний мозга представляют собой чрезвычайно актуальную проблему современной неврологии в связи с их неоспоримой социальной значимостью, высоким удельным весом в общей структуре неврологической патологии, неуклонно прогрессирующим течением, тяжестью клинических проявлений, выраженной физической, психической и социальной дезадаптацией пациентов. При этом развитие наследственных нейродегенеративных заболеваний связано с большим количеством самых разнообразных генетических нарушений: от точковых мутаций до макроделаций и динамических мутаций. Развитие технологий молекулярно-генетического анализа привело к созданию перспективного метода секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS), позволяющего анализировать несколько генов быстро, одновременно и с надежными результатами. Разработанная нами генетическая панель (300 генов) предназначена для диагностики социально значимых нейродегенеративных синдромов: паркинсонизма, тремора, дистонии, параплегии, хорей, лейкоэнцефалопатии, дегенеративной деменции и болезни мотонейрона. Благодаря разработанному нами подходу в семье, страдающей наследственной аутосомно-доминантной формой спастической параплегии, у двух двоюродных братьев была выявлена миссенс-мутация Thr541Asn в гене *SPAST*, соответствующая наследственной спастической параплегии типа 4 (SPG4). В случае sporadic заболевания у 4-летнего ребенка, характеризующегося задержкой умственного развития, выявлена вставка Gly112_Ser113insGlyGly в гене *DDHD1*, связанная с редкой формой параплегии типа 28 (SPG28). Нами также были найдены положительные находки в генах *NPC1* (Болезнь Ниманна-Пика типа C), *Notch3* (лейкоэнцефалопатия), *GCH1* (дистония) и др. В клинической практике применение панельного скрининга может быть полезным инструментом для установления молекулярной диагностики генетически гетерогенных и редких нейродегенеративных синдромов.

Работа проведена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60714X0094).

РЕДКИЙ СЕМЕЙНЫЙ СЛУЧАЙ ЭКСТРЕМАЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ХРОМОСОМЫ 21

Гайнер Т.А.^{1,2*}, Каримова О.Г.^{1,2}, Слепухина А.А.¹

1 ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия

2 ООО «Центр персонализированной медицины», Новосибирск, Россия

*e-mail: tatyana@cnmt.ru

При исследовании кариотипа с помощью классических цитогенетических методов перед врачом-цитогенетиком нередко встает вопрос: является ли обнаруженный у пациента морфологический хромосомный вариант нормой или патологией. Отклонение в структуре или количестве хромосом, как правило, свидетельствует о наличии патологии. Исключением являются вариабельные районы в хромосомах человека, размер которых и морфология могут отличаться у разных индивидов. Это так называемый нормальный полиморфизм хромосом, который имеет разные степени выраженности: от малой до экстремальной. Присутствие полиморфизма, особенно в экстремальном варианте, следует подтверждать с помощью дополнительных методов окрашивания хромосом: CBG-окрашивания (С-окрашивания), Ag-NOR-окрашивания (серебрения).

Ниже представлен клинический случай выявления экстремального полиморфизма у пациента с нарушением фертильности и у его матери.

Мужчина 28 лет обратился к врачу-генетику с жалобой на отсутствие детей в браке в течение 10 месяцев. Из особенностей фенотипа у него присутствовали: дефект мочки уха слева, две макушки. При обследовании у пациента выявлены гипогонадотропный гипогонадизм, на УЗИ органов мошонки — киста придатка правого яичка, при пятикратном обследовании в течение 10 месяцев — выраженная олигоастенотератозооспермия (концентрация сперматозоидов в эякуляте менее 2 млн./мл, менее 1 млн. активноподвижных сперматозоидов в 1мл, менее 5% нормальных форм по данным морфологического анализа по Крюгеру). У пациента не обнаружено носительства наиболее частых мутаций в гене *CFTR*; не обнаружено наиболее частых делеций локуса *AZF*. На фоне медикаментозного лечения после окончания стимулирующей терапии наблюдалось улучшение показателей спермограммы — улучшение до нормы концентрации сперматозоидов и количества активноподвижных форм; без изменения: индекс Крюгера = 2% — тератозооспермия.

При цитогенетическом исследовании с использованием GTG-окрашивания у пациента выявлена хромосома 21 нетипичной морфологии, имеющая р-плечо, превышающее по размеру q-плечо. Для уточнения диагноза было использовано дополнительное окрашивание (серебрение), выявившее четырехкратное повторение спутничных нитей и спутников на коротком плече хромосомы 21. Кариотип пациента: 46,XY,21pstkststkstkpssss. В литературе нам не удалось найти описаний подобных случаев. Таким образом, пациент является носителем редчайшего экстремального варианта нормального полиморфизма хромосом.

В связи с тем, что вариант носит экстремальный характер, была дана рекомендация для исключения его влияния на фертильность проанализировать наследование хромосомы 21 (исследовать кариотипы родителей или сибсов). Кариотип отца пациента без особенностей: 46,XY. Кариотип матери: 46,XX,21pstkststkstkpssss. Данные о фенотипе матери отсутствуют. Таким образом, сын является носителем материнского варианта хромосомного полиморфизма. Вероятно, снижение фертильности у пациента не связано с носительством данного хромосомного варианта.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ ДО И ПОСЛЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ *IN SITU*

Глушкова Т.В.^{1*}, Севостьянова В.В.¹, Антонова Л.В.¹, Сергеева Е.А.¹, Миронов А.В.¹, Васюков Г.Ю.¹, Сейфалиан А.М.², Кудрявцева Ю.А.¹, Барбараш О.Л.¹, Барбараш Л.С.¹

1 Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

2 University College London, London, England

*e-mail: bio.tvg@mail.ru

Использование графтов из биodeградируемых материалов является перспективным подходом тканевой инженерии для выращивания сосуда малого диаметра непосредственно в организме пациента. Однако деградация полимера после его имплантации в кровеносное русло при не полностью сформировавшихся тканях сосуда может привести к потере прочности с последующим образованием аневризм и разрывов стенки графта. **Цель исследования:** изучение процесса биомеханического ремоделирования полимерных графтов, модифицированных сосудистым эндотелиальным фактором роста (*VEGF*), после имплантации в брюшную аорту крыс. **Материалы и методы.** Сосудистые графты (\varnothing 2 мм) изготавливали из поликапролактона (*PCL*) и смеси полигидроксибутирата/валерата (*PHBV*) и поликапролактона методом электроспиннинга. Модификацию графтов молекулами *VEGF* осуществляли двухфазным электроспиннингом. Морфологию графтов, оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. *PCL/VEGF* и *PHBV/PCL/VEGF* графты имплантировали в брюшную аорту крыс популяции Wistar. Изменение морфологии графтов через 6 месяцев после имплантации изучали гистологическим методом. Физико-механические свойства графтов оценивали по результатам одноосного растяжения и исследования комплаентности. В качестве контроля использовали нативные сосуды человека, применяемые при операциях аорто-коронарного шунтирования. **Результаты.** *PCL* и *PHBV/PCL* графты по прочности не уступали внутренней грудной артерии человека, но обладали большей жесткостью и способностью к растяжению. По вязкоэластическим свойствам данные графты приближены к нативным сосудам. Модификация графтов *VEGF* способствовала снижению жесткости материалов. Через 6 месяцев после имплантации повреждений и аневризм стенки графтов не было выявлено. На внутренней поверхности графтов наблюдали эндотелиальные клетки, в толще стенки — волокна соединительной ткани и клеточные элементы: фибробласты, макрофаги, а также клетки инородных тел. Интеграция графтов с окружающими тканями способствовала изменению их физико-механических свойств относительно неимплантированного материала. Для *PCL/VEGF* и *PHBV/PCL/VEGF* графтов отмечено снижение предельного напряжения в 3 и 1,8 раз, относительного удлинения в 5,8 и 1,7 раз и модуля Юнга в 6 и 10 раз, соответственно. Стоит отметить, что по силе, приложенной к образцу до начала разрушения, графты после имплантации не имели достоверных отличий от *a.mammaria*, а по упруго-деформативным свойствам стали более приближены к нативным сосудам. **Заключение.** *PCL/VEGF* и *PHBV/PCL/VEGF* графты при функционировании в кровеносном русле в течение 6 месяцев не достигают критического предела снижения прочности, а их упруго-деформативные свойства приближаются к свойствам нативных сосудов. Данные графты обладают удовлетворительными физико-механическими свойствами и потенциально могут быть пригодны для реконструкции кровеносных сосудов *in situ*.

CAR-ПЛАТФОРМА: ОСОБЕННОСТИ ДИЗАЙНА, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Горчаков А.А.^{1,2*}, Кулемзин С.В.¹, Кузнецова В.В.¹, Сизенцова Я.Г.^{1,2}, Чикаев Н.А.¹, Баранов К.О.¹, Гусельников С.В.^{1,2}, Беловежец Т.Н.², Сократян А.М.¹, Волкова О.Ю.¹, Мечетина Л.В.^{1,2}, Наякшин А.М.¹, Таранин А.В.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: gorchakov@mcb.nsc.ru

Химерные антигенные рецепторы (CAR) позволяют перенаправлять активность Т-клеток против раковых клеток. Крайне успешные клинические испытания CAR Т-клеток в терапии ряда онкогематологических заболеваний стимулируют активное развитие этой платформы в различных направлениях, таких как создание CAR-продуктов для терапии солидных видов рака, переход от аутологичных к универсальным/аллогенным CAR-форматам, обеспечение возможности генетического или фармакологического контроля степени активации CAR Т-клеток, повышение избирательности и т.д.

Ключевыми в структуре CAR являются два домена: антигенраспознающий и сигнальный. Чаще всего в роли антигенраспознающего модуля CAR используются scFv-фрагменты антител. Кроме того, в последнее время появились CAR с альтернативными доменами на основе пептидов, нативных лиганд-рецепторных пар, VLR, VHH, аднектинов и т.д., которые способны эффективно выполнять ту же функцию распознавания антигена. Такие форматы позволят значительно расширить список узнаваемых CAR антигенов и их комбинаций, что должно обеспечить большую избирательность и эффективность CAR Т-клеток.

Сигнальные последовательности в составе CAR определяют не только силу активационного сигнала, но и его качество, что приводит к различной способности CAR Т-клеточных продуктов активироваться при встрече с клетками-мишенями и долговременно персистировать в организме пациентов. Таким образом, исследование взаимосвязи структурных элементов CAR и терапевтического эффекта является приоритетным направлением противораковой клеточной иммунотерапии.

Нами создана большая коллекция ленти- и ретровирусных конструкций, кодирующих варианты CAR с различной модульной структурой против таких мишеней, как PSCA, PSMA, CD20, VEGFR2, IGF-1R, CEA и т.д. Полученные CAR используют как традиционные scFv, так и домены на основе Fn3-модулей в качестве антигенраспознающих доменов. Вклад этих и других структурных отличий в функциональность CAR был успешно протестирован *in vitro* на Т-клеточной линии Jurkat (активационный тест) и НК-клеточной линии YT (цитотоксический тест).

Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-10237.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИРОВАНИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Григорьева Е.В.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия

ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия

e-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Благодаря использованию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) появилась возможность моделирования процессов заболеваний, скрининга лекарственных препаратов и токсикологического скрининга, развития новых терапевтических подходов. Направленная дифференцировка ИПСК в узкоспециализированные типы клеток представляет уникальный инструмент для изучения и моделирования ряда нейродегенеративных заболеваний, поражающих специфические нейральные типы клеток. К таким заболеваниям относятся спинальная мышечная атрофия (СМА), амиотрофический боковой склероз (АБС), полиомиелит, вызванные избирательной гибелью моторных нейронов, болезнь Паркинсона, при которой происходит гибель средних шипиковых нейронов, болезнь Альцгеймера, поражающая кортексные нейроны. Дифференцированные производные ИПСК являются удобной модельной системой для изучения *in vitro* наследственных заболеваний и поиска средств их терапии. Однако имеются некоторые ограничения в использовании ИПСК, такие как потенциальная туморогенность любых стволовых клеток, низкая эффективность репрограммирования соматических клеток векторами, не интегрирующимися в геном реципиента. Также важной проблемой при направленной дифференцировке ИПСК является получение гомогенной популяции, состоящей из большого количества узкоспециализированных клеток, что, зачастую, осложнено в связи с несовершенством технологий. Одним из существенных ограничений использования в заместительной терапии дифференцированных производных ИПСК является большая трудоемкость и дороговизна разработанных на сегодняшний день протоколов. Задача современных исследователей — поиск новых эффективных, безопасных и менее затратных методов нейрональной дифференцировки в узкоспециализированные типы клеток, что сделает более доступными современные технологии заместительной клеточной терапии.

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ НУЖД РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Губарева Е.А.*, Кувейда Е.В., Сотниченко А.С., Гуменюк И.С., Гилевич И.В., Накохов Р.З., Редько А.Н., Алексеенко С.Н.

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

*e-mail: g_lena82@list.ru

Тканевая инженерия является одним из перспективных направлений регенеративной медицины, в которой применяются основные принципы химии, физики, клеточной биологии, материаловедения и инженерии для создания конструкций, обеспечивающих анатомическую и функциональную реконструкцию поврежденных органов и тканей (для восстановления структурной целостности и функциональной активности поврежденных органов и тканей). В настоящее время ведется активный поиск надежных, нетоксичных, устойчивых к инфекциям биосовместимых материалов, способных обеспечивать механическую стабильность на уровне целого органа, а также поддерживать адгезию и жизнеспособность различных типов клеток *in vitro* и выступать в качестве основы для роста и дифференцировки клеток реципиента *in vivo*. Биологически совместимые материалы не должны вызывать воспаление или реакцию отторжения, аллергию или сенсибилизацию, препятствовать процессу заживления, быть канцерогенными или вызывать местные осложнения. Для создания биологических каркасов мы применяли метод децеллюляризации донорских органов. В процессе децеллюляризации органы или ткани подвергаются физическому или химическому воздействию для удаления иммунногенных клеток, однако с сохранением ультраструктуры и компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), поддерживающего биомеханические свойства органа. Оптимальный метод децеллюляризации зависит от ткани/органа. Для децеллюляризации интраплевральных органов и тканей (сердце, легкие, диафрагма) на моделях крыс применялся детергентно-энзиматический метод. Мы использовали модифицированные протоколы с сокращением времени воздействия детергентами и энзимами: [очищенная вода, дезоксихолат натрия (Sigma, Швеция), Triton-X 100 (Sigma, Швеция), PBS, ДНКаза I типа (Invitrogen, Швеция), ЭДТА (Sigma, Швеция)]. В децеллюляризованных органах и тканях отсутствовали ядра и другие клеточные элементы. Архитектоника соединительной ткани осталась сохранной, как и адвентициальные оболочки мелких сосудов. Морфологические исследования продемонстрировали удаление внутриклеточных компонентов, включая такой тканеспецифичный белок как тропомиозин, а также МНС I и МНС II класса, фактор Виллебранда. При этом не наблюдается значительного повреждения компонентов ВКМ: сохранность ультраструктуры при сканирующей электронной микроскопии, сохранность внеклеточных белков, таких как коллаген I, коллаген IV, ламинин, фибронектин, эластин. Отсутствие иммуногенности было подтверждено количественным анализом ДНК в децеллюляризованных матриксах. При оценке биомеханических свойств каркасов установлено, что как нативные, так и децеллюляризованные органы обладали практически идентичными свойствами. Колориметрический анализ с использованием ХТТ-реагента, а также Live/Dead тест показал наличие жизнеспособности и метаболической активности клеток, засеянных на децеллюляризованные матриксы. В заключение стоит отметить, что получение децеллюляризованных матриксов сердца, легких и диафрагмы открывает перспективные возможности для создания тканеинженерных интраплевральных органов и тканей в обозримом будущем.

ПРОЕКТ UGENE В НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И В ОБУЧЕНИИ — ИМПОРТОЗАМЕЩЕНИЕ В ДЕЙСТВИИ

Данилова Ю.Э.*, Голосова О.И., Грехов Г.А., Пушкова Е.А., Кандров Д.Ю., Быкова И.В.

Новосибирский центр информационных технологий "УНИПРО", Новосибирск, Россия

*e-mail: yulia@unipro.ru

Уже не одно десятилетие российские исследователи в области молекулярной биологии пользуются в основном зарубежными пакетами. Продвинутое в программировании биологи также сами пишут разные программы и алгоритмы, делятся ими друг с другом. Однако в отрыве от авторов такие разработки иногда ведут себя непредсказуемо. Есть ли в РФ перспектива работы на отечественном и качественном биоинформационном софте?

Новосибирская ИТ-команда, специализирующаяся на системном и корпоративном программировании, с начала 2000-х заинтересовалась биоинформатикой, в сотрудничестве с биологами ННЦ разработала первые программные продукты. В 2008 году появился проект UGENE [1], открытая и свободная платформа биоинформатики. Области молекулярной биологии, которые сейчас покрывает UGENE [2] — это аннотирование генетических последовательностей с помощью десятков методов и удаленных баз данных, множественное выравнивание и филогения, синтетическая биология, обработка данных NGS [3], работа с белками. Единый программный и графический интерфейсы объединяют разнородные методы и алгоритмы, а дизайнер вычислительных схем существенно упрощает комплексные расчеты.

Сейчас число программных запусков продукта по всему миру исчисляется уже миллионами в год. Только 12 % пользователей — из РФ, остальные — из-за рубежа. Число серьезных научных статей, ссылающихся на проект, подходит уже к двум сотням. Продуктом пользуются престижные российские и зарубежные научно-исследовательские организации и университеты, а также коммерческие биотехнологические компании.

Поддержке пользователей уделяется много внимания: ни одно обращение не остается без ответа, а живые дискуссии приводят к улучшению функциональных возможностей проекта. Постоянно ведутся обучающие семинары и вебинары. В НГУ готовится к запуску новый междисциплинарный учебный курс "Практическая биоинформатика" с использованием UGENE. Число обращений за коммерческой поддержкой и разработкой специфичных инструментов анализа растет, и радует то, что сейчас они уже больше из России.

Ссылки:

1. Сайт UGENE <http://ugene.net>
2. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012. 28(8): 1166-1167.
3. Golosova O., Henderson R., Vaskin Y., Gabrielian A., Grekhov G., Nagarajan V., Oler A.J., Quiñones M., Hurt D., Fursov M., Huyen Y. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. *PeerJ*. 2014. 2: e644. doi:10.7717/peerj.644

НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ

Деев С.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

e-mail: dejev@ibch.ru

В настоящее время в России в условиях резкого ухудшения экологии и постоянного роста стрессовых воздействий все большее количество населения подвергается риску заболеть раком. Необходимы новые подходы и лекарственные средства для лечения онкологических заболеваний как на ранних стадиях, когда лечение особенно эффективно, так и на поздних стадиях, когда из-за метастазирования применение хирургических методов уже не дает положительных результатов. Благодаря последним достижениям фундаментальной науки стало возможным определять молекулярный профиль заболевания и адресно воздействовать на конкретные молекулярные мишени. Значительный прогресс в области новых приборов и материалов определил возникновение новой медицинской дисциплины — тераностики, объединяющей точную диагностику молекулярной мишени и эффективное и направленное терапевтическое воздействие на нее. В докладе будет рассмотрен ряд мультифункциональных надмолекулярных соединений для тераностики опухолей, сконструированных и охарактеризованных в лаборатории авторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00106).

1. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module. *Nat. Biotechnol.* 2003. 21: 1486-1492.
2. Деев С.М. Лебеденко Е.Н. Супрамолекулярные агенты для тераностики. *Биоорганическая химия.* 2015. Т. 41. № 5. С. 539–552.
3. Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. Denaturation-resistant bifunctional colloidal superstructures assembled *via* the proteinaceous barnase-barstar interface. *ACS Nano.* 2013. 7(2): 950-961.
4. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brilkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. Passive and active targeting of quantum dots for whole-body fluorescence imaging of breast cancer xenografts. *J. Biophotonics.* 2012. 5(11-12): 860-867.
5. Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. Self-assembling complexes of quantum dots and scFv antibodies for targeting and imaging of cancer cells. *PLoS One.* 2012. 7: e48248.
6. Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles. *PNAS USA.* 2010. 107(13): 5827-5832.
7. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. A novel far-red fluorescent xenograft model of ovarian carcinoma for preclinical evaluation of HER2-targeted immunotoxins. *Oncotarget.* 2015. 6: 30919-30928.
8. Generalova A.N., Kochneva I.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Guller A.E., Nechaev A.V., Shekhter A.B., Zubov V.P., Zvyagin A.V., Deyev S.M. Submicron polyacrolein particles in situ embedded with upconversion nanoparticles for bioassay. *Nanoscale.* 2015. 7(5): 1709-1717.

ПРИМЕНЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Дементьева Е.В.

Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина», Минздрав РФ, Новосибирск, Россия

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, Россия

e-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

Сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующие позиции среди причин смертности населения. Несмотря на определенные успехи в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, до сих пор сохраняется ряд проблем, включая получение моделей сердечно-сосудистых заболеваний для исследования их механизмов и тестирования лекарственных препаратов.

Технология индуцированных плюрипотентных стволовых клеток открыла новые возможности для получения пациент-специфичных кардиомиоцитов и создания на их основе клеточных моделей сердечно-сосудистых заболеваний. В докладе будет рассмотрен принцип использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для моделирования сердечно-сосудистых заболеваний, вызываемых нарушением функционирования ионных каналов или саркомеров кардиомиоцитов, представлены основные результаты применения данной технологии, а также затронуты проблемы, которые необходимо решить для дальнейшего внедрения моделей сердечно-сосудистых заболеваний на основе пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и кардиомиоцитов в биомедицину.

ВОЗМОЖНОСТИ ХРОНИЧЕСКОЙ СПИНАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ В ТЕРАПИИ НЕЙРОПАТИЧЕСКОГО БОЛЕВОГО СИНДРОМА РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ. ОПЫТ ФЦН

Дмитриев А.Б.*, Денисова Н.П.

ФГБУ ФЦН, Новосибирск, Россия

*e-mail: a_dmitriev@neuronsk.ru

Цель: оценить эффективность хронической эпидуральной стимуляции в терапии больных с хроническим фармакорезистентным болевым синдромом, обусловленным различной патологией.

Материалы и методы: система для хронической спинальной стимуляции (St.Jude) была имплантирована 129 пациентам с нейропатическим болевым синдромом. У 84 больных (65,3%) диагностирован синдром оперированного позвоночника (FBSS), у 10 (7,7%) — последствия перенесенной спинальной травмы, у 9 (7%) — диабетическая полинейропатия нижних конечностей, у 7 (5,4%) — комплексный регионарный болевой синдром II типа, у 7 (5,4%) — идиопатические тазово-промежностные боли, у 7 (5,4%) — затылочная невралгия, у 2 (1,5%) — постгерпетическая межреберная невралгия, у 2 (1,5%) — культевая боль, у 1 (0,8%) пациента — болевой синдром вследствие критической ишемии нижней конечности. Оценка эффективности лечения проводилась по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) и опроснику DN4. Катамнез составил от 6 до 32 месяцев.

Результаты: За 2013-2015 гг. в ФГБУ ФЦН была проведена тестовая стимуляция у 244 пациентов, при этом у 129 больных (52,8%) отмечено значительное уменьшение болевого синдрома. Им был выполнен второй этап хирургического лечения — имплантация постоянных электродов и генератора. Средний показатель ВАШ до операции составил 6,5 баллов (максимально — 9; минимально — 5), при выписке — 3,2 балла, через 3 и 6 месяцев средний показатель ВАШ снизился до 3,1 балла. Через 12 месяцев ВАШ составил 3,6 балла. Осложнения в виде выраженного болевого синдрома в месте имплантации генератора и необходимость удаления системы отмечались в 7 случаях (5,4%), миграция электродов — в 19 (14,7%).

Заключение: Хроническая эпидуральная стимуляция является эффективной и безопасной методикой в лечении хронических фармакорезистентных болевых синдромов.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ КОЖНОГО ПОКРОВА У ДЕТЕЙ С ОЖоговой ТРАВМОЙ

Докукина Л.Н.*, Чарыкова И.Н.

ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

*e-mail: luda.dokukina@yandex.ru

Актуальность. Развитие и совершенствование клеточных технологий — основное направление последних лет в сфере технологий восстановления кожного покрова у пациентов с ожогами.

Цель — стимуляция процессов репаративной регенерации кожного покрова у детей с ожоговой травмой путем применения аутологичных клеток в сочетании с фибриновым клеем «Тиссукол».

Материалы и методы. Пролечено 104 пациента в возрасте от 5 месяцев до 15 лет с ожогами II-III степени на площади от 4 до 80% поверхности тела. Площадь закрываемой аутоклетками поверхности составила от 100 до 800 см кв. Аутологичные клетки выделяли из предварительно забранного трансплантата и использовали при дермальных либо при глубоких ожогах после выполнения некрэктомии с соблюдением всех предусмотренных законодательством требований. Клеточная взвесь наносилась на рану, фиксировалась фибриновым клеем «Тиссукол» и прозрачным индифферентным раневым покрытием типа «Реперен».

Результаты. При поверхностных ожогах на 5-7 сутки отмечали полную эпителизацию ран и пациентов выписывали из стационара. В эти же сроки при глубоких ожогах раневое покрытие оставляли на ране и удаляли его по мере эпителизации. Сроки восстановления кожного покрова при глубоких ожогах составили от 7 до 14 дней, в зависимости от площади ран.

Выводы. Полученные результаты продемонстрировали хороший эффект во всех случаях применения аутологичных клеток кожи. Сочетанное применение фибринового клея «Тиссукол» с трансплантацией аутологичных клеток минимизирует оперативное вмешательство и является альтернативой свободной пересадки кожи при глубоких ожоговых поражениях, особенно при дефиците донорских участков.

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ СОСУДИСТОЙ НЕЙРОХИРУРГИИ

Дубовой А.В.

ФГБУ «Федеральный Центр Нейрохирургии», Новосибирск, Россия

e-mail: a_dubovoy@neuronsk.ru

Нейрохирургия — очень быстро развивающаяся отрасль медицины. Сосудистая нейрохирургия претерпела в последние 10-15 лет значительные изменения, связанные с разработкой и внедрением в практику новых методов диагностики и лечения аневризм, артерио-венозных мальформаций, стено-окклюзирующих заболеваний мозговых и брахиоцефальных артерий.

Сейчас на смену бывшему «золотому» стандарту диагностики сосудистой патологии головного мозга пришли неинвазивные методы: мультиспиральная компьютерно-томографическая ангиография и высокопольная магнитно-резонансная ангиография. Использование компьютерно-томографической и магнитно-резонансной перфузии позволяет изучить дефицит кровотока определенной зоны головного мозга.

Появились новые инструменты для выполнения эндоваскулярных операций, такие как стенты, перенаправляющие поток крови, новые виды отделяемых микроспиралей с памятью формы для создания 3D-клубка, новые микроспирали с гидрогелем. Эти достижения позволяют выключать из кровотока аневризмы, которые ранее считались неоперабельными. Также повысилась и радикальность эндоваскулярных методов хирургии. Для лечения артерио-венозных мальформаций в последние годы созданы и успешно используются различные клеевые композиции как на основе цианакрилатов, так и на основе полиэтиленвинилалкоголя, позволяющие за несколько этапов заполнять и выключать из кровотока анатомически сложные артерио-венозные мальформации. При минимальном количестве осложнений эндоваскулярная хирургия становится хирургией «одного дня».

Сосудистая микрохирургия также не стоит на месте. Последние десятилетия разработаны и внедрены в практику методики создания низкотоочных и высокотоочных анастомозов как экстра-интракраниальных, так и интра-интракраниальных. Это позволяет беспрепятственно оперировать на длительно выключенных из кровотока артериях мозга, а также создавать альтернативные пути тока крови в полости черепа. Такие методы реваскуляризации мозга помогают выключить из кровотока и удалить, если это необходимо, аневризму любой конфигурации, любого размера и почти любой локализации. Также за счет активного внедрения техники экстра-интракраниальных анастомозов удается выполнять реваскуляризирующие операции при сложной патологии брахиоцефальных артерий, например при субкраниально расположенной извитости или при протяженном критическом стенозе.

Внедрение операций под микроскопом с использованием большого увеличения и хорошего освещения позволяет улучшить качество визуализации мелких структур головного мозга (артерии, вены, нервные стволы, арахноидальные мембраны), что, в свою очередь, ведет к уменьшению травматичности хирургических манипуляций и ускорению восстановления больного. Благодаря большому оптическому увеличению и множеству новых высокотоочных микрохирургических инструментов, удается создавать анастомозы на поверхности и даже в глубине мозга с сосудами менее 1 мм в диаметре. Дальнейшее совершенствование микрохирургической и эндоваскулярной техники неуклонно приведет к еще большему повышению качества помощи больным.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ГЕНОТОКСИКОЛОГИИ

Жанатаев А.К.*, Дурнев А.Д.

ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

*e-mail: azhanataev@yandex.ru

Обязательной составной частью системы доклинического изучения безопасности новых лекарственных средств является их генотоксикологическая оценка. Наряду с международной гармонизацией подходов и совершенствованием методологии, внимание специалистов в этой области сосредоточено на новых вызовах, возникающих вследствие инновационного развития современной фармакологии, а также развития новых знаний о патогенетической роли генотоксических событий.

Пересмотра требует существующая методология оценки генотоксичности в генеративных клетках. Регламентированные тесты в силу ряда недостатков не позволяют в полной мере оценить вероятные риски, что требует разработки и валидации новых подходов с учетом особенностей процессов спермато- и оогенеза. При этом важнейшей задачей представляется оценка потенциальной анеугенности, лежащей, по современным представлениям, в основе многих репродуктивных нарушений.

Все большую актуальность приобретает проблема генотоксичности лекарств, полученных с применением нанотехнологий. Ведется активная разработка и внедрение в практику таких средств, но при этом до сих пор не разработана адекватная методология оценки их генотоксических эффектов и прогноза генотоксического риска применения человеком. Накопленный на сегодня пул экспериментальных данных свидетельствует о необходимости адаптации разработанных для химических соединений методических приемов под задачи наногенотоксикологии.

Практически не исследованной проблемой является оценка влияния лекарственных средств на ДНК митохондрий (мтДНК). Непосредственная близость к дыхательной цепи — главному источнику эндогенных генотоксикантов, активных форм кислорода, — и слабая защищенность по сравнению с ядерной ДНК определяют мтДНК как «легкую» мишень генотоксического воздействия. Фактологическая база по данной проблеме на сегодня достаточно слаба, что объясняется отсутствием должных методов детекции повреждений, сложностью оценки и трактовки результатов.

Открытым остается вопрос о методологии оценки генетической безопасности лекарственных средств для генной терапии. В качестве основных рисков применения средств этой группы рассматриваются потенциальная возможность вертикального переноса целевой последовательности ДНК и/или векторных последовательностей в генеративные клетки, а также вероятность инсерционного мутагенеза и канцерогенеза. Очевидно, что методология оценки должна быть основана на современных молекулярно-генетических и цитогенетических методах, однако конкретных решений или предложений к решению данного вопроса на сегодня нет.

Наконец, в настоящее время в России, в странах Европейского союза и США утверждаются(ны) регламенты, в соответствии с которыми средства для клеточной терапии отнесены к лекарственным средствам, в связи с чем требуется оценка генетической безопасности их применения. Методология этой работы требует специального обсуждения.

Перечисленные положения сформулированы на основе анализа международного опыта, собственных экспериментальных и методических разработок в области генотоксикологических исследований.

ОСТЕОТРАНСПЛАНТАТ — ПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Зайдман А.М.^{1*}, Шевченко А.И.², Корель А.В.¹, Шерман К.М.¹, Иванова Н.А.³, Косарева О.С.³

1 ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, Россия

2 ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

3 ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», Новосибирск, Россия

*e-mail: AZaydman@niito.ru

Задачей тканевой инженерии в травматологии и ортопедии является создание конструкции, отвечающей ряду требований: восстановление утраченного объема ткани, отсутствие токсичности и иммунореактивности и способность формировать органоспецифический регенерат. Подобный остеотрансплантат создан в ННИИТО.

Цель — исследовать тканеспецифичность и регенераторные потенции остеотрансплантата.

Материал и методы. Остеогенную дифференцировку хондротрансплантата, полученного из хондроцитов мини-поросенка (патент № 2392973) осуществляли в остеогенной среде в соответствии с протоколом патента (патент RN № 2574942).

Тканеспецифичность трансплантата исследовали методами морфологии и электронной микроскопии. Для иммунофлуоресцентного окрашивания использовали антитела к коллагену I, коллагену II, агрекану; фибронектину, поверхностному антигену CD44 и фактору фон Виллебранта. Детекцию антител осуществляли с помощью флуоресцентно меченых конъюгатов Alexa Fluor® 568 и Alexa Fluor® 488 с антителами к иммуноглобулинам кролика и мыши. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Nikon Ti-E.

Результаты. Через 14 суток трансплантат представлен клетками преостеобластами, а также сосудистыми полостями, выстланными эндотелием, экспрессирующим изолектин B4 и фактор фон Виллебранда. В цитоплазме преостеобластов определяется щелочная фосфатаза и окаймленные матричные пузырьки (ультраструктурные данные). В матриксе встречаются кальцификаты (реакция Косса). Через 30 суток трансплантат состоит из клеток остеогенного ряда, сформированных сосудов и кальцификатов. В центре трансплантата выявляются остеоидные балочки. Наблюдается экспрессия коллагена I типа, остеоонектина, CD44, фибронектина. Отсутствие экспрессии белков хондрогенной дифференцировки, агрекана и коллагена II, свидетельствует о тканеспецифичности остеотрансплантата. **Объектом для исследования** регенераторной потенции и иммунотолерантности остеотрансплантата избрана нижняя челюсть — производная клеток нервного гребня, для которой свойственен мембранозный тип остеогенеза. Через 14 дней сформированный дефект нижней челюсти заполнен костной тканью балочного строения. Через 30 суток дефект выполнен органоспецифической костной тканью. В контрольной серии в дефекте располагается соединительная ткань с редкими костными включениями.

Заключение. Хондротрансплантат, помещенный в остеогенную среду, претерпевает процесс трансдифференцировки по эволюционно-закрепленному пути: мезенхима — хрящ — кость. Использование трансплантата с направленной дифференцировкой клеток позволяет осуществить регенерацию костной ткани по типу первичного ангиогенного остеогенеза. Отсутствие гематогенной ткани в остеотрансплантате является фактором иммунной толерантности остеотрансплантата.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНО-НАПОЛНЕННЫХ СОСУДИСТЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

Захарова И.С.^{1,2,3*}, Саая Ш.Б.³, Живень М.К.^{1,2,3}, Шевченко А.И.^{1,2,3}, Струнов А.А.¹, Смирнова А.М.^{1,3,4}, Карпенко А.А.³, Покушалов Е.А.³, Иванова Л.Н.^{1,4}, Закиян С.М.^{1,2,3,4}

1 Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

3 Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

4 Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: zakharova@bionet.nsc.ru

В настоящее время в мире ведутся разработки тканеинженерных протезов сосудов. Актуальность этого направления связана с тем, что лечение ряда патологий кровеносных сосудов предусматривает замену на аллотрансплантаты, аутоотрансплантаты и синтетические протезы. Существуют проблемы выбора донора, отторжения трансплантата, непригодности аутоотрансплантатов, неудовлетворительные отдаленные показатели при использовании синтетических протезов, невозможность роста трансплантата. Разработка тканеинженерных конструкций, заселенных функциональными васкулярными клетками, будет способствовать созданию более долговечных сосудистых трансплантатов и приблизит их свойства к физиологическим. В данной работе впервые разработан протокол получения и обогащения функциональных эндотелиальных и гладкомышечных клеточных популяций из послеоперационного материала миокарда выходного отдела правого желудочка человека. Проведенная молекулярно-генетическая характеристика полученных клеток показала их функциональность и ангиогенную активность *in vitro* и *in vivo*. Показан высокий уровень экспрессии эндотелиальных маркеров CD31, фактора фон Виллебранда, способность образовывать капилляроподобные структуры в матрикеле, метаболизировать ацетилированные формы липопротеина низкой плотности, нарабатывать компоненты межклеточного матрикса. С помощью электронной микроскопии детектированы наличие и динамика формирования функциональных микровезикул — телец Вейбеля-Паладе, специфичных для эндотелиальных клеток. Совместное введение эндотелиальных и гладкомышечных клеток показывает высокий регенеративный потенциал в восстановлении кровообращения в ишемизированной области задней конечности и на модели васкуляризованного абдоминального трансплантата иммунодефицитных мышей. Функциональная оценка *in vivo* в эксперименте по трансплантации в аорту иммунодефицитных мышей подложек из синтетического материала, заселенных исследуемыми клетками, показала проходимость аорты на сроках от 4 до 20 недель.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00082.

КАРКАСНЫЕ БЕЛКИ, ЭКСПОНИРУЮЩИЕ ПЕПТИДЫ-ИМИТАТОРЫ ЭПИТОПОВ ВИЧ-1, УЗНАВАЕМЫХ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИМИ АНТИТЕЛАМИ

Карпенко Л.И.*, Рудометов А.П., Чикаев А.Н., Щербаков Д.Н., Бакулина А.Ю., Каплина О.Н., Ильичев А.А.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

*e-mail: karpenko@vector.nsc.ru

Стремительное распространение эпидемии СПИДа во всем мире (не исключая Россию) обуславливает необходимость создания вакцин для профилактики ВИЧ-инфекции. Несмотря на колоссальные ресурсы, затраченные на получение вакцины и острейшую конкуренцию в этой сфере, поставленная задача так и остается нерешенной по сегодняшний день. Традиционные подходы, основанные на использовании убитых или аттенуированных вирусов, а также субъединичных антигенов, оказались либо неэффективны, либо неприемлемы из соображений безопасности. Надежды на успех ученые сегодня связывают с появлением принципиально новых типов вакцин, для их создания необходимы антигены новых поколений.

Одно из перспективных направлений в создании новой генерации эффективных и безопасных вакцин основано на получении скафолдов (каркасных белков), экспонирующих линейные эпитопы ВИЧ-1 или их имитаторов, узнаваемых широконейтрализующими антителами (bNAbs).

В качестве носителя в первую очередь рассматривали частицы бактериофага M13, экспонирующие пептиды, отобранные в результате аффинной селекции с bNAbs VRC01.

Другим кандидатом в качестве белка-носителя являлся белок YkuJ из *Bacillus subtilis*. Этот белок выбран с помощью компьютерного моделирования, его третичная структура совпадала со структурой эпитопов, узнаваемых bNAbs 10E8. Две копии фрагмента эпитопа, узнаваемого 10E8, были встроены в YkuJ. Рекомбинантный белок был назван DNI. Ген, кодирующий белок DNI, был синтезирован и клонирован в составе плазмиды pET21a. В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат белка, пригодный для иммунизации лабораторных животных, который был охарактеризован с помощью ЭФ и иммуноблоттинга.

Третий кандидат в качестве белка-носителя — ВПЧ HBcAg. Были получены химерные варианты HBcAg, несущие пептиды-имитаторы, узнаваемые NAb VRC01. Полученные белки охарактеризованы и наработаны в препаративном количестве для проведения иммунизации лабораторных животных для оценки их способности индуцировать нейтрализующие антитела.

Работа выполнена при поддержке гранта РФН № 14-14-00660.

ДИСФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СПОРАДИЧЕСКОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Колосова Н.Г.*, Максимова К.Ю., Тюменцев М.А., Муралева Н.А., Рудницкая Е.А., Телегина Д.В., Киселева Е.В., Стефанова Н.А.

Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

*e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) — самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое становится причиной деменции на фоне атрофических изменений мозга. Заболеваемость БА растет по мере увеличения продолжительности жизни людей, эффективных способов профилактики и лечения БА нет. Это обусловлено неполнотой знаний патогенеза и поздней постановкой диагноза, базирующейся в основном на оценке когнитивных нарушений и поведения. Согласно доминирующей гипотезе «амилоидного каскада» центральным событием в патогенезе БА становится накопление нейротоксических форм пептида амилоида-бета ($A\beta$), но препараты, нацеленные на его подавление, оказались неэффективными. Растет количество аргументов в пользу того, что гиперпродукция $A\beta$ не выступает в роли фактора, инициирующего наиболее распространенную (~95%) спорадическую форму БА. Как один из ключевых факторов ее развития рассматриваются дисфункции митохондрий (М). Согласно гипотезе «митохондриального каскада», снижение синтеза АТФ и окислительный стресс вызывают гиперпродукцию $A\beta$, токсическое действие которого на М активизирует нейродегенеративные процессы. Механизмы, инициирующие нарушение функций М, и причинно-следственная связь между дисфункцией М и гиперпродукцией токсического $A\beta$ при развитии БА остаются неясными. Создание и характеристика биологических моделей заболеваний человека — продуктивный подход к выяснению молекулярно-генетических механизмов их патогенеза и разработке новых способов лечения и профилактики. Нами получены убедительные доказательства того, что уникальной моделью спорадической формы БА является созданная в ИЦиГ СО РАН линия преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых развиваются все ключевые признаки БА. Нами проведена оценка вклада дисфункции М в развитие признаков БА у крыс OXYS и влияние на него митохондриального антиоксиданта SkQ1 (пластохинонил-децил-трифенилфосфония). Установлено, что структурные аномалии М, гиперфосфорилирование тау белка, потеря синапсов, гибель нейронов в мозге крыс OXYS регистрируются раньше, чем усиленное накопление $A\beta$ ($A\beta_{1-42}$) и его внеклеточных агрегатов, которые выявляются позднее и соответствуют необратимым стадиям БА. Исследование транскриптома коры мозга крыс OXYS разного возраста методом RNA-seq подтвердило связь развития у них признаков БА с дисфункцией М и нарушением синаптической пластичности. Прием SkQ1 (250 нмоль/кг/день) с возраста 12 до 18 месяцев повысил способность к обучению и память у крыс OXYS и Вистар (контроль), снизил уровни $A\beta_{1-42}$ и $A\beta_{1-40}$ и фосфорилированного тау белка в гиппокампе и коре мозга крыс OXYS, подавил гибель нейронов и замедлил снижение плотности синапсов (оценивали методами электронной микроскопии и по белкам-маркерам синапсин I и PSD-95). Также SkQ1 увеличил количество М и улучшил их ультраструктурные параметры в гиппокампе. Результаты указывают на то, что замедление ассоциированных со старением структурно-функциональных нарушений М мозга — продуктивный подход к профилактике БА и подтверждают полученные ранее данные о перспективности использования с этой целью SkQ1.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-15-10005.

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ОНКТОКСИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

Кочнева Г.В.^{1,3*}, Рихтер В.А.², Рябчикова Е.И.², Нетесов С.В.³

1 Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

3 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: g.v.kochneva@yandex.ru

Конструирование рекомбинантных штаммов вируса осповакцины (ВОВ) с целью создания на их основе противоопухолевых препаратов является перспективным направлением биотехнологии. Ряд таких штаммов в настоящее время успешно проходит клинические испытания за рубежом. ВОВ обладает природной онкоселективностью, однако ее уровень зависит от штамма вируса. В наших исследованиях показано, что индекс селективности российского штамма Л-ИВП (GenBank Acc. KP233807.1) составляет больше 1000 в паре гомологичных культур клеток эпителия молочной железы раковая/нормальная MCF7 / MCF 10A. Штамм Л-ИВП способен не только вызывать прямую деструкцию опухолевых клеток, но также останавливать их деление в S-фазе клеточного цикла.

На основе штамма Л-ИВП нами был сконструирован ряд рекомбинантных штаммов с делециями генов тимидинкиназы (ТК) и ростового фактора (VGF, virus growth factor). Эти гены кодируют факторы вирулентности, и их удаление приводит к практически полной неспособности вируса реплицироваться в нормальных неделящихся клетках, но при этом сохраняется литическая активность в отношении раковых. Для усиления противоопухолевой активности в район делеции гена VGF проведена встройка трансгенов онкотоксических белков: апоптина (Apo), NS1 парвовируса (NS1) или лактапина (Lact). Показано, что эти белки обладают адресной апоптоз-индуцирующей активностью в отношении опухолевых клеток человека. Поскольку при лизисе раковых клеток происходит высвобождение ассоциированных с опухолью антигенов, которые, как известно, являются слабо иммуногенными, необходимо введение дополнительного иммуностимулирующего цитокина. Лучшим на данный момент является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ). Ген ГМКСФ человека был встроен в район делеции гена ТК. Таким образом, сконструированы три двойных рекомбинантных штамма Л-ИВП с фенотипом ТК⁻ГМКСФ⁺VGF⁻Apo⁺/NS1⁺/Lact⁺.

Все рекомбинантные штаммы показали высокую цитотоксическую активность и онкоселективность в отношении раковых клеток человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Методами проточной цитометрии и иммуногистохимии показано, что рекомбинанты эффективно индуцируют апоптоз раковых клеток человека. Ингибирование роста опухолей разного генеза и выживаемость продемонстрированы в иммунодефицитных и иммунокомпетентных мышинных моделях при интратуморальном и внутривенном введении рекомбинантных вирусов. Строгая внутриопухолевая репликация вирусов и антиметастатический эффект показаны на модели искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 на мышях линии nude с использованием методов электронной микроскопии и In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker).

ДИВЕРСИФИЦИРОВАННЫЕ ДОМЕНЫ FNIII-ТИПА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ОСНОВА МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АФФИННЫХ БЕЛКОВ И ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Кулемзин С.В.^{1*}, Баранов К.О.¹, Гусельников С.В.^{1,2}, Горчаков А.А.^{1,2}, Чикаев Н.А.¹, Сократян А.М.¹, Волкова О.Ю.¹, Кузнецова В.В.¹, Наякшин А.М.¹, Таранин А.В.^{1,2}

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: skulemzin@mcb.nsc.ru

Одной из основных тенденций в области конструирования иммунотерапевтических агентов нового поколения является функциональное усложнение и, в том числе, увеличение количества распознаваемых такими агентами мишеней. В случае традиционных моноклональных антител расширение функциональных возможностей в определенной степени ограничивается большими размерами этих молекул. В связи с этим проводится активный поиск и изучение искусственных антигенраспознающих белков неиммуноглобулиновой природы. Одной из альтернативных структур является домен FNIII-типа (Fn3) фибронектина человека. Он обладает небольшой молекулярной массой (~10 кДа), высокой стабильностью и низкой (в силу своего человеческого происхождения) иммуногенностью. Fn3 взаимодействует с лигандами за счет своих боковых петель, рандомизация которых позволяет создавать комбинаторные библиотеки с разнообразием до 10^{15} вариантов. Для поиска доменов необходимой специфичности в таких библиотеках используются методы *in vitro* скрининга. Тот факт, что в природных белках Fn3-домены представлены тандемными повторами (от двух-трех до нескольких десятков), позволяет предполагать возможность создания на их основе мультифункциональных терапевтических белков путем соединения доменов различной специфичности в мультидоменные цепи. В настоящей работе мы создали панель искусственных Fn3-белков, включающих от двух до пяти доменов. В качестве элементов этих белков использовали домены, случайно отобранные из созданной нами комбинаторной Fn3-библиотеки, а также домены с известной антиген-связывающей активностью. Исследовали различные свойства Fn3-олигомеров в виде секретируемых продуктов или антиген-распознающих модулей химерных антигенных рецепторов. Полученные данные показали, с одной стороны, сохранение антиген-связывающей активности Fn3-доменов в составе мультидоменных цепей, а с другой — важную роль первичной последовательности диверсифицированных петель в поддержании растворимости таких белков.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (гранты 16-04-00915А и 16-04-00789).

ИНГИБИТОР СТРИАТУМ-СПЕЦИФИЧНОЙ ТИРОЗИНОВОЙ ФОСФАТАЗЫ (БЕНЗОПЕНТАТИЕПИН ТС-2153) СНИЖАЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРОТОНИНОВЫХ 5-HT_{2A} РЕЦЕПТОРОВ МОЗГА

Куликова Е.А.^{1*}, Илларионова Н.Б.¹, Волчо К.П.², Хоменко Т.А.², Салахутдинов Н.Ф.², Хоцкин Н.В.¹, Баженова Е.Ю.¹, Куликов А.В.¹

1 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова, Новосибирск, Россия

*e-mail: lisa_kulikova@ngs.ru

Стриатум-специфическая тирозиновая фосфатаза (STEP) является белком внутриклеточной трансдукции и участвует в механизмах возникновения целого ряда нейропатологий. В Новосибирском институте органической химии был синтезирован ингибитор белка STEP — гидрохлорид 8-трифторметил-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин (ТС-2153). Было показано участие ТС-2153 в регуляции серотониновой системы головного мозга (5-HT). Однако механизм взаимосвязи белка STEP и 5-HT системы еще не был изучен. Известно, что 5-HT система головного мозга играет значительную роль в регуляции целого ряда форм нормального и патологического поведения. Одним из ключевых белков серотониновой системы являются 5-HT_{2A} рецепторы, которые располагаются на постсинаптической мембране во всех структурах мозга, оказывая существенное влияние на работу мозга. Активация этих рецепторов с помощью агониста DOI приводит к выраженной активации экспрессии белков раннего реагирования c-fos в мозге и вызывает синдром встряхивания головой.

Целью данной работы было исследование эффекта ингибитора STEP (ТС-2153) на функциональную активность 5-HT_{2A} рецептора мозга.

Материалы и методы. В качестве ингибитора белка STEP мы использовали ТС-2153 в дозах 10 и 20 мг/кг для острого введения и 20 мг/кг в течение 14 дней для хронического, per os. Через три часа после введения ТС-2153 животным делали однократную инъекцию агонистом 5-HT_{2A} рецепторов — DOI (1 мг/кг, в/б). Функциональную активность 5-HT_{2A} рецепторов измеряли по количеству встряхиваний головой в течение 20 минут, через 5 минут после введения DOI.

Первичная культура нейронов гиппокампа инкубировалась с ТС-2153 (10 мМ, 3 часа), а затем в нее добавляли DOI (1 мМ, 10 мин), после часа инкубации методом иммуноцитохимии исследовали количество c-fos экспрессирующих нейронов.

Результаты. В данной работе было обнаружено, что острое введение ТС-2153 в дозах 10 и 20 мг/кг дозозависимо снижало функциональную активность 5-HT_{2A} рецепторов ($F_{2,19}=10.06$, $p<0.001$). Также было показано, что хроническое введение ТС-2153 в дозе 20 мг/кг снижало функциональную активность 5-HT_{2A} рецептора по сравнению с контролем ($F_{1,13}=11.31$, $p<0.01$). На клеточных культурах гиппокампа было обнаружено достоверное влияние препарата ($F_{3,135}=133.5$, $p<0.001$) на процент c-fos положительных нейронов. Известно, что введение DOI приводит к увеличению c-fos экспрессии в клетках по сравнению с контролем и в данной работе мы подтвердили этот факт ($p<0.001$). Однако введение ингибитора STEP (ТС-2153) совместно с DOI отменяло эффект последнего ($p<0.001$).

Заключение. Таким образом, впервые было показано участие ингибитора белка STEP (ТС-2153) в снижении функциональной активности 5-HT_{2A} рецепторов головного мозга.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00466 мол_а.

ПРОБЛЕМЫ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ХРОСОМНОГО ДИСБАЛАНСА НА УРОВНЕ CNV

Лебедев И.Н.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томск, Россия

e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Применение микроматричного анализа и экзомного секвенирования в клинической практике генерирует огромный массив данных, отражающих изменчивость генома человека. Получение такой информации вызывает закономерный вопрос об интерпретации патогенетической значимости выявляемых микроструктурных геномных вариаций, особенно если они описываются впервые. В клинической и молекулярной цитогенетике данная проблема концентрируется вокруг полиморфизма по числу копий крупных блоков повторов ДНК (Copy Number Variation, CNV), клиническое значение которого обычно ранжируется в следующих категориях: доброкачественные полиморфные варианты, условно патогенные варианты, патогенные варианты и, наконец, варианты с неясной патогенетической значимостью. Отнесение CNV к той или иной категории, а соответственно прогноз для пробанда и успех медико-генетического консультирования для семьи, часто представляет нетривиальную задачу, решение которой должно учитывать размер перестройки, состав затрагиваемых генов, происхождение (*de novo* или унаследованные варианты), наличие опубликованных случаев со сходным клиническим эффектом.

Дополнительным критерием, по нашему опыту, может являться локализация CNV в геноме, особенно в областях, фланкированных низкокопийными повторами ДНК или сегментными дупликациями. Неаллельная гомологичная рекомбинация между блоками сегментных дупликаций приводит к закономерному возникновению реципрокных хромосомных микроделечий и микродупликаций. Не удивительно, что в последнее время отмечается заметный прогресс в идентификации новых микродупликационных синдромов, обусловленных реципрокными хромосомными микроперестройками. Вслед за генетической реципрокностью начинают складываться представления и о гено-фенотипических корреляциях при таких типах аббераций. Картина так называемых «сестринских геномных заболеваний» (genomic sister disorders), а к настоящему времени их насчитывается 58 пар (Кашеварова, Лебедев. Генетика, 52(5), 2016) может быть представлена как сходными, так и полярными клиническими фенотипами, что имеет особую ценность для интерпретации патогенетической значимости впервые описываемых CNV в определенном хромосомном сегменте.

Следует отметить, что взаимоотношения «генотип – фенотип», установленные для реципрокных микроделечий и микродупликаций, могут и должны быть, по всей видимости, расширены и на более значительные изменения копийности — трипликации и даже квадрипликации хромосомных сегментов. Несомненно, это усиливает клиническую значимость CNV в том или ином регионе генома, особенно в случае локализации в нем дозозависимых генов, для пациентов с признаками хромосомного заболевания. Вместе с тем, наличие таких протяженных вариаций акцентирует внимание на том, что молекулярные механизмы генерации CNV не могут быть ограничены неравным кроссинговером между блоками сегментных дупликаций, а включают также механизмы, основанные на процессах репликации и репарации ДНК.

Исследование поддержано грантом РФФ № 14-15-00772.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Лемак М.С.

ООО «Никон», Москва, Россия

e-mail: maria.lemak@nikon.ru

В последние годы одним из приоритетных направлений трансляционной медицины является использование наноматериалов для таргетной доставки лекарственных препаратов к их терапевтическим мишеням. Для всесторонней оценки цитотоксичности и биодоступности новых лекарственных форм важно тщательно исследовать распределение наноконтейнеров в клетке и их влияние на межбелковые взаимодействия и клеточные сигнальные каскады. Для решения этой задачи на базе исследовательского инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E была создана уникальная модульная система Ti-LApp, которая позволяет объединять одном микроскопе несколько инструментов для разноплановых исследований под автоматизированным управлением программного обеспечения NIS Elements JOBS. Так, например, в систему Ti-LApp входит система управляемого позиционированного освещения на основе технологии DMD (Digital Mirror Device), которая позволяет одновременно освещать в поле зрения область любой заданной формы, площадью от долей микрона, и является незаменимым инструментом для исследований методами FRET и фотоконверсии белков, и модуль FRAP для исследования диффузии молекул. Данные о динамике и взаимодействии биомолекул, полученные методами широкопольной флуоресцентной микроскопии, накладываются на изображения клеточных структур, полученных с нанометровым разрешением с использованием N-STORM 4.0, основанного на методе стохастической оптической реконструкции. Таким образом, сопоставление структурных и функциональных данных в клеточных моделях позволяет повысить надежность отбора наиболее эффективных и безопасных биоконтейнеров и в перспективе повысить вероятность успешного завершения их клинических испытаний.

ЭНДОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОХИРУРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА

Летягин Г.В.

ФГБУ Федеральный центр нейрохирургии, Новосибирск, Россия

e-mail: german.letyagin@mail.ru

Нейроэндоскопия — это дальнейший прогресс в «адекватной» малоинвазивной микрохирургии, что означает дальнейшее уменьшение повреждения нормально функционирующей ткани при максимальной эффективности воздействия на патологию. Эндоскопия центральной нервной системы, однако, сложнее, чем общехирургическая эндоскопия, в отличие от артроскопии или перитонеальной и торакальной эндоскопии. Здесь приходится работать в желудочке или в кисте головного мозга в жидкой ликворной среде. Поэтому для чувствительной ткани мозга необходимы специальные эндоскопы с малым диаметром, особая техника промывания и специальные эндоскопические инструменты и операционные техники.

Кроме «чистой» эндоскопии в нейрохирургии используется эндоскопическая поддержка в случаях трансназального удаления опухолей хиазмально-селлярной области, удалении опухолей основания мозга, при клипировании сосудистых аневризм головного мозга, в резекционной хирургии краниосиностозов костей черепа. Также эндоскоп используется в хирургии позвоночника и спинного мозга.

Варианты применения эндоскопии в нейрохирургии:

- эндоскопическая перфорация дна III желудочка при окклюзионной гидроцефалии;
- бужирование Сильвиевого водопровода и восстановление проходимости отверстий Люшка и Мажанди;
- эндоскопическая фенестрация многокамерных кист головного мозга при многоуровневой гидроцефалии;
- кистоцистернальное шунтирование при латеральных и срединных кистах головного мозга;
- удаление небольших опухолей желудочков мозга и взятие биопсийного материала.

Современные нейроэндоскопы имеют множество модификаций в зависимости от производителя и цели предназначения. В целом, их условно можно разделить на «обзорные» модели и высокотехнологичные «рабочие» эндоскопы с наличием каналов для продвижения инструментов, катетеров, коагуляционных электродов, лазерных «скальпелей», зондов, баллон-катетеров. Наиболее современные модели позволяют одновременно использовать два разных инструмента совместно с подачей и аспирацией жидкостей. Современные гибкие эндоскопы позволяют проникать в самые удаленные от прямого обзора области мозга, при этом имеют рабочие каналы для манипуляций. Самые современные гибкие видеоскопы имеют максимально качественный обзор изображения и освещения в глубине раны. Имеются разновидности эндоскопов «специального» назначения: шунтоскопы для работы внутри катетеров, эндоскопы для «тоннельной» резекции при синостозировании швов черепа. Весь этот арсенал эндоскопической техники имеется в ФГБУ ФЦН г. Новосибирска и применяется для хирургического лечения патологий центральной нервной системы у детей.

ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО НАЗНАЧЕНИЯ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Литвяков Н.В.^{1,2*}, Казанцева П.В.¹, Цыганов М.М.^{1,2}, Ибрагимова М.К.^{1,2}, Слонимская Е.М.¹, Чердынцева Н.В.^{1,2}

1 Томский НИИ онкологии, Томск, Россия

2 НИ Томский государственный университет, Томск, Россия

*e-mail: nvlitv72@ya.ru

В настоящее время ответ опухоли молочной железы на неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) наблюдается в 30-65% случаев в зависимости от молекулярного подтипа, а решение о ее назначении принимается на основе клинико-морфологических характеристик. **Цель:** разработать и клинически валидировать технологию персонализированного назначения НАХТ больным РМЖ для повышения ее эффективности. **Материалы и методы.** Для разработки технологии на первом ретроспективном этапе было обследовано 68 больных РМЖ (лечение в 2006-2010 гг.), которым проводили НАХТ. ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани до лечения. Микроматричный анализ CNV (Copy Number Variation) проводили на чипах Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array. На втором этапе клинически валидировали разработанную технологию. Проспективную группу составили 37 пациентов с люминальным В РМЖ, которым НАХТ персонализировано назначалась по результатам микроматричного анализа ДНК биопсийного материала до лечения. Группу исторического контроля составили 71 больной РМЖ люминального В подтипа, которым назначали НАХТ по клиническим показателям. **Результаты.** На первом этапе исследования были идентифицированы маркеры ожидаемой эффективности НАХТ, которые позволили бы определить целесообразность ее проведения, а также маркеры ответа опухоли на отдельные химиопрепараты для назначения схемы НАХТ. Было установлено, что при делеции хотя бы одного из локусов генов ABC (*ABCB5-3q27*, *ABCG2-4q22.1*, *ABCB3-6p21.32*, *ABCB1-7q21.1*, *ABCC1-16p11.2*) не формировался фенотип устойчивости и отмечалась 85-100% эффективность НАХТ [Litviakov N.V. et al., Oncotarget 2016]. Больные с CNV локусов 1q43, 11q22.1–23.3 или 18p11.2 отвечали на НАХТ, а у пациентов с нормальным состоянием этих локусов отсутствовал ответ на НАХТ ($p = 0.000005 - 0.0004$) [Литвяков Н.В. и др. 2014]. Амплификация локуса гена *TOP2A-17q21.2* обуславливала ответ на антрациклины [Казанцева П.В. и др. 2016]. Делеция локуса гена *TUBB3-16q24.3* определяла ответ на таксотер у 67% пациентов. Делеция локуса *BRCA1-17q21.31* в опухоли молочной железы отмечалась у 37% больных, и они хорошо отвечали на схему химиотерапии САХ (75%), но не на таксотер. Делеция локуса *TYMS-18p11.32* в 100% случаев была сопряжена с ответом на кселоду (САХ) и в 88% на фторурацил (ФАС). На основе этих данных была разработана технология персонализированного назначения НАХТ. При ее клинической валидации проводили микроматричное исследование ДНК опухоли до лечения, и при наличии хотя бы одного из выявленных маркеров ожидаемой эффективности НАХТ пациенты начинали лечение с НАХТ (в противном случае назначали операцию). Схему НАХТ подбирали индивидуально: при амплификации гена *TOP2a* назначали антрациклины (ФАС или САХ), при делеции *TYMS* назначали САХ, а не ФАС, при делеции *TUBB3* назначали таксаны, при делеции *BRCA1* в опухоли — препараты платины, а таксаны были противопоказаны. По результатам клинической валидации эффективность НАХТ в группе с персонализированным назначением составила 89% против 53% в группе контроля ($p=0,0017$ по критерию Фишера).

Поддержано грантом РФФИ № 15-04-03091.

СПОСОБНОСТЬ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПОДАВЛЯТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЗАВИСИТ ОТ СПОСОБА ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Лупатов А.Ю.^{1*}, Полтавцева Р.А.², Быстрых О.А.², Ярыгин К.Н.¹, Сухих Г.Т.²

1 Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

2 Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия

*e-mail: alupatov@inbox.ru

Применение нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) в качестве препарата для лечения заболеваний, связанных с нарушениями нервной системы, является подходом, хорошо зарекомендовавшим себя в доклинических и клинических исследованиях. Понимание иммуномодулирующих свойств НСПК позволит не только стимулировать регенерацию, но и проводить клеточную терапию, направленную на подавление аутоиммунных процессов, проявляющихся при нейродегенеративных заболеваниях. Ключевым звеном в развитии специфического иммунного ответа являются дендритные клетки (ДК). Это связано с их способностью представлять антигены в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости как первого, так и второго классов. Однако в литературе имеются противоречивые данные, касающиеся способности НСПК подавлять дифференцировку ДК из их предшественников *in vitro*. В данной работе мы исследовали 3 культуры НСПК фетального происхождения, полученных с использованием бессывороточных сред, и 4 культуры НСПК, полученных и культивируемых на среде, содержащей фетальную сыворотку коров. Оба типа культур были способны к росту в виде сфер и экспрессировали маркеры НСПК, включая нестин, виметин, β -III-тубулин и GFAP. Для оценки влияния НСПК на дифференцировку ДК клетки сокультивировали с моноцитами крови здоровых доноров. Через 4 дня совместного культивирования в присутствии GM-CSF и IL-4 эффективность дифференцировки оценивали по изменению соотношения уровня экспрессии CD14 и CD1a. НСПК, поддерживаемые на среде с сывороткой, практически полностью подавляли дифференцировку ДК из моноцитов. Напротив, «классические» НСПК такой способностью не обладали. Для сравнения субпопуляционного состава культур НСПК мы оценили экспрессию поверхностных маркеров. Клетки не экспрессировали маркеры гемопоэтических стволовых клеток и эпителиальный маркер CD24. Оба типа культур имели довольно низкий уровень экспрессии маркера ранних стволовых клеток — CD133. Поскольку способность мезенхимных стволовых клеток (МСК) активно подавлять дифференцировку ДК является хорошо установленным фактом, было интересно выяснить, не появляются ли клеточные субпопуляции, несущие маркеры МСК, в НСПК культурах при использовании сывороточной среды. Мы не обнаружили в культурах клетки, экспрессирующие CD105 (эндоглин) и CD54 (ICAM-1), присутствующие на МСК. CD90 (Thy-1), присутствующий как на МСК, так и на нейронах, в небольшой степени экспрессировался только в бессывороточных культурах, что скорее свидетельствует об их способности к нейрональной дифференцировке. В сывороточных культурах присутствовала субпопуляция, экспрессирующая CD44, и в меньшем объеме CD73⁺ клетки. Однако размеры этих субпопуляций были незначительны, и их наличие вряд ли может объяснять иммуномодулирующие свойства исследованных культур. Таким образом, способность НСПК подавлять дифференцировку ДК может радикально меняться при изменении условий культивирования. Это должно учитываться при разработке клеточных препаратов на основе НСПК для лечения повреждений нервной системы. *Работа поддержана РНФ, грант № 14-25-00179.*

БИМЕДИЦИНСКИЙ КЛЕТОЧНЫЙ ПРОДУКТ В ТЕРАПИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Лыков А.П.^{1,2*}, Бондаренко Н.А.^{1,2}, Суровцева М.А.^{1,2}, Ким И.И.^{1,2}, Кабаков А.В.¹, Казаков О.В.¹, Бгатова Н.П.¹, Повещенко О.В.^{1,2}, Повещенко А.Ф.^{1,2}

1 НИИКЭЛ, Новосибирск, Россия

2 НИИПК, Новосибирск, Россия

*e-mail: aplykov2@mail.ru

Введение. Терапия мультипотентными мезенхимальными стромальными/стволовыми клетками (ММСК) позиционируется как новый и обнадеживающий способ лечения ряда воспалительно-дегенеративных процессов, так как они являются прогениторными клетками для всех типов соединительной ткани, снижают апоптоз, модулируют воспаление и иммунный ответ. ММСК мобилизуются и мигрируют в зону ишемии, где продуцируют широкий спектр биологически активных веществ, способствующих ангиогенезу и ремодулированию внеклеточного матрикса. **Цель исследования** — оценка клинической эффективности биомедицинского клеточного продукта в терапии экспериментального острого инфаркта миокарда, экспериментальной диабетической язвы и экспериментальном воспалительном процессе в кишечнике. **Материалы и методы.** Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000). Сахарный диабет у мышей-самцов C₅₇Bl₆ индуцировали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина. КМ-ММСК получали из клеток костного мозга бедренных костей от мышей-самцов C₅₇Bl₆. В экспериментах использовали КМ-ММСК от 2-4 пассажа. Кондиционную среду (КС) от КМ-ММСК собирали при смене питательных сред от КМ-ММСК 2-4 пассажа. Термический ожог кожи модулировали прижиганием металлическим шпателем после обезболивания. У части животных в область ожога вводили физиологический раствор 200 мкл, 2x10⁵ ММСК или 200 мкл КС от ММСК или от фибробластов. Экспериментальный воспалительный процесс в кишечнике у мышей-самцов C₅₇Bl₆ индуцировали 3,5% раствором декстран сульфата, добавленного в воду для питья. У части животных в/в вводили 2x10⁵ ММСК от GFP-B6 мышей или 200 мкл КС от ММСК GFP-B6. Острый инфаркт миокарда у крыс-самок Wistar модулировали перевязкой левой передней нисходящей коронарной артерии. У части животных в перинфарктную зону миокарда вводили по 80 000 КМ-ММСК в пяти точках, или по 50 мкл КС от КМ-ММСК. Терапевтический потенциал оценивали по данным ЭКГ. **Собственные результаты.** Показано, что биомедицинский клеточный продукт способствует уменьшению выраженности некротических процессов в области ишемии миокарда по данным изменения комплекса QRS и зубца Т (p < 0,05). Кроме этого, биомедицинский клеточный продукт статистически значимо уменьшал высоту зубца Р (p < 0,05). Введение в область ожога биомедицинского клеточного продукта статистически значимо ускоряло эпителизацию раны в норме и на фоне гипергликемии. При экспериментальной модели воспалительного процесса в кишечнике введение биомедицинского клеточного продукта способствовала снижению выраженности воспалительной реакции и увеличению количества клеток Панета в криптах тонкого отдела кишечника. **Заключение.** Таким образом, показана терапевтическая эффективность КМ-ММСК и продуктов секреции КМ-ММСК при остром инфаркте миокарда, ожогах и воспалительных процессах в кишке, которая может быть внедрена в практическое использование гастроэнтерологии, в ожоговых центрах или в практику эндокринологов при терапии осложнений сахарного диабета — синдрома диабетической стопы.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ: РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Макаревич П.И.^{1,2*}, Парфенова Е.В.², Ткачук В.А.¹

1 Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

2 Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва, Россия

*e-mail: pmakarevich@mc.msu.ru

Генная терапия, являясь одним из ключевых направлений современной медицины, с момента появления прошла длительный путь становления, успехов и проблем. В настоящее время ее роль в лечении целого ряда заболеваний, которые до недавнего прошлого сопровождались необратимыми потерями функции органов, становится все более значимой за счет уникального механизма действия, связанного с активацией регенеративных процессов. За последние несколько лет в России и в мире активное развитие получил целый ряд отраслей генной терапии: терапевтический ангиогенез, лечение заболеваний печени, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, заболеваний и травм нервной системы, а также их тяжелых последствий.

Важным аспектом современной генной терапии является то, что для нее активно используются гены белков, участвующих в контроле регенеративных процессов в ткани. Это относится к факторам роста (*VEGF*, *HGF*, *bFGF*), плеотропным активаторам плазминогена (*uPA*), нейтрофинам (*BDNF*, *NGF*) и к подходам, использующим генетическую модификацию стволовых клеток для увеличения их терапевтического потенциала. В последнее время также большое внимание уделяется выяснению механизмов, за счет которых реализуется регенеративное действие генной терапии в тканях. В частности, влияние цитокинов на систему воспаления, клетки эндотелия и локальную активацию клеток-предшественников, которые являются ключевым компонентом, обеспечивающим регенерацию и восстановление функции тканей и органов. Все это позволяет говорить о полноценной роли генно-терапевтических подходов в регенеративной медицине и обсуждать развитие этого направления в свете существующих достижений и ряда проблем, связанных с балансом эффективности, безопасности и этических вопросов.

В докладе освещены основные результаты в этой области с анализом последних мировых данных и изложены возможные направления развития генной терапии в регенеративной медицине. Освещены подходы к решению проблемы повышения эффективности генной терапии, разработки комбинированной генной терапии и результаты их доклинических испытаний. В качестве актуальных задач рассмотрены возможности использования регуляции экспрессионной активности генно-терапевтических препаратов и механизмов переноса генетической информации с помощью внеклеточных везикул и других систем.

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Малахова А.А.^{1,2,3*}, Маланханова Т.Б.^{1,2,3,5}, Сорокин М.А.⁴, Сорокина А.Е.^{1,2,3}, Закиян С.М.^{1,2,3,5}

1 ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

2 ФГБУ «ННИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина», Новосибирск, Россия

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

4 ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

5 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: amal@bionet.nsc.ru

Моделирование наследственных заболеваний человека с использованием плюрипотентных стволовых клеток имеет большие перспективы в современной биомедицине. Используя методы редактирования генома, можно создавать панели изогенных клеточных линий, различающихся между собой лишь мутациями в определенных генах, ответственных за развитие того или иного заболевания. При этом исходные клетки, не несущие мутации, будут являться идеальным «здоровым» контролем. Болезнь Хантингтона — это наследственное нейродегенеративное заболевание человека, причиной которого является динамическая мутация удлинения тракта тринуклеотидных повторов CAG в кодирующей части первого экзона гена *HTT* (*Huntingtin*). Экспрессия мутантного аллеля приводит к формированию в клетке токсичной формы белка mHTT, имеющей удлиненный полиглутаминовый тракт (более 35 а.о.) и измененные биохимические свойства, в частности склонность к агрегации. Однако имеется очень мало данных о промежуточном звене, связывающем экспрессию и накопление внутри клеток mHTT с нейродегенеративными изменениями в специфических областях головного мозга.

Технология редактирования генома, основанная на использовании нуклеаз CRISPR/Cas9, позволяет направленно и высокоэффективно вносить двуцепочечные разрывы в геном культивируемых клеток, которые в присутствии донорной ДНК, имеющей участки гомологии с областью повреждения, репарируются методом гомологичной рекомбинации. В результате последовательность геномной ДНК частично замещается последовательностью донорной ДНК. Для внесения мутации экспансии тринуклеотидных повторов CAG в ген *HTT* нами была создана донорная плазмидная конструкция, содержащая тракт из 215 CAG, фланкированный плечами гомологии к гену *HTT*. Эффективность работы созданной системы редактирования генома была подтверждена на клетках линии НЕК293Т. Получено более 100 клонов, несущих мутантные аллели гена *HTT* различной длины, причем наблюдались как инсерции тракта повторов CAG, так и делеции протяженных участков первого экзона гена *HTT*. С использованием разработанной технологии внесения мутаций в геном культивируемых клеток нами было получено 15 изогенных линий ИПСК, несущих инсерцию протяженного тракта тринуклеотидных повторов в первом экзоне гена *HTT*. В дальнейшем мутантные линии ИПСК будут дифференцированы в нейральном направлении и использованы для изучения молекулярных механизмов развития болезни Хантингтона и тестирования потенциальных лекарственных препаратов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10128).

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ RGD-ПЕПТИДАМИ НА СВОЙСТВА СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА ИЗ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА/ВАЛЕРАТА И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

Матвеева В.Г.^{1*}, Антонова Л.В.¹, Сейфалиан А.М.³, Севостьянова В.В.¹, Мионов А.В.^{1,2}, Шабаетв А.Р.², Великанова Е.А.¹, Сергеева Е.А.¹, Кривкина Е.О.¹, Глушкова Т.В.¹, Кудрявцева Ю.А.¹, Барбараш О.Л.¹, Барбараш Л.С.¹

1 НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

2 Кемеровский кардиологический диспансер, Кемерово, Россия

3 Университетский колледж Лондона, Лондон, Великобритания

*e-mail: matveeva_vg@mail.ru

Продолжается поиск оптимального материала для изготовления сосудистого графта (СГ) малого диаметра для заселения клетками *in situ*. Комбинирование природного и синтетического биodeградируемых полимеров поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) (ПГБВ) и поликапролактона (ПКЛ) улучшает биосовместимость СГ, но она еще далека от идеальной. Для ее повышения использована RGD последовательность (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота), которая присутствует на многих белках внеклеточного матрикса и является сайтами клеточной адгезии. **Цель исследования** — оценить влияние модификации RGD-пептидами на морфологию, физико-механические свойства, комплаентность и биосовместимость СГ из ПГБВ/ПКЛ. **Материалы и методы.** СГ изготовлены электроспиннингом из ПГБВ/ПКЛ, часть СГ модифицирована RGD-пептидами методом ковалентного связывания. Детекцию аминокислот на поверхности полимера проводили с помощью окраски оранж II и нингидри-нового теста, идентификацию RGD-пептидов с помощью Фурье-ИКС, аминокислотный состав синтезированного RGD-пептида тонкослойной хроматографией (ТСХ). Морфологию СГ оценивали методом сканирующей электронной микроскопии, физико-механические свойства на универсальной испытательной машине, комплаентность на оригинальной установке в условиях пульсирующего потока. Для изучения биосовместимости модифицированные и немодифицированные RGD-пептидами СГ были имплантированы в брюшную аорту крыс на 1, 3, 6 месяцев и далее подвергнуты гистологическому, иммуногистохимическому и иммунофлуоресцентному анализу. **Результаты.** Подтверждена успешная модификация поверхности СГ RGD-пептидами (на образцах с RGD окраска оранжем II и нингидриновый тест обнаружили первичные амины; метод Фурье-ИКС – специфичные пики для RGD-пептидов; ТСХ – присутствие в образце аргинина/аспарагиновой кислоты). Модификация RGD-пептидами изменила пористую структуру СГ (уменьшился средний диаметр волокон и площадь пор), не повлияла на комплаентность, но снизила прочность, эластичность и жесткость каркасов, делая их более схожими с показателями внутренней грудной артерии. Через 6 мес. после имплантации все СГ, с и без RGD, были 100% проходимы. При этом СГ с RGD к 1, 3, 6 мес. имплантации на 25% реже формировали пристеночные тромбы. В случае отсутствия тромба, частичная эндотелизация СГ с RGD зарегистрирована на 1 мес., а полная на 3мес. имплантации, тогда как СГ без RGD эндотелизировались к 6 мес. Формирование неоинтимы у части СГ с RGD обнаружено на 3 мес. имплантации, тогда как у СГ без RGD описана не ранее 6 мес. **Выводы.** Модификация СГ из ПГБВ/ПКЛ RGD-пептидами не повлияла негативно на комплаентность и физико-механические свойства, при этом улучшалась биосовместимость материала и снизилось тромбообразование. Метод может быть использован для создания СГ малого диаметра на основе ПГБВ/ПКЛ для заселения клетками *in situ*.
Работа поддержана РНФ (проект № 14-25-00050).

CRISPR-РЕВОЛЮЦИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Медведев С.П.

ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
ФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения
Минздрава России, Новосибирск, Россия

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

e-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Относительно недавно в арсенале исследователей появился универсальный инструмент редактирования генов и геномов, который произвел настоящую революцию в области изучения функций генетических элементов в нормальных и патологических процессах, а также вывел на новый уровень биотехнологические исследования, — это система CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)/Cas9 (CRISPR-associated). CRISPR/Cas9 является адаптированной для функционирования в клетках эукариот системой «приобретенного иммунитета» бактерий и архей, с помощью которой они борются с бактериофагами и чужеродными плазмидами. Благодаря простоте устройства данного инструмента, в настоящее время для редактирования геномов эукариот чаще всего используют нуклеазу Cas9 бактерии *Streptococcus pyogenes* совместно с химерной направляющей РНК (single guide RNA или sgRNA), он широко применяется во множестве исследовательских лабораторий по всему миру. Благодаря этому, по своему вкладу в развитие биологических и биомедицинских исследований его часто ставят на одну ступень с методом полимеразной цепной реакции. Уже сейчас, спустя всего три года с момента выхода первых работ по применению CRISPR/Cas9 для редактирования геномов эукариотических клеток, данная система применяется в биотехнологии и фундаментальной медицине. В частности, ее активно используют для создания растений и животных с новыми свойствами. При этом сроки и стоимость создания данных организмов кардинально сокращаются. Система CRISPR/Cas9 применяется для редактирования геномов культивируемых стволовых клеток человека, в том числе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Это позволяет создавать изогенные клеточные модели наследственных болезней, а также получать материал для их заместительной терапии. Кроме того, проведено множество исследований по поиску генов, ответственных за развитие патологических процессов, в том числе генов, продукты которых участвуют в процессах пролиферации и метастазирования раковых клеток. Одним из основных преимуществ системы CRISPR/Cas9 является возможность создания библиотек векторов, которые нацелены на большинство генов генома, что делает возможным скрининговые исследования в широчайшем масштабе. Таким образом, сегодня CRISPR/Cas9 является универсальным инструментом биомедицинских исследований. При этом сама технология совершенствуется. В арсенале исследователей появляются разновидности и ортологи белка Cas9, которые обладают новыми свойствами. Рациональному дизайну подвергаются и направляющие РНК. Все это вселяет осторожный оптимизм и надежду, что развитие данной технологии в будущем позволит эффективно и безопасно исправлять наследственные дефекты во взрослых организмах.

ОСОБЕННОСТИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Мурашев А.Н.*, Рассказова Е.А.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

*e-mail: murashev@bibch.ru

Препараты на основе моноклональных антител (МкАТ) относятся к биотехнологическим лекарственным средствам. Методические рекомендации проведения доклинических исследований для таких препаратов отражены в следующих нормативных документах: ГОСТ Р 56699-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации», Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Москва, 2012, глава 9 «Методические рекомендации по доклиническому изучению безопасности лекарственных средств, полученных на основе биотехнологий»), Руководство международной конференции по гармонизации (ICH) по оценке безопасности лекарственных средств (S6, Biotechnological products), Руководство Всемирной организации здравоохранения (Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products). Одним из обязательных условий для одобрения к применению биотехнологических препаратов по рекомендациям Европейского агентства по лекарственным препаратам (EMA) и Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (FDA) является оценка их иммуногенности. Способность препаратов МкАТ, полученных с помощью биотехнологических методов, генерировать антитела может являться механизмом, обуславливающим отсутствие ответа на терапию, и причиной безуспешного лечения. Антитела, вырабатываемые в организме в ответ на введение МкАТ, могут снижать их эффективность, конкурируя с эндогенными лигандами (нейтрализующие антитела) и способствовать образованию иммунных комплексов, ускоряющих выведение препарата, снижая его биодоступность. На частоту и выраженность иммунного ответа влияют факторы, связанные со структурой МкАТ, присутствием примесей, особенностями заболевания, состоянием пациента. Препараты МкАТ, характеризующиеся минимальным присутствием аминокислотных последовательностей мышиноного происхождения или их полным отсутствием, проявляют менее выраженную антигенную активность. Принципиальным моментом в проведении доклинических исследований иммуногенности препаратов МкАТ является выбор адекватных *in vivo* моделей и оценка их иммунологического статуса перед началом введения препаратов. В ряде исследований было выявлено существование парадоксальной зависимости между дозой вводимого препарата МкАТ и иммуногенностью. Так, было показано, что начальные более высокие дозы таких препаратов МкАТ, как инфликсимаб или адалимумаб являются менее иммуногенными, по сравнению с более низкими дозами. Это обстоятельство указывает на то, что целесообразно проводить изучение иммуногенности при разных уровнях доз препаратов МкАТ.

Согласно Федеральному закону от 22.12.2014 №429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» доклинические исследования лекарственных средств для медицинского применения должны проводиться в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти.

Основные положения надлежащей лабораторной практики отражены в межгосударственном стандарте ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», который введен в действие в РФ с 1 августа 2015 года. Он идентичен документу Организации экономического сотрудничества и развития (Guide №1:1998 «OECD Principles of good laboratory practice»).

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ПЕРИФЕРИЙНЫЙ МОНИТОРИНГ В ОНКОЛОГИИ

Натальин П.Б.

Thermo Fisher Scientific. Inc., Москва, Россия

e-mail: Pavel.Natalin@thermofisher.com

Успехи научных и клинических исследований привели к смене парадигмы в онкологии: от анатомической классификации рака к молекулярному пониманию причин на уровне мутаций в определенных генах, активирующих или дезактивирующих сигнальные пути в клетке. Эта работа привела к появлению таргетных препаратов, оказывающих значимый терапевтический эффект для пациентов, несущих определенную мутацию. Число таргетных препаратов растет, а с ним растет и количество мутаций, от выявления которых зависит назначение лекарства. Рутинный анализ большого количества генетических маркеров осложняется ограниченным количеством биоматериала, его генетической гетерогенностью, потребностью выявления увеличивающегося числа маркеров одновременно, недостаточной чувствительностью и высокой стоимостью традиционных молекулярных методов. Высокопроизводительное секвенирование (NGS) позволяет преодолеть указанные трудности. Мы разработали технологию таргетного секвенирования, обладающую высокой производительностью, точностью и чувствительностью. В сочетании с набором готовых и создаваемых на заказ таргетных панелей генов, наш подход позволяет одновременно детектировать герминальные и соматические мутации с аллельной частотой 1% и меньше, выявлять инсерции-делеции, CNV и химерные транскрипты в нескольких нанограммах ДНК и РНК, полученных из опухолевых тканей, фиксированных формалином (FFPE) или образцов «жидкой биопсии». Мы также разработали технологию для захвата циркулирующих опухолевых клеток, которая в сочетании с NGS позволяет проводить периферийный мониторинг для раннего обнаружения повторного возникновения опухолей.

Для задач, не требующих генотипирования большого количества локусов, а также для подтверждения результатов NGS используется секвенирование по Сэнгеру. Мы разработали протокол и программное обеспечение, позволяющее выявлять аллельные варианты с частотой 5% и менее процентов, используя капиллярные генетические анализаторы.

ПОЛУЧЕНИЕ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛАКТАПТИНА

Немудрая А.А.^{1*}, Макарецова А.А.¹, Кулигина Е.В.¹, Коваль О.А.^{1,2}, Рихтер В.А.¹

1 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: ann.vaskova@gmail.com

Рекомбинантный аналог протеолитического фрагмента к-казеина человека RL2 индуцирует апоптоз раковых клеток мыши и человека в культуре и тормозит рост и метастазирование опухолей животных и человека (Koval O.A. et al., 2012; Koval O.A., 2014). Доклинические испытания лекарственного средства «Лактаптин», созданного на основе RL2, показали безопасность и противоопухолевую эффективность препарата. Однако «Лактаптин», как и другие белковые терапевтические препараты, равномерно распределяется по органам и тканям организма, что снижает эффективность его противоопухолевого действия (Бондаренко Д.А. с соавт., 2015).

Одним из путей повышения эффективности терапевтического действия противоопухолевых лекарственных средств является создание рекомбинантных белков (слитых белков), которые объединяют онкотоксическое лекарство и опухолеспецифический пептид, обеспечивающий доставку лекарства непосредственно в опухоль. В настоящее время поиск и получение опухолеспецифических пептидов успешно проводят с использованием фаговых пептидных библиотек.

Целью исследования является получение рекомбинантных слитых белков, состоящих из RL2 и опухолеспецифических пептидов, отобранных методом аффинной селекции из фаговых пептидных библиотек.

Для получения специфических пептидов скрининг фаговой пептидной библиотеки (Ph.D.TM-12 Phage Display Peptide Library Kit (New England Biolabs, США)) проводили на раковых клетках и опухолевых моделях, которые обладают высокой чувствительностью к действию RL2. Проведен биопэннинг *in vitro* на клетках гепатоаденокарциномы-1 (ГА-1) мыши и клетках аденокарциномы молочной железы человека линий MDA-MB-231 и MCF-7. Биопэннинг *in vivo* выполнен на мышинной опухолевой модели ГА-1 и опухоли человека MDA-MB-231 в модели-ксенографтов.

На основе последовательностей отобранных пептидов и RL2 сконструированы рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие синтез слитых белков «опухолеспецифический пептид-RL2» в клетках штамма-продуцента *E. coli*. Проведена сравнительная оценка цитотоксической активности *in vitro* и противоопухолевой эффективности *in vivo* полученных слитых белков.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 14.607.21.0063 (RFMEFI60714X0063).

РЕДАКТИРОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА *Avp* КРЫС ЛИНИИ BRATTLEBORO С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS

Немудрый А.А.^{1,2,3,*}, Маланханова Т.Б.^{1,2,3,4}, Васькова Е.А.^{1,2,3}, Медведев С.П.^{1,2,3}, Закиян С.М.^{1,2,3}

1 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

2 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

3 Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

4 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: nemudryy@bionet.nsc.ru

Данная научная работа направлена на разработку терапии наследственных заболеваний с использованием современных методов редактирования геномов *ex vivo*. Наследственные заболевания, вызванные разного рода мутациями (точковые мутации в генах, хромосомные перестройки и т.д.), в настоящее время неизлечимы, поскольку их терапия сводится к устранению симптомов, не влияя на первопричину болезни (мутацию в геноме). Сочетание современных методов редактирования геномов и репрограммирования клеток к плюрипотентному состоянию является перспективным подходом, который позволит проводить регенерацию или восполнить функцию поврежденных в результате патогенеза наследственного заболевания клеток и тканей. Закономерным этапом перед внедрением подобных технологий является их доскональное изучение на модельных системах. В настоящее время существует потребность в создании модельных систем с использованием лабораторных животных, которые позволили бы проводить доклинические испытания.

В данной работе в качестве модельного объекта для апробации методов редактирования геномов и разработки клеточной терапии наследственных заболеваний использованы крысы линии Brattleboro, являющиеся носителями мутации в гене *Avp*, вызывающей наследственный гипоталамический несахарный диабет. В данной работе мы использовали систему CRISPR/Cas для внесения направленных изменений в целевой ген *Avp*, последовательность которого практически идентична последовательности гена *Oxt*. Тем не менее с помощью тщательного выбора сайтов для действия CRISPR/Cas9 нам удалось обеспечить узнавание целевого гена и избежать нецелевых эффектов в гене *Oxt*. Также в данной работе была создана система для гомологичной рекомбинации в гене *Avp* крыс линии Brattleboro, состоящая из векторов, кодирующих элементы системы CRISPR/Cas, и донорных плазмидных векторов; проведены эксперименты по исправлению мутации в гене *Avp*.

ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ И ЛЕЧЕБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ: НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ

Нетесов С.В.

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
Кольцово, Новосибирская область, Россия

e-mail: svn15@hotmail.com

Первые серьезные успехи в борьбе с инфекциями были достигнуты с помощью вирус-содержащих профилактических препаратов: инактивированных и живых вакцин против натуральной оспы и бешенства. Позднее были разработаны вакцины против желтой лихорадки, кори, паротита и других вирусных инфекций, и, в результате, в конце 20 века Всемирная организация здравоохранения назвала разработку и применение вакцин самым эффективным вкладом ученых в увеличение средней продолжительности жизни людей. В настоящее время число вирусных заболеваний, от которых имеются эффективные вакцины, уже приближается к двум десяткам, но в связи с выявлением немалого числа ранее неизвестных вирусов — патогенов человека, список необходимых и актуальных вакцин просто необходимо увеличить. Со всей очевидностью, вакцины нужны против таких заболеваний, как ВИЧ-инфекция и вирус гепатита С, и против ряда тропических инфекций: лихорадка денге, лихорадка Западного Нила, японский энцефалит, лихорадка чикунгунья, Зика. Однако все яснее также становится необходимость разработки вакцин против ряда респираторных инфекций: коронавирусов, пневмовирусов и парамиксовирусов, — поскольку они вызывают существенно больше серьезных респираторных заболеваний, чем вирусы гриппа.

Другая серьезная сфера применений вирусных препаратов — это борьба с раковыми заболеваниями. Первые положительные результаты в данном направлении появились еще в начале 20 века, но ввиду их низкого процента и непредсказуемости такие методы лечения ушли в забвение до конца 20 века. К этому времени кардинально возросли знания о природе онкозаболеваний и механизмах репликации вирусов, что дало возможность целенаправленно и существенно более успешно применять специально сконструированные вирусы для лечения некоторых генетически диагностированных форм рака. И в конце октября 2015 года весьма консервативное учреждение — Управление по контролю пищи и лекарств США (FDA) — дало официальное разрешение на 3 фазу клинических испытаний рекомбинантного онколитического герпесвируса. Таким образом, данное направление лечения онкозаболеваний вышло на новую ступень развития.

Третье направление использования вирусов в лечебных целях — это генная терапия наследственных или приобретенных заболеваний. Здесь вирусы используются для внедрения корректных копий человеческих генов в клетки организма больного человека с тем, чтобы скомпенсировать имеющиеся дефекты. На этом пути также были и удачи, и поражения, но исследователи и практики сейчас рассматривают данный способ введения корректирующей генетической информации как весьма перспективный, и его отдельные клинические применения уже доказали, что этим стоит заниматься.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК. ОПЫТ ЦЕНТРА БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. БУРНАЗЯНА

Никитина В.А.*, Астрелина Т.А., Нугис В.Ю., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Карасева Т.В., Осташкин А.С., Добровольская Е.И., Усупжанова Д.Ю., Брумберг В.А., Лаук-Дубицкий С.Е., Козлова М.Г., Бушманов А.Ю., Самойлов А.С.

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

*e-mail: nikitinava@yandex.ru

Сохранение исходных или направленно измененных свойств и адекватная оценка качества и безопасности биомедицинских клеточных продуктов уменьшает риск нежелательных побочных эффектов, влияющих на лечебный, восстановительный, регуляторный потенциал клеточной терапии. Генетическая гетерогенность клеточных культур определяется наличием в их составе генетически различающихся клеток, что может быть вызвано как внешними (меж- и внутривидовая кросс-контаминация), так и внутренними факторами (клональные и неклональные хромосомные aberrации). В Центре биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна создается генетическая информационная база данных, описывающая ДНК профиль (по STR-локусам) и кариотип клеточных культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, выделенных из костного мозга, жировой ткани, плаценты, десны. Мультиплексный анализ STR-локусов ДНК и кариотипирование — методы, рекомендованные для аутентификации клеточных культур в медицинских криобанках. Их использование позволяет избежать ошибок, связанных с нарушением технологий культивирования, приготовления культуральных сред, криоконсервации, маркировки клеточных продуктов и адекватной оценки их генетической стабильности. Первичная оценка проводится в клетках ткани-источника или на первом пассаже, вторичная — до пятого пассажа культивирования. Если возникает необходимость превысить регламентируемый клиническим протоколом предел уровня пассажей аттестованной культуры, проводится дополнительное исследование. Анализ ДНК профиля выполняется с помощью набора для амплификации 19 полиморфных STR-маркеров и локуса амелогенина человека, COrDIS Plus (ООО Гордиз, Россия). Кариотип клеточной культуры первично описывается с помощью GTG бэндинга хромосом, выборка для анализа (от 20 клеток) может увеличиваться, если необходимо подтвердить наличие клона, описание проводится согласно Международной номенклатуре хромосом человека. В спорных ситуациях или при недостаточном для проведения полноценного анализа количестве метафазных пластинок применяются методы молекулярной цитогенетики (mFISH, FISH с использованием центромерных, локус-специфичных или цельнохромосомных зондов, FISH на интерфазных ядрах), а также методы классической генотоксикологии: гель-электрофорез отдельных клеток, микроядерный тест. Клеточные культуры с нехарактерным (при кросс-контаминации) или измененным (например, потеря гетерозиготности при анеуплоидии, однородительской дисомии, нерцепирующих хромосомных транслокациях) STR профилем; с клоном клеток, характеризующихся любой хромосомной аномалией (транслокация, анеуплоидия, полиплоидия), а также с высоким уровнем случайных хромосомных aberrаций, ДНК повреждений и микроядер, не могут быть использованы для клинического применения. В таких случаях хранение запаса клеточного биопродукта в составе главного и посевного банков позволяет провести его дополнительное размораживание и экспансию, а после получения удовлетворительных результатов тестирования применять в клинических исследованиях.

СОХРАННОСТЬ ПРОФИЛЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК

Нуштаева А.А.^{1*}, Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.¹, Коваль О.А.^{1,2}

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: nushtaeva.anna@gmail.com

Разработка новых подходов к изучению и лечению онкологических заболеваний является актуальной задачей молекулярной биологии. Линии клеток рака молочной железы (РМЖ) широко используются как модели для исследования нарушения регуляции пролиферации, апоптоза и миграции раковых клеток в опухолевой прогрессии, а также как модели при исследовании противоопухолевых препаратов. Ни одна из существующих клеточных линий не воспроизводит достоверно модель РМЖ человека, а длительное их культивирование приводит к появлению субпопуляций, которые вносят значительные изменения в характеристические параметры линии. Для решения указанных проблем в настоящее время разрабатывают несколько подходов, в основе которых лежит создание первичных культур клеток.

Задачей данного исследования являлось получение первичных клеточных культур РМЖ, анализ молекулярных маркеров в полученных клеточных культурах, сравнение профиля маркеров с исходным биопатом, а также изучение туморогенности полученных культур на мышах SCID.

Для этого нами были разработаны способы получения первичных клеточных культур нормальной и онкотрансформированной ткани молочной железы. Полученные первичные клеточные культуры (*BC2-BC7*, *BrC1*, *BrC2*, *BrCCh1*, *BrCCh1N*, *BN1*, *BN2*) обладали многоядерностью (с ядрами овальной формы), имели цитоплазматические выступы и «шипики», от которых можно было наблюдать отделение везикул. В качестве молекулярных маркеров полученных культур были выбраны рецепторы эстрогена альфа и бета (*Era* и *Erb*), прогестерона (*PGR*), рецептора эпидермального фактора роста (*HER2*) и фермента ароматазы (*Cyp19*). Для большинства первичных клеточных культур было характерно увеличение уровня экспрессии мРНК *PGR* и снижение уровня экспрессии мРНК *Erb* по сравнению с исходным биопатом. Уровень экспрессии мРНК *Era* рецепторов остается неизменным для большинства первичных клеточных культур в сравнении с биопатом. Исследование мРНК *HER2* и *Cyp19* показало, что нет четкой тенденции изменения уровня экспрессии мРНК в первичных клеточных культурах по сравнению с биопатом. Наблюдаемые различия в уровне экспрессии молекулярных маркеров в культуре и биопате можно объяснить гетерогенностью клеточного состава биоптата; также условия культивирования первичной культуры вносят вклад в изменении профиля экспрессии.

Поскольку опухоли молочной железы с высоким уровнем экспрессии *PGR/Era/Erb* рецепторов, как правило, требуют дополнительной гормональной стимуляции роста при трансплантации на животных, для исследования туморогенности на иммунодефицитных мышах SCID нами были выбраны клеточные линии с низким уровнем экспрессии стероидных гормонов (*BrC1*, *BrCCh1*, *BC7*, *BC5*, *BC6*). Первичная культура клеток *BC6* с фенотипом *Era/Erb/PGR low/Cyp19* образовывала опухоль в месте введения клеток с эффективностью 100%. Обнаружено, что для этой опухоли характерно метастазирование в легкие и печень. Полученная опухолевая культура *BC6* может быть использована для тестирования новых лекарственных препаратов и канцерогенеза.

РЕГЕНЕРАЦИЯ МИОКАРДА: ИСТОЧНИК КАРДИОМИОЦИТОВ В ПОСТНАТАЛЬНОМ СЕРДЦЕ

Павлова С.В.^{1,2,3}, Покушалов Е.А.^{2,3}

1 ФГБНУ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

2 ФГБУ ННИИПК имени академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

3 ФГБНУ ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: spav@bionet.nsc.ru

Сердце млекопитающих не является терминально дифференцированным органом, однако скорость его самообновления чрезвычайно незначительна и составляет не более 1% кардиомиоцитов в год (Bergmann, 2009; Senyo, 2012).

До недавнего времени приоритетной идеей считалась регенерация сердца за счет кардиальной дифференцировки региональных стволовых клеток с фенотипом *c-kit*⁺. Однако в недавних экспериментах по изучению судьбы кардиальных *c-kit*⁺ клеток в эмбриональном и постнатальном развитии, а также после ишемического поражения миокарда было показано, что они являются предшественниками васкулярных клеток и интерстициальных фибробластов в сердце и не участвуют в кардиомиогенезе (van Berlo, 2014; Sultana, 2015). Следует отметить, что *in vitro* кардиальные клетки с фенотипом *c-kit*⁺ не являются предшественниками васкулярных клеток и характеризуются наличием мезенхимальных стромальных маркеров. Присутствие маркера *c-kit*⁺ у клеток первичной культуры, по всей видимости, отражает их способность к миграции и, возможно, является свидетельством эпителиально-мезенхимального перехода клеток эпикарда при культивировании фрагментов сердца *in vitro* (например, ушка предсердия).

Таким образом, механизм самообновления кардиомиоцитов в постнатальном сердце млекопитающих не определен. Возможно, что регенерация миокарда происходит за счет существования пула незрелых кардиомиоцитов, способных к пролиферации. Недавно было показано, что такие кардиомиоциты существуют в миокарде мышей в зоне естественной гипоксии и их количество согласуется с оценками скорости самообновления сердца (Kimura, 2015).

Проект поддержан программой фундаментальных исследований СО РАН № П.2П «Интеграция и развитие» 2016 г. № П.2П/VI.62-3.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СОВРЕМЕННЫХ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В РОССИИ – ОПЫТ «ГосНИИ ОЧБ»

Петров А.В.

ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: avpetrov@hpb-spb.com

В течение последних 6 лет в ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России разработана технологическая платформа по созданию штаммов-продуцентов рекомбинантных белков для медицинского применения на основе клеток млекопитающих. Платформа включает в себя экспрессионные плазмиды, обеспечивающие высокую интенсивность и стабильность экспрессии белков, а также линии клеток СНО, адаптированные к суспензионному культивированию в бессывороточной среде с химически определенным составом. С использованием данной платформы созданы штаммы-продуценты рекомбинантных гликопротеинов, в том числе терапевтических антител, на основе которых разрабатываются технологии получения активных субстанций оригинальных и воспроизведенных биофармацевтических препаратов.

В ходе доклада на круглом столе будет проведена демонстрация примеров использования разработанной технологической платформы, а также обсуждение технических и организационных проблем при разработке технологии производства, проведении доклинических и клинических испытаний биопрепаратов в России, проведении переговоров с представителями отечественного бизнеса.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БИОИНФОРМАТИКИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПЕРИНАТАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ

Пиянзин А.И.

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

e-mail: bio7777777@mail.ru

Перинатальное поражение центральной нервной системы характеризуется высокой распространенностью и разнообразием последствий, приводит в ряде случаев к инвалидности. Важным моментом в профилактике данной патологии является установление причин развития различных клинических форм перинатального поражения центральной нервной системы. Биоинформатика изучает патологические процессы методами и средствами математики и информатики, областью исследований могут быть интеллектуальные системы анализа и прогнозирования различных заболеваний. **Пациенты и методы.** Беременные женщины, новорожденные с перинатальным поражением центральной нервной системы (возраст детей 4-7 день после рождения). Методы математической статистики, математического программирования и искусственные нейронные сети (основа — Back Propagation). **Полученные результаты.** Классическими статистическими методами определяли значимые симптомы неблагоприятного течения беременности, родов и состояния ребенка сразу после родов, оказывающие существенное влияние на постановку диагноза перинатального поражения центральной нервной системы у детей. Основными причинами риска рождения детей в зависимости от клинической формы перинатального поражения центральной нервной системы были: респираторно-вирусная инфекция — от 14,3% до 21,1% ($p < 0,01$), угроза прерывания беременности — от 42,9% до 49,5% ($p < 0,01$). Дополнительные факторы: гестоз, отслойка плаценты, слабость родовой деятельности, затрудненное выведение плечиков, обвитие пуповиной, первые роды, выпадение ручки, короткая пуповина, поперечное положение плода и аномалия предлежания плаценты. Прогнозирование рождения детей с перинатальным поражением центральной нервной системы показало, что классические статистические методы не имеют оптимального соотношения чувствительности и специфичности. Для улучшения диагностики и прогнозирования использовались искусственные нейронные сети. Проводилось построение разных по архитектуре искусственных нейронных сетей с различным числом нейронов в скрытом и выходном слоях. Обучение и тестирование нейронной сети основывалось на информации, которая содержала статистически значимые симптомы. Анализ обучения и тестирования сетей показал, что обученные на статистически значимых различиях симптомов они обладают большей безошибочностью. Отношение чувствительности и специфичности является близким к оптимальному соотношению. Безошибочность тестирования нейронной сети в зависимости от клинической формы перинатального поражения центральной нервной системы составляла 74-93%. Созданная программа диагностики различных клинических форм перинатального поражения центральной нервной системы помещена на сайте кафедры педиатрии с курсом ФПК и ППС Алтайского государственного медицинского университета. **Заключение.** На основе искусственных нейронных сетей разработана система обработки информации и принятия решения для диагностики перинатального поражения центральной нервной системы у детей, которая позволяет в режиме реального времени оценить различные клинические формы перинатального поражения центральной нервной системы.

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ НА МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ИМПЛАНТАТАХ

Плехова Н.Г.^{1*}, Ляпун И.Н.², Гнеденков С.В.³, Синебрюхов С.Л.³, Пузь А.В.³

1 ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, Россия

2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», Владивосток, Россия

3 ФГБНУ «Институт химии» ДВО РАН, Владивосток, Россия

*e-mail: pl_nat@hotmail.com

Процесс ремоделирования костной ткани на металлических имплантатах происходит при сбалансированной кооперации остеобластов и остеокластов, деятельность которых контролируется с помощью молекулярных факторов, в том числе продуцируемыми клетками иммунной системы. Антигенпредставляющие дендритные клетки (ДК) при формировании воспалительного очага в месте внедрения имплантата индуцируют процесс дифференцировки и выживаемости остеокластов, оказывая опосредованное влияние на деградацию костной ткани (Wythe et al., 2014). Топография поверхности и химический состав материала, из которого изготовлен имплантат, играют важную роль в инициации про- или противовоспалительного иммунного ответа, контролируемого ДК.

Цель исследования — при контакте с новыми антикоррозионными остеогенерирующими покрытиями, нанесенными на титан марки ВТ1-0, изучить экспрессию рецепторов на плазматической мембране, морфологию и функциональную активность ДК.

Для исследования использовали пластины титана ВТ1-0 без покрытия (Ti), с биоактивным кальций-фосфатным покрытием, сформированным с помощью плазменного электролитического оксидирования (ПЭО Ti), и с покрытием, включающем гидроксипатит (ГА ПЭО Ti). С помощью сканирующей электронной микроскопии обнаружено, что процесс созревания ДК, адгезированных к покрытиям происходил быстрее, чем при их контакте титаном. Клетки, адгезированные на Ti, были небольшого размера, округлые с плоской поверхностью и малочисленными псевдоподиями (3-е сут. инкубации). Тогда как ДК на покрытиях титана были большими, со складчатой поверхностью и имели многочисленные микроворсинки и разветвленные псевдоподии. Результаты исследования иммуномодулирующих свойств образцов показали, что при адгезии на покрытия в популяции гемопоэтических клеток обнаруживается повышение экспрессии рецептора адгезии CD34, рецептора активационного антигена CD38, тогда как количество лейкоцитарного маркера CD14 снижалось при повышении маркеров дифференцировки ДК CD80/CD86. Достоверное различие между показателями для интактных клеток и после контакта с образцами было обнаружено в отношении продукции цитокинов ДК ФНО α и регулятора активации экспрессии и секреции RANTES. Причем наибольшее количество цитокинов продуцировалось клетками при контакте с титаном Ti 1, а наименьшее — при контакте с кальций-фосфатным покрытием Ti 2. Подобная зависимость была установлена и в отношении продукции клетками противовоспалительных цитокинов: интерлейкинов 6, 10 и 12. Таким образом, вышеизложенные результаты демонстрируют, что процесс созревания и морфофункциональное состояние ДК зависит от химических свойств испытываемых покрытий на титане, что подтверждает возможность их использования в качестве модели для исследования биосовместимости металлических имплантатов и новых покрытий на них.

ПОИСК МИШЕНЕЙ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ СТРЕСС-ЗАВИСИМОЙ ФОРМЫ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ НА МОДЕЛИ КРЫС НИСАГ

Редина О.Е.^{1*}, Абрамова Т.О.¹, Рязанова М.А.¹, Антонов Е.В.¹, Смоленская С.Э.¹, Ефимов В.М.^{1,2}, Маркель А.Л.^{1,2}

1 Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: oredina@ngs.ru

Артериальная гипертензия (АГ) является комплексным заболеванием. К настоящему времени известно множество генов, которые могут давать вклад в развитие заболевания. Однако, несмотря на прогресс в этой области знаний, выявление генов-мишеней для лекарственной терапии остается нетривиальной задачей.

Целью настоящей работы было выявление генов-мишеней, которые потенциально могут быть использованы для лекарственной терапии стресс-зависимой формы АГ. Предполагалось, что в список генов-мишеней могут быть отнесены гены, ассоциированные с АГ и оказывающие значительное влияние на различия в проявлении контролируемого ими признака у гипертензивных крыс по сравнению с контрольными в разные периоды развития заболевания. Кроме того, потенциальные гены-мишени должны оказывать сходное действие на проявление фенотипа на разных моделях АГ и у животных разных видов.

Работу проводили на крысах линии НИСАГ с наследуемой индуцируемой стрессом АГ. Повышенный уровень артериального давления (АД) у крыс данной линии устанавливается к возрасту 2-х месяцев. Сравнительное исследование уровня экспрессии генов у крыс гипертензивной линии НИСАГ и контрольной нормотензивной линии WAG проводили в возрасте 1, 3 и 6 мес. Анализировали ствол мозга, гипоталамус, надпочечник, корковое и мозговое вещество почки. Анализ транскриптомов этих органов у животных в возрасте 1 и 3 мес. проводили методом RNA-Seq, транскриптомы органов 6-месячных крыс анализировали с помощью микрочипов для анализа 22228 генов (Illumina RatRef-12 Expression BeadChip, USA). Гены, дающие максимальный вклад в межлинейные различия, определялись с помощью построения дискриминатных осей в многомерном пространстве методом PLS-DA (partial-least squares discriminant analysis) так, чтобы расстояние между крысами двух линий оказалось максимальным, с последующим корреляционным анализом полученных дискриминатных осей с уровнем экспрессии каждого гена. Результаты работы показали, что в большинстве проанализированных органов крыс всех трех возрастов среди генов, дающих максимальный вклад в межлинейные различия, присутствует ген *Ephx2* (epoxide hydrolase 2), кодирующий растворимую эпоксидгидролазу (sEH), известную как ключевой фермент в катаболизме эпоксиэйкозатриеновых кислот (EETs). Одной из наиболее важных функций EETs является контроль сосудистого тонуса. Воздействие ингибиторов sEH у мышей и крыс понижает уровень АД и предотвращает повреждающее воздействие высокого АД на почки, сердце и сосуды. Предполагается, что sEH может быть перспективной мишенью для фармацевтического воздействия при лечении гипертензии.

Известно, что снижение кровотока в мозговом веществе почек может оказывать значительный эффект на формирование почечной дисфункции и развитие АГ. Измерение концентрации sEH, проведенное методом иммуноферментного анализа с помощью Rat Epoxide hydrolase 2 ELISA Kit (MyBioSource, США) в мозговом веществе

почки, показало, что концентрация белка sEH у крыс НИСАГ достоверно выше, чем у контрольных крыс WAG, что может являться важным звеном в механизме развития стресс-зависимой АГ и позволяет определить sEH как потенциально перспективную мишень для лечения стресс-зависимой формы АГ человека.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 14-15-00118).

ПРОБЛЕМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Рубцов Н.Б.

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Использование стволовых клеток как в исследованиях, посвященных решению фундаментальных проблем биологии, так и при разработке новых методов регенеративной медицины предполагает проведение их детального описания. Основными проблемами, с которыми сталкивается исследователь в настоящее время, являются огромное генетическое разнообразие исходного материала, нестабильность генома стволовых клеток при культивировании *in vitro* и эпигенетические вариации, определяющие разнообразие индивидуальных стволовых клеток, культур и длительно культивируемых линий. В результате масштабных исследований с использованием технологий полногеномного секвенирования и других методов изучения генетического разнообразия у человека описаны миллионы SNP, тысячи примеров CNV, огромное число хромосомных перестроек. В ряде случаев выявлена их роль в формировании различных патологий или предрасположенности к некоторым заболеваниям, однако в большинстве случаев они, вероятно, остаются в разделе полиморфизма неизвестного значения. В эти исследования вовлечены сотни тысяч людей, миллионы SNP, но предсказание многих признаков фенотипа человека по результатам секвенирования его генома до сих пор уступают прогнозам, основанным на показателях этих признаков у его родителей. Возможно, что значение комбинаторики SNP намного перекрывает влияние отдельных вариантов, и даже современные возможности биоинформационного анализа оказываются далеки от того, что позволило бы просчитать значение различных комбинаций. Поэтому, в настоящее время, даже полное и качественное секвенирование генома линии или культуры стволовых клеток, предоставив в распоряжение исследователя огромный массив данных, принесет относительно немного полезной информации. Положение осложняется высокой изменчивостью генома клеток при культивировании *in vitro*. Вопрос о стабильности кариотипа стволовых клеток в культуре, к сожалению, остается открытым. Еще более лабильным представляется эпигенетический статус различных участков генома человека. Вероятно, наиболее важным на данном этапе развития биологии стволовых клеток является выявление наиболее элементов генома, изменения которых, вызванные либо структурными перестройками, либо эпигенетическими модификациями, может решающим образом повлиять на дальнейшую судьбу стволовых клеток, их способность поддерживать плюрипотентное состояние, пролиферацию и дифференцировку, определяющую формирование различных типов тканей.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ЛЕГКОГО: ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДНК-МАРКЕРЫ В ФОРМАТЕ «ЖИДКОЙ БИОПСИИ»

Гайнетдинов И.В.¹, Капицкая К.Ю.¹, Рыкова Е.Ю.^{2,3*}, Пономарева А.А.^{4,5}, Чердынцева Н.В.^{4,6}, Власов В.В.², Лактионов П.П.^{2,7}, Ажикина Т.Л.¹

1 ИБХ РАН, Москва, Россия

2 ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия

3 НГТУ, Новосибирск, Россия

4 Томский НИИ онкологии, Томск, Россия

5 ТПУ, Томск, Россия

6 ТГУ, Томск, Россия

7 НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

e-mail: rykova.elena.2014@gmail.com

Выявление эпигенетических ДНК-маркеров, циркулирующих в крови (цирДНК), может привести к значительному прогрессу в диагностике, прогнозировании и определении эффективности терапии рака. Для оценки статуса метилирования целевых генов в составе цирДНК в настоящей работе использован подход, основанный на селекции гиперметилированных фрагментов цирДНК при помощи ДНК-метил-связывающего белка (Methylated CpG Island Recovery Assay, MIRA). В работе определена значимость для диагностики рака легкого (РЛ) уровня метилирования LINE-1 ретротранспозонов в составе цирДНК крови методом MIRA с последующей ПЦР.

ЦирДНК получали из крови здоровых доноров (n=47) и больных не-мелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) (n=59), со стадией опухолевого процесса T1-3N0-3M0, до лечения. Кровь разделяли на плазму и клетки, фракцию, связанную с клеточной поверхностью (скп-цирДНК) получали последовательной обработкой клеток фосфатным буфером, содержащим 5мМ ЭДТА, и 0,125% раствором трипсина. Для проведения глубокого секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2000 проводили ПЦР-амплификацию целевых фрагментов скп-цирДНК. Продукты амплификации использовали для создания библиотеки при помощи NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina (NEB).

Секвенирование CpG-содержащих фрагментов 5'-UTR LINE-1 семейства ретротранспозонов показало присутствие в составе скп-цирДНК всех подсемейств (L1Ns, L1PA2-4). Соотношение L1 подсемейств у больных раком легкого (n=3) не отличалось от здоровых доноров (n=3) в составе скп-цирДНК до обогащения методом MIRA. После проведения MIRA у здоровых доноров повысилось содержание L1Ns фрагментов в составе метилированной фракции скп-цирДНК на 4-12%, тогда как у больных раком легкого понизилось содержание фрагментов этого подсемейства на 1-8%. Таким образом, при раке легкого в цирДНК происходит значимое снижение уровня метилирования только для подсемейства L1Ns, для но не для подсемейств L1PA 2, 3, 4. Для верификации данных определяли индекс метилирования фрагментов L1Ns методом ПЦР в режиме реального времени после MIRA-обогащения в скп-цирДНК крови больных РЛ (n=59) и здоровых доноров (n=47). Выявлено статистически значимое снижение уровня метилирования фрагментов L1Ns подсемейства в скп-цирДНК крови у больных раком легкого по сравнению со здоровыми донорами (критерий Манна-Уитни, p=.0012). Для оценки диагностической значимости построена ROC-кривая (AUC = 0.69), которая показывает перспективность анализа L1Ns метилирования в цирДНК как маркера РЛ.

Полученные результаты подтверждают наши данные о том, что фракция скп-цирДНК является высокоинформативным источником материала для диагностики онкологических заболеваний с использованием метода MIRA-обогащения.

Работа поддержана грантом № 2014-208 по программе II.1П фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ДНК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ: ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И АССОЦИАЦИЯ С СЕРОЛОГИЧЕСКИМИ МАРКЕРАМИ

Рыкова Е.Ю.^{1,2*}, Сизиков А.Э.³, Антоненко О.В.⁴, Морозкин Е.С.^{1,5}, Власов В.В.¹,
Лактионов П.П.^{1,5}, Козлов В.А.³

1 ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия

2 НГТУ, Новосибирск, Россия

3 НИИФКИ, Новосибирск, Россия

4 ИМКБ СО РАН, Новосибирск, Россия

5 НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

*e-mail: rykova.elena.2014@gmail.com

На ранней стадии клинические признаки ревматоидного артрита (РА) неспецифичны, также как используемый в клинической практике серологический анализ ревматоидного фактора (РФ) — антител против Fc-фрагментов IgG. Наиболее специфичным (до 95%) серологическим фактором для РА являются антитела к цитруллиновому пептидному антигену (АСРА), однако этот маркер выявляется только у 80% больных. Для оценки диагностической значимости потенциальных маркеров РА проведен анализ концентрации циркулирующей геномной ДНК (цирДНК), митохондриальной ДНК (цир-мтДНК) в сопоставлении с уровнем АСРА антител, С-реактивного белка (СРБ) и РФ в крови 63 здоровых лиц и 74 пациентов с диагнозом РА (критерии АСР, 1987 г). Концентрацию цирДНК плазмы и ДНК, связанных с поверхностью клеток крови (скп-ДНК), определяли методом количественной ПЦР, специфичной к фрагментам LINE-1 геномной ДНК и фрагменту митохондриальной ДНК. Определение титра РФ проводилось методом латекс агглютинации («Ольвекс Диагностикум», г. Санкт-Петербург), концентрацию С-реактивного белка и РФ определяли с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (Вектор-Бест, Новосибирск), уровень АСРА антител с помощью тест-системы (Medizym anti-CCP Ref test, Medipan GmbH, Berlin, Germany). У больных РА выявлено достоверное увеличение концентрации цирДНК плазмы крови по сравнению со здоровыми лицами (12.0 и 8.4 нг/мл, соответственно, $p < 0.01$), концентрация скп-ДНК в группе РА снижена (24 и 51 нг/мл, соответственно, $p < 0.01$). Уровень мтДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-мтДНК) у больных РА оказался достоверно выше, чем у здоровых людей (1.44×10^6 копий/мл и 0.58×10^6 копий/мл, соответственно, $p < 0.05$), уровень цир-мтДНК в плазме не различался. По данным теста ANOVA наиболее значимы для дискриминации больных РА и здоровых людей являются АСРА и скп-мтДНК, диагностическую значимость также имеют РФ, СРБ и скп-ДНК. Наибольшей диагностической точностью характеризуется тест на основе детекции трех серологических маркеров [скп-мтДНК+АСРА+скп-ДНК], который позволяет дифференцировать больных РА и здоровых доноров с 97% чувствительностью и 98% специфичностью. Панель из этих трех маркеров показала большую эффективность по сравнению с одним тестом на АСРА (84% чувствительность и 89% специфичность) и по сравнению с комбинацией трех стандартных серологических маркеров РА [АСРА+РФ+СРБ] (90% чувствительность и 94% специфичность). Полученные данные говорят о перспективности анализа циркулирующей геномной и митохондриальной ДНК крови как дополнительных факторов, применимых для диагностики и, возможно, принимающих участие в патогенезе ревматоидного артрита.

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Тикунова Н.В.^{1*}, Матвеев А.Л.¹, Байков И.К.¹, Бондаренко Д.А.², Хлусевич Я.А.¹, Стронин О.В.³, Мурашев А.Н.²

1 ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

2 ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Филиал), Пушкино, Россия

3 Филиал ФГПУ НПО «Микроген» МЗ РФ НПО «Вирион», Томск, Россия

*e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Проведено доклиническое исследование лекарственного средства на основе протективного химерного антитела против вируса клещевого энцефалита. Получена стабильная суспензионная линия клеток СНО, продуцирующих это антитело. Разработаны лабораторный регламент получения лекарственного средства на основе сконструированного антитела и соответствующая фармакопейная статья. В экспериментах *in vivo* показано, что разработанное лекарственное средство эффективно осуществляет экстренную профилактику клещевого энцефалита у зараженных лабораторных мышей, а также обладает протективными и терапевтическими свойствами. Определены основные системные фармакокинетические параметры при внутривенном и внутримышечном введении этого лекарственного средства лабораторным животным. Изучение иммунотоксических свойств лекарственного средства показало, что препарат не вызывает изменений иммунитета, выявляемых по уровню титра антител у экспериментальных животных и по влиянию на лимфоидные органы. Введение этого лекарственного средства в различных концентрациях не сопровождалось изменениями индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа в экспериментальных группах в сравнении с контрольной, не сопровождалось изменениями фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и не вызывало кожной анафилаксии у морских свинок. Следовательно, можно полагать, что разработанное лекарственное средство обладает иммунологической безопасностью. Проведено исследование острой токсичности лекарственного средства при внутримышечном и внутривенном введении на лабораторных мышах и показано, что тестируемое лекарственное средство при всех типах введения было безопасным в диапазоне изучаемых доз, превысивших более чем в 100 раз предполагаемую дозировку для человека. Проведено исследование хронической токсичности при внутримышечном и внутривенном введении на лабораторных крысах. При этом было также показано, что тестируемое лекарственное средство при всех типах введения было безопасным в диапазоне изучаемых доз. В экспериментах *in vivo* показано отсутствие антитело-зависимого усиления инфекции (ADE) при введении суб-нейтрализующих доз разработанного лекарственного средства. На основании полученных результатов можно заключить, что лекарственное средство, обладая высокой противовирусной активностью *in vivo* в отношении вируса клещевого энцефалита, не оказывает токсического эффекта, является безопасным и может быть рекомендовано для клинических испытаний.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДАПТИРОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ, СОЗДАНИЯ НОВЫХ ИММУНОСОРБЕНТОВ И ИММУНОТЕРАПИИ

Тиллиб С.В.

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

e-mail: tillib@genebiology.ru

Однодоменные антитела («наноантитела», «nanobodies») — в нашем случае это рекомбинантные производные однодоменных антиген-узнающих переменных фрагментов особых антител, состоящих лишь из гомодимера укороченных тяжелых цепей и присутствующих (в дополнение к традиционным антителам) в норме у представителей семейства Верблюдовых и у некоторых видов хрящевых рыб. Наноантитела являются перспективным новым инструментом иммунобиотехнологии. Важной стадией работы по их получению и использованию является способ генно-инженерной модификации («форматирования») первично отбираемых высокоспецифичных однодоменных антител с целью их адаптации и оптимизации для решения конкретных исследовательских и прикладных задач. Недавним разработкам нашей лаборатории в этом направлении уделено основное внимание в данном сообщении. Будут рассмотрены:

- 1) способы параллельной тримеризации и гетеродимеризации наноантител;
- 2) использование адаптированных ориентировано иммобилизованных наноантител в качестве лигандов для создания новых иммуносорбентов, позволяющих эффективно извлекать определенные антигены из сложных протеомных смесей, таких как плазма крови человека;
- 3) экспрессионная конъюгация наноантител, узнающих эндогенные белки и структуры, с флуоресцентными белками для проведения исследований *in vivo*, в том числе путем слежения за антигеном в живой клетке.

В докладе будут приведены примеры использования полученных производных однодоменных антител для борьбы с различными инфекциями и злокачественными новообразованиями.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАКТАПТИНА В КОМБИНАЦИИ С ИНДУКТОРАМИ И ИНГИБИТОРАМИ АУТОФАГИИ

Ткаченко А.В.^{1*}, Троицкая О.С.^{1,2}, Юнусова А.Ю.¹, Рихтер В.А.¹, Коваль О.А.^{1,2}

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: tkachenko_a_v@bk.ru

Лактаптин, продукт частичного протеолиза к-казеина молока человека, вызывает апоптотическую гибель раковых клеток в культуре. Показано, что рекомбинантный аналог лактаптина (RL2) индуцирует гибель различных опухолевых клеток человека и мыши *in vitro*, при этом не влияет на жизнеспособность немалигнизированных клеток MSC. Было обнаружено, что помимо апоптоза RL2 активирует процессинг белка LC3-I до LC3-II, что характерно для аутофагии. Также методом электронной микроскопии мы обнаружили формирование аутофагосом в клетках, обработанных RL2.

Известно, что в норме аутофагия обеспечивает выживание клеток в неблагоприятных условиях, в том числе выживание раковых клеток в условиях кислородного голодания. В то же время избыточная аутофагия может вызывать клеточную гибель. Таким образом, было важно выяснить какой тип аутофагии активируется в клетках в присутствии RL2. Для этого были использованы специфические и неспецифические индукторы и ингибиторы аутофагии: спермидин — индуктор макроаутофагии, индуктор рапамицин — ингибитор mTOR сигнального пути, 3-метиладенин (ЗМА) — ингибитор фосфоиназитол-3-киназ (PI3K) I-го и III-го класса, хлорокин (CQ), повышающий pH лизосом и ингибирующий слияние аутофагосом с лизосомами, Ku55933 — ингибитор АТМ киназы. Эффективное подавление RL2-индуцированной аутофагии ингибитором CQ подтверждено методом электронной микроскопии: в присутствии RL2 и CQ в 2 раза возрастает количество аутофагосом без реализации катаболических процессов. Обнаружено, что спермидин и ЗМА не влияют на цитотоксичность RL2 *in vitro*, а CQ и Ku55933 усиливают цитотоксическое действие RL2 *in vitro*. Таким образом, RL2 стимулирует аутофагию, способствующую выживанию раковых клеток, а ее ингибирование усиливает цитотоксическое действие RL2 *in vitro*. Методом Вестерн-блота мы исследовали изменение характерных молекулярных маркеров аутофагии под действием RL2 в комбинации с индукторами и ингибиторами аутофагии. Показано, что RL2 снижает уровень p62, а комбинация RL2 с ингибиторами аутофагии (ЗМА, CQ, Ku55933) повышает уровень p62, что говорит о том, что RL2 индуцирует аутофагию, а комбинация RL2 с ингибиторами подавляет аутофагию. Показано, что RL2 индуцирует процессинг LC3-I и повышает уровень ATG5, что также свидетельствует об индукции аутофагии. Комбинация RL2 и рапамицина приводит к снижению уровня белка ATG5 в обработанных клетках, что также свидетельствует об ингибировании аутофагии. В экспериментах *in vivo* на мышах с лимфосаркомой RLS показано, что при внутривенных инъекциях RL2 (12 мг/кг) в комбинации с CQ (50 мг/кг) противоопухолевый эффект усиливается. Торможение роста опухоли составило для RL2 24.9%, для CQ — 78.4%, для RL2 в комбинации с CQ — 86.5%. Показано, что в группе мышей, получавших инъекции RL2 в комбинации с CQ, выживаемость составила 100% по сравнению с 22.2% выживаемостью в контроле.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-01232.

ПЕРСониФИЦИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА: АЛЬВЕОЛЯРНЫЕ МАКРОФАГИ ИЗ ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗАРАЖЕННОСТИ МИКОБАКТЕРИЯМИ КЛЕТОК-ХОЗЯЕВ

Уфимцева Е.Г.^{1*}, Еремеева Н.И.², Кравченко М.А.², Скорняков С.Н.²

1 ФГБНУ НИИ биохимии, Новосибирск, Россия

2 ФГБУ УНИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Екатеринбург, Россия

*e-mail: ufim1@ngs.ru

Mycobacterium tuberculosis — один из самых успешных патогенов человека: около 2 миллиардов населения нашей планеты инфицированы, в мире регистрируется примерно 50 миллионов больных активной формой туберкулеза, каждый год к ним добавляется примерно 8-10 миллионов вновь заболевших, почти 2 миллиона человек ежегодно умирают от туберкулеза и его осложнений. Распространение лекарственно-устойчивого туберкулеза к препаратам первого и второго ряда в настоящее время приняло характер мировой пандемии. Несмотря на важность контроля количества и состояния микобактерий в альвеолярных макрофагах больных с различными формами остро прогрессирующего легочного туберкулеза, немного известно об их содержании и функциональном статусе в клетках человека-носителя инфекции. Для решения этого вопроса нами впервые в мире была разработана методика получения *ex vivo* культуры альвеолярных макрофагов из операционного материала больных разными формами туберкулеза легких (решение Федеральной службы по интеллектуальной собственности России о выдаче патента от 12 мая 2016 г.). Разработанный нами анализ позволяет в течение первых суток с момента выделения клеток оценить степень зараженности *M. tuberculosis* альвеолярных макрофагов применительно к конкретному пациенту и определить вирулентность самого патогена как возбудителя заболевания на данный момент лечения прооперированного больного. Оценка вирулентности микобактерий в клетках больных туберкулезом легких имеет большое значение как для корректировки схем лечения с целью повышения его эффективности, так и для контроля за эпидемиологически опасными формами туберкулезного заболевания, в том числе для составления индивидуального прогноза течения и исхода туберкулезного процесса у определенного пациента. В целом, разработанный нами анализ может быть использован как один из составляющих в принятии решений по проведению и корректировке дальнейших профилактических и лечебных мероприятий, направленных на излечение больных туберкулезом легких.

АНАЛИЗИРОВАТЬ НЕЛЬЗЯ ИГНОРИРОВАТЬ: СЕКВЕНИРОВАНИЕ ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКИ

Фадеева Н.П.

ООО «Компания Хеликон»

e-mail: n.fadeeva@helicon.ru

На сегодняшний день микрофлюидика считается золотым стандартом в области изолирования и выделения нуклеиновых кислот единичных клеток, позволяя при минимуме ручных манипуляций получить максимальное количество концентрированного генетического материала из каждой отдельной клетки. Чипы на основе технологии микрофлюидики гарантируют высокую пропускную способность, низкие реакционные объемы, воспроизводимость результатов от клетке к клетке и от эксперимента к эксперименту и позволяют работать с широким диапазоном методов и подходов к секвенированию единичных клеток.

НЕГИБРИДОМНЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Филатов А.В.

«ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

e-mail: avfilat@yandex.ru

В 1975 году Келером и Мильштейном была разработана гибридная технология получения моноклональных антител. Успехи современной иммунологии и иммунотерапии в значительной степени связаны с этим открытием. Однако гибридная технология имеет ряд недостатков. Во-первых, имеются значительные сложности с получением человеческих антител. Во-вторых, частота образования гибридом довольно мала, и лишь небольшая доля иммунных лимфоцитов дает начало антитело продуцирующим клонам. При поиске редких клонов это приобретает решающее значение. В значительной степени эти недостатки были преодолены с помощью технологии фагового дисплея. Однако антитела, полученные этим методом, являются результатом случайной комбинаторики легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов. Антитела, полученные методом фагового дисплея, не всегда отражают естественный иммунный ответ человека. Особенно явно это проявляется при использовании синтетических и полусинтетических библиотек. Возможно, что именно по этой причине такие антитела при использовании в качестве иммунотерапевтических препаратов в некоторых случаях характеризуются высоким анти-антительным ответом. Последние годы ознаменовались появлением альтернативных методов получения моноклональных антител. В первую очередь, это связано с развитием методов секвенирования генов *Ig* напрямую из иммунных лимфоцитов. К таким методам относятся амплификация и секвенирование из одиночных В-клеток, секвенирование следующего поколения (NGS) из пула иммунных лимфоцитов, а также комбинация этих методов. Некоторые неоднозначности в определении генетической последовательности компенсируются дополнительным привлечением протеомики молекул иммуноглобулинов. С помощью этих методов уже получены несколько моноклональных антител, имеющих хороший иммунотерапевтический потенциал. В первую очередь к ним можно отнести широко нейтрализующие антитела против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и вируса гриппа. Разнообразные ухищрения в получении моноклональных антител являются следствием того, что долгое время не удавалось добиться устойчивого роста иммунных В-лимфоцитов *in vitro*. Есть все основания полагать, что эта проблема, наконец, решена. Был подобран коктейль лимфокинов, созданы трансгенные CD40L+ линии фидерных клеток, а также определены анти-апоптотические гены, обеспечивающие рост В-лимфоцитов. Все это позволило создать технологию культивирования иммунных В-лимфоцитов *in vitro* и получения моноклональных антител напрямую из В-лимфоцитов крови человека. Можно надеяться, что новые негибридные методы получения моноклональных антител позволят значительно расширить репертуар доступных иммунотерапевтических препаратов.

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИМПЛАНТАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИИ АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА В ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНЫЕ ЛАЗЕРНЫЕ КАНАЛЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Чернявский А.М.¹, Фомичев А.В.^{1*}, Чернявский М.А.¹, Повещенко О.В.¹

Федеральное государственное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава РФ, Новосибирск, Россия

*e-mail: a_fomichev@list.ru

Цель: Клинико-функциональная оценка отдаленных результатов применения метода имплантации моноклеарной фракции аутологичного костного мозга (МФАКМ) в лазерные каналы в хирургии ишемической болезни сердца с диффузным и дистальным поражением коронарного русла.

Материалы и методы: За период 2007-2008 гг. в клинике НИИПК 35 больным ИБС с диффузным и дистальным поражением коронарного русла во время операции аортокоронарного шунтирования (АКШ) выполнена процедура имплантации МФАКМ в лазерные каналы. Контрольную группу составили 29 больных. Всем пациентам этой группы выполнена только операция прямой реваскуляризации миокарда. В отдаленном периоде из 35 больных первой группы было обследовано 30. Клинико-функциональная оценка эффекта метода выполнялась через 2 недели, 6 месяцев и 6 лет после операции.

Результаты: Среднее значение ФК (НУНА) в группе не прямой реваскуляризации достоверно уменьшилось с $2,57 \pm 0,61$ до операции до $1,77 \pm 0,66$ через 6 месяцев после операции ($p=0,043$). Через 6 лет ФК (НУНА) достоверно не изменился — $1,84 \pm 0,42$ ($p=0,053$).

По данным перфузионной сцинтиграфии отмечается небольшое уменьшение стабильного дефекта перфузии (СДП) в ближайшем послеоперационном периоде, более выраженное уменьшение СДП через 6 месяцев после операции. Среднее значение СДП до операции составило $20,46 \pm 10,75\%$, через 2 недели после операции — $19,07 \pm 9,69\%$, через 6 месяцев — $15,22 \pm 9,49\%$. В отдаленном периоде (6 лет) СДП — $14,8 \pm 8,43\%$ ($p=0,047$). Сходная динамика отмечается при анализе преходящего дефекта перфузии: исходно — $30 \pm 2,2\%$, через 6 месяцев — $15 \pm 1,3\%$, в отдаленном периоде — $20 \pm 6,1\%$ ($p=0,047$).

Среднее значение фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) до операции составило $55 \pm 10,4\%$, через 2 недели после операции — $55,7 \pm 9,3\%$, через 6 месяцев — $56,7 \pm 10\%$, через 6 лет — $54 \pm 12\%$. Динамика недостоверная ($p=0,068$).

Заключение: Метод имплантации МФАКМ в лазерные каналы является безопасным и эффективным способом хирургического лечения при невозможности выполнить прямую реваскуляризацию миокарда. Эффект не прямой реваскуляризации формируется в первые 6 месяцев после операции и остается на одном уровне на протяжении 6 лет.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда (номер проекта 16-15-00057).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕПАТОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ И ВЗРОСЛОЙ ПЕЧЕНИ *IN VITRO*

Холоденко И.В.^{1*}, Холоденко Р.В.², Лупатов А.Ю.¹, Ярыгин К.Н.¹

1 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва, Россия

2 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва, Россия

*e-mail: irkhol@yandex.ru

Гепатоциты являются основными функциональными и структурными элементами печени. В связи с этим изолированные первичные гепатоциты служат «золотым стандартом» в различных биомедицинских исследованиях и для разработки/скрининга новых лекарственных препаратов. В регенеративной медицине одним из перспективных подходов, который может служить альтернативой трансплантации, считается трансплантация гепатоцитов пациентам с терминальной стадией поражения печени. Однако и скрининг лекарственных препаратов, и клеточная трансплантация требуют продукции большого количества гепатоцитов, которые не способны длительное время пролиферировать в культуре, что делает невозможной их экспансию. Поэтому многие исследователи фокусируются на разработке альтернативных клеточных источников для получения гепатоцитов *in vitro*. В качестве перспективного источника зрелых гепатоцитов рассматривается ткань фетальной печени, а также резидентные прогениторные клетки взрослой печени. В нашей работе стромальные клетки были получены из фетальной печени и из биоптата печени пациента с алкогольным циррозом. Был проведен морфологический и фенотипический анализ обоих типов клеток. Стромальные клетки фетальной печени имели фибробластоподобную морфологию и экспрессировали маркеры мезенхимальных стромальных клеток. Культура клеток, полученная из биоптата пациента с алкогольным циррозом, на ранних пассажах содержала, по меньшей мере, две субпопуляции, одна из которых имела признаки мезенхимальных клеток, другая — признаки эпителиальных клеток. В результате гепатогенной дифференцировки стромальные клетки взрослой и фетальной печени на ранней стадии начинали экспрессировать α -фетопротеин, маркер незрелых гепатоцитов, и на поздней стадии — преальбумин. Помимо этого, клетки секретировали альбумин в культуральную среду. Секреция альбумина стромальными клетками взрослой печени наблюдалась уже по окончании первой стадии дифференцировки, тогда как клетки фетальной печени начинали секретировать альбумин только по окончании второго дифференцировочного этапа. Выделенные из биоптатов стромальные прогениторные клетки печени длительное время пролиферируют в культуре, что дает возможность нарастить большие количества для последующей дифференцировки в гепатоцит-подобные клетки и аутологичной трансплантации.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-15-00648.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ В ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Холоденко Р.В.^{1,2*}, Доронин И.И.¹, Буздин А.А.¹, Холоденко И.В.^{1,3}

1 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва, Россия

2 ООО «Реал Таргет», Москва, Россия

3 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва, Россия

*e-mail: khol@mail.ru

Ганглиозид GD2 является маркером многих опухолей, большая часть которых с трудом поддается лечению. Иммунотерапевтические подходы с использованием моноклональных антител, специфичных к GD2 (анти-GD2 мАт) являются перспективными, но на данный момент существует ряд ограничений, связанных с их использованием. Недавно нами была доказана собственная функциональная роль ганглиозида GD2 в запуске клеточной гибели различных опухолевых клеток, что может стать основой для создания эффективной противоопухолевой терапии, направленной на данный маркер. Для этого необходимо детальное изучение механизмов клеточной гибели GD2-позитивных клеток, индуцированной воздействием на ганглиозид GD2, а также получение рекомбинантных соединений к ганглиозиду GD2 с улучшенными цитотоксическими активностями.

В работе использована панель моноклональных анти-GD2 мАт, продуцируемых гибридами, полученными в нашей группе. С использованием данных гибридов в различных экспрессионных системах были созданы рекомбинантные анти-GD2 мАт, а также их Fab- и scFv-фрагменты. Для созданных рекомбинантных белков были оптимизированы условия экспрессии и стабильности, также для них была оценена специфичность связывания с ганглиозидом GD2 и кроссреактивность с другими ганглиозидами. Ряд GD2-связывающих молекул проявили выраженную цитотоксическую активность в отношении различных опухолевых линий, экспрессирующих данный маркер. С целью определения молекулярных механизмов клеточной гибели, индуцированной воздействием на опухолеассоциированный ганглиозид GD2, был проведен биоинформационный анализ основных внутриклеточных сигнальных путей. Были выявлены наиболее активированные и ингибированные сигнальные пути в опухолевых клетках при воздействии на них GD2-связывающих молекул. Данные результаты раскрывают новые биологические свойства опухолеассоциированных ганглиозидов, которые в дальнейшем могут быть использованы для создания новых и эффективных противоопухолевых препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-01300.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И ТКАНЕЙ

Центалович Ю.П.^{1,2,*}, Снытникова О.А.^{1,2}, Яньшолле В.В.^{1,2}, Яньшолле Л.В.^{1,2}, Хличкина А.А.^{1,2}, Искаков И.А.³

1 ФГБУН Институт «Международный томографический центр» СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

3 ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза», Новосибирск, Россия

*e-mail: yura@tomo.nsc.ru

Любая биологическая ткань содержит тысячи низкомолекулярных соединений — метаболитов, которые являются субстратами, промежуточными или конечными продуктами метаболизма. Метаболомные профили различных тканей существенно отличаются друг от друга; более того, метаболомный состав одной и той же ткани может меняться в зависимости от внешних условий, в частности при старении и при развитии патологий. Таким образом, анализ метаболомного состава может быть применен для диагностики различных заболеваний, а также для понимания молекулярных механизмов патогенеза.

В настоящей работе выполнен количественный метаболомный анализ человеческих тканей, относящихся к органу зрения: крови, водянистой влаги (ВВ), хрусталика, роговицы. Измерения проводились с использованием двух независимых методов: ЯМР-спектроскопии и ВЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Для анализа были использованы образцы тканей здоровых людей, людей с офтальмологическими патологиями (катаракта, кератоконус), а также образцы, полученные *post mortem*. Установлено содержание более 70 метаболитов в этих тканях.

Установлено, что метаболомный состав ВВ во многом близок к составу сыворотки крови. Это свидетельствует о том, что барьер между кровью и ВВ работает как ультрафильтрационная решетка, способная пропускать малые молекулы. Наибольшее различие обнаружено для аскорбата, концентрация которого в ВВ на два порядка выше, чем в крови. Метаболомный состав хрусталика и роговицы заметно отличается от состава ВВ за счет протекающих в этих тканях метаболических процессов. Очень большие отличия обнаружены между метаболомными составами катарактальных человеческих хрусталиков, полученных в результате хирургической операции, и нормальных хрусталиков, полученных *post mortem*. Эти отличия частично отнесены к протекающим *post mortem* биохимическим процессам, а частично — к дегградации эпителиальных клеток хрусталика в результате катарактогенеза.

Работа была поддержана РНФ (Проект 14-14-00056) и РФФИ (Проекты 14-03-00027 и 14-03-00453).

КОМПЬЮТЕРНАЯ ПЛОИДОМЕТРИЯ В ОЦЕНКЕ ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ПРИ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОМ РАКЕ

Черданцева Т.М.^{1*}, Долгатов А.Ю.¹, Бобров И.П.², Климачев В.В.¹

1 Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

2 Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул, Россия

*e-mail: cherdan.morf@yandex.ru

В настоящее время есть основания полагать, что биологическое и клиническое поведение опухоли в значительной степени зависит от интенсивности пролиферации и генетических нарушений, отражением которых может служить несбалансированность содержания ядерной ДНК (анеуплоидия) опухолевых клеток, поэтому **целью работы** являлось исследование значения компьютерной плоидометрии в оценке результатов послеоперационной выживаемости больных при почечно-клеточном раке (ПКР). **Материалы и методы.** Изучен операционный материал 107 больных ПКР. Средний возраст пациентов составил $57,8 \pm 0,9$ лет. Мужчин было 48 (44,9%), женщин — 59 (55,1%). Микроспектрофотометрическое исследование ДНК проводили с использованием системы компьютерного анализа изображений, состоящей из микроскопа Leica DME, цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения ВидеоТест–Морфология 5.2. Плоидометрию ДНК проводили на гистологических срезах, окрашенных по Feulgen. Среднее содержание ДНК в ядрах малых лимфоцитов принимали за диплоидное (2с) и использовали в качестве стандарта. Для получения стандарта в каждом срезе оценивали 25-30 лимфоцитов. В исследуемых опухолевых клетках высчитывали индекс накопления ДНК (ИНДНК) в единицах плоидности (с). Исследование проводили на 25-30 опухолевых клетках в каждом случае. В зависимости от плоидности опухоли оценивали 1,2,3,4 и 5-летнюю послеоперационную выживаемость больных. Статистическую обработку материала проводили при помощи статистического пакета Statistica 6.0. Построение кривых выживаемости проводили по методу Kaplan-Meier, достоверность различий показателей оценивали с помощью log-rank теста. **Результаты.** Среди всех исследованных больных вне зависимости от пола, возраста, варианта ПКР и других факторов, разброс значений ИНДНК колебался от 2,1с до 10,7с. Среднее значение ИНДНК во всей группе составило $4,7 \pm 0,2$ с. Низкий ИНДНК (диплоидные, триплоидные и паратетраплоидные опухоли) был обнаружен в 33 (30,8%) опухолях, а высокий ИНДНК (тетраплоидные и полиплоидные опухоли) в 74 опухолях (76,2%). Для оценки отдаленных результатов послеоперационной выживаемости больных в зависимости от ИНДНК опухоли пациенты были нами разделены на 2 группы: группу 1 составили больные с диплоидными и паратетраплоидными опухолями (< 4с); группу 2 составили больные с тетраплоидными и полиплоидными опухолями (≥ 4 с). В группе 1 через год были живы 100% больных, через два года — 100%, через три года — 98,4%, через четыре года — 98,4% и через пять лет — 98,4%. В группе 2 этот показатель через год был 93,4%, через два года — 91,8%, через три года — 83,6%, через четыре года — 70,5%, через пять лет — 68,9%. При сравнении кривых выживаемости в группах больных с использованием логарифмического рангового критерия выявлено, что различия данных достоверны (log-rank test, $p = 0,00009$). **Выводы.** Таким образом, плоидность опухоли оказалось значимым прогностическим параметром при ПКР. Ухудшение выживаемости больных при возрастании плоидности опухоли связано с глубокими нарушениями в геноме, возникновением полиплоидии и анеуплоидии, что и приводит неблагоприятному прогнозу заболевания.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ НЕЙРООНКОЛОГИИ

Чернов С.В.^{*}, Калиновский А.В., Зотов А.В., Гормольсова Е.В., Касымов А.Р.,
Ужакова Е.К.

ФГБУ «Федеральный Центр Нейрохирургии», Новосибирск, Россия

*e-mail: schernov11@gmail.com

В современной нейроонкологии, как и во всей нейрохирургии, существует множество нерешенных проблем. В первую очередь, это связано с тем, что большинство внутримозговых опухолей (глиом) головного мозга являются высокозлокачественными, не имеют границ с окружающей мозговой тканью и, соответственно, радикальное их хирургическое лечение не возможно. При этом они могут располагаться в функционально значимых зонах (речевых или двигательных), и после их удаления у таких пациентов возникает стойкий и грубый неврологический дефицит, значительно снижающий качество жизни и приводящий к инвалидизации. Таким образом, задачей нейрохирурга в этих случаях является максимально возможное удаление опухоли (циторедукция), верификация гистологического диагноза и сохранение функций. Достичь этого позволяет внедрение операций, проводимых в сознании (awake surgery). Эти операции требуют тщательной подготовки как самого пациента (проведение нейропсихологических тестов, объяснение процедуры), так и всей хирургической команды (анестезиолог, нейропсихолог, невролог, нейрофизиолог), предоперационного планирования, знаний нейроанатомии и нейрофизиологии. Результатом таких нейрохирургических вмешательств является хорошая радикальность и хороший функциональный исход. В Федеральном центре нейрохирургии г. Новосибирска проведено 8 таких операций. Все опухоли располагались в функциональных зонах или в непосредственной близости от них. Картирование коры, интраоперационное нейропсихологическое тестирование позволили найти функциональные зоны головного мозга, сохранить их и удалить опухоль во всех случаях.

При доброкачественных опухолях головного мозга радикальное хирургическое лечение приводит практически к излечению пациентов. Однако локализация таких образований (основание черепа, мосто-мозжечковый угол, желудочки мозга) и их размеры делают такую хирургию весьма проблематичной. Применение различных малоинвазивных доступов с учетом анатомических особенностей пациента, а также совершенствование микрохирургических техник и использование нейрофизиологического мониторинга во время операции позволяют удалять такие опухоли с минимальным неврологическим дефицитом. Оставление части опухоли на критических анатомических структурах, таких как ствол головного мозга, черепно-мозговые нервы, магистральные артерии, при высоком риске их повреждения позволяет в дальнейшем динамически их наблюдать на протяжении многих лет и при наличии признаков продолженного роста применить радиохирургические методы лечения.

Таким образом, приоритетом хирургического лечения нейроонкологической патологии головного мозга является сохранение функций и высокого качества жизни пациента при условии максимально возможного радикального удаления доброкачественных или злокачественных образований.

МАКРОФАГИ КАК КАНДИДАТНЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ «РЕГЕНЕРАТИВНОЙ» ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ ПАТОЛОГИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Черных Е.Р.*, Шевела Е.Я., Останин А.А.

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

*e-mail: ct_lab@mail.ru

Последние годы ознаменовались пересмотром существующих догм относительно репаративного потенциала центральной нервной системы (ЦНС) и роли иммунных клеток в нейрорегенерации. Стало очевидно, что поврежденные ткани в ЦНС системе подвержены функциональному восстановлению, которое опосредуется с вовлечением нейрогенеза, олигодендрогенеза, нейропластичности и ангиогенеза. Кроме того, выяснилось, что иммунологическая привилегированность головного и спинного мозга не является абсолютной и что иммунные клетки причастны не только к нейровоспалению, но и играют важную роль в процессах репарации. Среди различных типов иммунных клеток ведущая роль в индукции и регуляции и нейрорепаративных процессов отводится макрофагам. Будучи функционально гетерогенными макрофаги и клетки микроглии включают как минимум две оппозитные субпопуляции — M1 и M2 клетки. M1 макрофаги проявляют провоспалительные свойства и обладают нейродеструктивным эффектом. M2 клетки характеризуются иммуномодулирующей и противовоспалительной активностью и способны усиливать ангиогенез, нейрогенез и нейропластичность. Участие M2 макрофагов в восстановлении поврежденной нервной ткани подтверждается данными экспериментальных исследований. Также установлено, что M2 клетки во многом опосредуют неврологическое улучшение при трансплантации стволовых клеток. Это позволяет рассматривать использование M2 клеток и/или их продуктов в качестве перспективной технологии стимуляции функционального восстановления при поражениях ЦНС. С целью проверки данной гипотезы нами был разработан оригинальный протокол генерации M2 клеток, в котором индуцирующим фактором M2 поляризации являлся фагоцитоз апоптотических клеток. Генерируемые макрофаги проявляли фенотипические и функциональные свойства M2 клеток и при клинической апробации продемонстрировали безопасность и клиническую эффективность у пациентов с церебральным инсультом и детским церебральным параличом.

СТРУКТУРА АПОПТОЗ-ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА ЛАКТАПИНА И ЕГО ПРОНИКНОВЕНИЕ В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Чинак О.А.^{1*}, Фомин А.С.¹, Юнусова А.Ю.¹, Шернюков А.В.³, Свиридов Е.А.³, Пышная И.А.¹, Нуштаева А.А.¹, Голубицкая Е.А.¹, Коваль О.А.^{1,2}, Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.¹

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

3 Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: chinakolga@gmail.com

Апоптоз-индуцирующие белки являются перспективными молекулами для конструирования противоопухолевых препаратов. Лактаптин — фрагмент к-казеина человека, индуцирующий апоптоз раковых клеток человека в культуре и подавляющий рост опухоли *in vivo*. Было показано, что лактаптин проникает в цитоплазму как раковых, так и нетрансформированных клеток, но молекулярный механизм этого процесса не был изучен. Целью данной работы было исследование структуры пептида лактапина и выявление механизмов его проникновения в клетки человека. Для исследования структуры лактапина были сняты его КД- и ЯМР-спектры, свидетельствующие о том, что в водной среде лактаптин является нестрого упорядоченным пептидом. Сравнение первичной последовательности лактапина с описанными в литературе CPP (Cell-penetrating Peptides) говорит о сходстве их аминокислотного состава. Для исследования путей проникновения лактапина в клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7 были использованы ингибиторы определенных путей эндоцитоза. Для визуализации лактапина в клетках был синтезирован конъюгат лактапина с флуоресцентным красителем (RL2-Rho), и проникновение этого конъюгата в клетки было изучено методом проточной цитофлуорометрии. Обнаружено, что ингибитор динамин-зависимых путей (диназор) не влияет на эффективность проникновения в клетки, а ингибиторы путей эндоцитоза, опосредованных липидными рафтами (нистатин, МβCD), снижают эффективность проникновения в клетки. Таким образом, RL2-Rho частично проникает в клетки по пути динамин-независимого рафт-зависимого пиноцитоза. Далее было показано, что неспецифический блокатор всех путей эндоцитоза (NaN₃) лишь частично (до 56%) подавляет проникновение RL2-Rho в клетки MDA-MB-231. Таким образом, вероятно, существует несколько путей проникновения лактапина в клетки: i) эндоцитоз и ii) прямое проникновение через плазматическую мембрану, характерное для CPP. Для подтверждения гипотезы проникновения лактапина в клетки был синтезирован препарат наночастиц золота, покрытых гомогенным слоем лактапина толщиной 2–7 нм (RL2-Au). Показано, что RL2-Au проникает в клетки MDA-MB-231 главным образом по пути кавеолин-зависимого эндоцитоза и в меньшей степени по пути клатрин-зависимого и клатрин-кавеолин-независимого микропиноцитоза. Также показано, что RL2-Au накапливается в поздних эндосомах и лизосомах, сохраняя свою структуру через 24 часа. Это говорит о том, что в составе RL2-Au лактаптин обладает повышенной стабильностью и устойчивостью к лизосомальным протеазам. В совокупности анализ путей проникновения лактапина в клетку и его структуры позволяет сделать вывод о том, что лактаптин обладает свойствами CPP.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 16-04-01232.

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ БУДУЩЕГО

Чупахин А.П.^{1,2,*}, Хе А.К.^{1,2}, Черевко А.А.^{1,2}, Паршин Д.В.¹, Мальцева С.В.^{1,2}, Кривошапкин А.Л.³, Орлов К.Ю.³, Панарин В.А.³

1 Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

3 Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

*e-mail: alexander190513@gmail.com

Исследование течения крови в головном мозге представляет значительный интерес как с точки зрения фундаментальной науки, так и для медицинских приложений. В докладе дается обзор результатов, полученных совместно в Институте гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН, Новосибирском НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Институте цитологии и генетики СО РАН, Международном томографическом центре СО РАН, Институте теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко.

1. Разработана и внедрена система исследовательского мониторинга кровотока во время нейрохирургических операций. Она включает в себя измерения скорости и давления потока крови в сосудах головного мозга при наличии аномалии типа церебральной аневризмы или артериовенозной мальформации. Разработанный аппарат диаграмм «скорость — давление» позволяет оценивать эффективность внутрисосудистой операции. Результаты мониторинга позволяют снизить риск послеоперационных осложнений и внедрены в рекомендательные протоколы.

2. Выполнено 3D компьютерное моделирование течения крови в различных системах сосудов головного мозга при наличии аномалий типа церебральных аневризм (ЦА), как единичных, так и множественных. Исследована динамика параметров кровотока и прочностных свойств стенок сосудов при проведении нейрохирургической операции для поиска параметров, характеризующих успешность операции. Показано, что в роли такого параметра для системы с множественными ЦА выступает диссипируемая энергия вязкого потока крови в объеме, ограниченном аневризмой. Полученные результаты создают основу для предоперационного математического моделирования.

3. Выполнен комплекс лабораторных экспериментов по исследованию течения вязкой жидкости, моделирующей кровь, в упругой модели бифуркации сосудов. Различные режимы течения жидкости через упругий тройник создаются программируемым насосом CompuFlow (МТЦ СО РАН), визуализация течения и измерения скорости и давления проводились в магнитно-резонансных томографах Philips (1,5 Тл, МТЦ СО РАН) и Bruker (11,7 Тл, ИЦиГ СО РАН) и аппарате Volcano ComboMap (ННИИПК).

4. Разработан и апробирован алгоритм высокоточного построения разветвленной сети сосудов на основе данных магнитно-резонансной томографии. Метод основан на варьировании наклона сканирующей плоскости, апробирован на построении сети сосудов головного мозга лабораторных животных (мыши, крысы) и показал высокую эффективность по сравнению со стандартным. Данные результаты важны для трансляционной медицины.

Выполненные исследования создают базис для персонализированной медицины в такой актуальной области, как нейрохирургия.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ОПТИМАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ РАЦИОНОВ

Шлихт А.Г.

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

e-mail: schliht@mail.ru

Геном-ориентированные исследования нашли свое отражение в алиментарных заболеваниях и соответственно в задачах диетологии. Многие мутации в геноме, как врожденные, так и приобретенные, вызывают нарушение в структуре протеинов и далее соответствующих ферментов и метаболических процессах, ведущих к заболеванию. К таким генетическим заболеваниям относятся, в частности, фенилкетонурия, галактоземия, целиакия. Наилучшим лечением для них является правильная диета. Врожденные и приобретенные генетические мутации исследуют нутригенетика, токсикогенетика и нутригеномика, токсикогеномика соответственно. Решающее значение приобретает наука о питании и, в частности, задачи синтеза рационов. Интеграция геномики, нутригеномики, нутрицеологии, математики, биоинформатики, теории управления позволяет решить сложную задачу управления состоянием живого организма. Для решения этих задач необходимо создать соответствующие базы данных и базы знаний, которые станут основой для систем автоматизированного проектирования оптимальных рационов, сбалансированных по продуктам и нутриентам, на основе методов оптимизации.

В данной работе рассматривается информационная система для анализа и оптимального синтеза рационов с соответствующими ограничениями по продуктам, нутриентам и нормам питания. Конечно, необходимы относительно точные рационы, но точных рационов, в силу неопределенности химического состава продуктов, естественно не может быть, хотя в рамках статистической погрешности они могут быть получены. В мире накоплен большой объем рекомендаций по питанию при алиментарных заболеваниях, имеются многочисленные специализированные продукты, но, к сожалению, они весьма дорогостоящие. Даже при наличии специализированных продуктов довольно сложно (без математических моделей) учесть нормы потребляемых продуктов, исходя из возраста, характера трудовой деятельности, генетического, биохимического и физиологического статуса организма.

Разработанная система анализа и оптимального синтеза рационов предназначена для создания специализированных сбалансированных рационов, учитывающих качественный и количественный состав пищевых продуктов, и позволяет перейти к персонализированному питанию. С точки зрения теории управления, система состоит из прямого канала управления, который соответствует обычному питанию (анализ рациона с ограничениями), и корректирующего контура в цепи обратной связи (оптимального синтеза дополнительного корректирующего рациона). Корректирующий контур обратной связи представляет из себя регулятор, построенный на основе методов оптимального математического программирования (в частности линейного программирования, классическая задача о диете). Интеграция баз данных и знаний по химическому составу продуктов, рецептурам, рационам, нормам и ограничениям с оптимальными математическими моделями и технологией экспертных систем позволяет автоматизировать процесс создания многомерных моделей для проектирования рационов. Система применима и к синтезу рациона здорового человека, но требует высокой культуры и дисциплины питания.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Штокало Д.Н.^{1,2,3*}, Антонец Д.В.^{1,2,4}, Вяткин Ю.В.^{1,2,3}

1 ООО «АкадемДжин», Новосибирск, Россия

2 Институт систем информатики им. А.П. Ершова СО РАН, Новосибирск, Россия

3 St. Laurent Institute, Бостон, США

4 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия

*e-mail: dmitry@nprog.ru

Технологии секвенирования ДНК и РНК нового поколения позволяют получать информацию о деталях функционирования человеческого генома. В настоящий момент далеко не полностью решена проблема получения биологических и медицинских знаний из технических данных секвенирования. Помимо технологических и организационных трудностей стоят проблемы очистки сигнала от шума, эффективного доступа к базам данных, решения математически некорректно поставленных задач. В результате преодоления этих трудностей темпы накопления новых знаний и трансляции их в сферу медицины могут существенно возрасти.

В данном докладе мы приводим обзор собственных результатов по успешной обработке данных секвенирования нового поколения. Представлено частное решение таких задач, как поиск биомаркеров, новых генов, их функциональной аннотации и регулирующих факторов, поиск сайтов редактирования РНК, полиморфизмов ДНК в привязке к заболеваниям, новых миРНК и новой функциональной роли известных миРНК. Многие результаты прошли лабораторную валидацию, опубликованы в журналах NSMB, Genome Biology, NAR и др. Результаты, имеющие коммерческую ценность, используются фармацевтическими компаниями и диагностическими клиниками США и Европы. Система организации проектов позволяет использовать наработанный опыт для работы с различными платформами секвенирования и биолого-медицинскими лабораториями.

ВЫСОКО АТТЕНУИРОВАННЫЙ ВАРИАНТ ШТАММА LIVP ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ С НАПРАВЛЕННО ИНАКТИВИРОВАННЫМИ ШЕСТЬЮ ГЕНАМИ

Щелкунов С.Н.*, Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Максюттов Р.А.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

*e-mail: snshchel@rambler.ru, snshchel@vector.nsc.ru

На основе штамма LIVP вируса осповакцины (ВОВ), используемого для вакцинации людей, создан рекомбинантный вариант 1421ABJCN с нарушением пяти генов вирулентности, кодирующих гемагглютинин (*A56R*), гамма-интерферонсвязывающий белок (*B8R*), тимидинкиназу (*J2R*), комплементсвязывающий белок (*C3L*) и Bcl2-подобный ингибитор апоптоза (*NIL*). Показано, что инактивация выбранных генов вирулентности не влияет на репродуктивные свойства ВОВ на культурах клеток млекопитающих. Штамм 1421ABJCN характеризуется значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным LIVP. При интрацеребральном введении продукция вируса 1421ABJCN в головном мозгу новорожденных мышей снижена на три порядка по сравнению с родительским ВОВ LIVP.

Методами генетической инженерии на основе ранее полученного штамма аттенуированного ВОВ 1421ABJCN создан штамм VACVΔ6 ВОВ с направленно делетированным геном *A35R*, продукт которого ингибирует презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II. Штамм VACVΔ6 сохранил репродуктивные свойства на культурах клеток млекопитающих. Подкожная иммунизация мышей этим рекомбинантным вирусом в дозе 10^7 БОЕ/мышь индуцировала значительно больший уровень вируснейтрализующих антител по сравнению с родительским штаммом LIVP. VACVΔ6 обеспечивал 100% защиту вакцинированных животных против вируса экстремелии в дозе 100 LD₅₀, в то время как штамм 1421ABJCN защищал только 50% животных, а вакцинный штамм LIVP — 67% мышей.

Созданный рекомбинантный вариант ВОВ VACVΔ6 может явиться эффективной аттенуированной вакциной четвертого поколения против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций, а также может использоваться в качестве молекулярного вектора для виротерапии злокачественных опухолей.

ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОДИТЕЛЯ РИТМА СЕРДЦА

Якубов А.А.^{1*}, Лосик Д.В.¹, Медведев С.П.^{1,2}, Байрамова С.А.¹, Стрельников А.Г.¹, Романов А.Б.¹, Дементьева Е.В.^{1,2}, Покушалов Е.А.¹

1 ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

2 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: dr.yakubov@me.com

Для оптимизации электрокардиостимуляционной терапии в настоящее время активно изучаются возможности восстановления функций проводящей системы, используя биологические материалы, которые могли бы обеспечивать стабильный физиологичный ритм в течение всей жизни, без потребности в замене при отсутствии проаритмогенных эффектов. Данная технология осуществляется благодаря возможностям генной и клеточной терапии. Биологические пейсмекеры подразумевают пожизненную кардиостимуляцию, адекватный ответ на автономную нервную систему и адаптацию к росту организма.

Для поиска новых подходов к терапии сердечно-сосудистых заболеваний современная экспериментальная медицина использует несколько типов модельных систем. Это, прежде всего, животные модели, в основном грызуны: лабораторные мыши и крысы. Но существуют определенные ограничения в использовании этих модельных систем, обусловленные значительными различиями в физиологии сердечно-сосудистой системы (частота сердечных сокращений, особенности фазы реполяризации потенциала действия и т.д.) между грызунами и человеком. Выходом из данной ситуации может стать использование кардиомиоцитов человека, получаемых при дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). ИПСК могут быть получены из соматических клеток человека с помощью сверхэкспрессии набора определенных генов, кодирующих транскрипционные факторы или микроРНК. ИПСК человека имеют ряд существенных преимуществ, поскольку они могут быть получены в любой период жизни пациентов практически из любого типа дифференцированных клеток. Получаемые при дифференцировке ИПСК кардиомиоциты очень схожи с клетками сердца человека по морфологии, экспрессии белковых маркеров, электрофизиологическим показателям и чувствительности к химическим веществам. Наряду с этим, современные технологии тканевой инженерии дают возможность получать органоспецифичные структуры для регенеративной медицины. На пути к внедрению данных технологий имеются значительные ограничения, представленные непродолжительной жизнью клеток, риском отторжения и вероятностью мутирования. В нашем институте совместно с ИЦиГ СО РАН и МФТИ полностью освоены методики получения линий пациент-специфичных ИПСК из фибробластов кожи и клеток периферической крови. Кроме того, были отработаны методы направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты с их последующим электрофизиологическим тестированием. В перспективе существуют реальные возможности для создания биологических пейсмейкеров и их доклинического тестирования.

Исследование проводится за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10322).

DRUG DISCOVERY AND RESEARCH ACTIVITIES IN TAKEDA

Matsui H.

Takeda Pharmaceuticals LLC, Japan

The most reliable way to address a hypothesis of drug candidate is to test the drug candidate in human clinical studies. However, this approach can hardly be applied, and the most reasonable approach consists of *in vitro* or *in vivo* research and then transferring the non-clinical outcomes to human. The critical limitations with this non-clinical research-based approach are clear, differences between *in vitro* cells, physiology/pathophysiology in animals, and actual human disease situation including heterogeneity. Therefore, promising approaches toward improving translatability are urgently needed. In this talk, I would like to share our consensus on the critical limitations in traditional drug discovery process, and my own experiences in Takeda which suggest the importance of human evidences, deep understandings in the target through both in-house and external research activities.

Тезисы постерных докладов

ИЗМЕНЕНИЕ РАЗМЕРОВ ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШЕК МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗЕ

Акулова А.П.*, Казаринов Н.П., Донченко Н.А.

ФГБУН СФНЦ Агробиотехнологий РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: anak04@yandex.ru

Актуальность. Паратуберкулез (паратуберкулезный энтерит) — хроническое бактериальное заболевание жвачных животных. Длительное время (до нескольких лет) протекает в субклинической форме. Не имеет хорошо выраженных специфических клинических и патоморфологических признаков. Считается, что органом-мишенью является тонкий кишечник, в особенности тонкая и подвздошная кишки. Заболевание сложно диагностируется, в том числе бактериологическими методами. Лечение и вакцинопрофилактика не разработаны. Существует предположение, что возбудитель паратуберкулеза является этиологическим фактором болезни Крона. Одним из эффективных путей изучения паратуберкулеза является его воспроизведение на лабораторных животных. Однако многие виды, в том числе и мыши (кроме линий с наследственным иммунодефицитом), не восприимчивы к возбудителю заболевания. При экспериментальном паратуберкулезе констатировать развитие заболевания также сложно. На наш взгляд, доказать развитие паратуберкулеза у животных в экспериментальных условиях можно при помощи изучения размеров пейеровых бляшек — наиболее представительной части иммунной системы кишечника.

Цель исследования — определить изменение размеров пейеровых бляшек мышей при экспериментальном паратуберкулезе.

Материалы и методы. У нелинейных лабораторных мышей воспроизводили состояние алиментарной недостаточности (патент на изобретение №2457549). Животным опытной группы внутрилегочно вводили бактериальную культуру *M. avium subsp. paratuberculosis*. Животным контрольной группы в легкое инъецировали стерильный изотонический раствор. Линейные размеры (длину, ширину) и площадь пейеровых бляшек определяли через 74 суток после внутрилегочных инъекций согласно разработанному ранее методу контрастирования (патент на изобретение №2567365). Полученные количественные данные обрабатывали статистически. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты. Сравнение результатов измерения пейеровых бляшек в контрольной и опытной группах показало, что у зараженных животных произошло увеличение их линейных размеров. По сравнению с контролем, у зараженных мышей средняя длина и ширина бляшки оказалась выше на 33,2% и 28,4% соответственно. Средняя площадь бляшки при этом превысила тот же показатель в контрольной группе на 65,8%. Во всех сравнениях различия значимы для $p \leq 0,05$.

Выводы. При экспериментальном паратуберкулезе у нелинейных мышей увеличиваются размеры пейеровых бляшек. Их сравнение в опытной и контрольной группах позволяет подтвердить развитие заболевания и оценить степень его тяжести.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СЛОЯ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

Матвеева В.А.¹, Матвеев А.Л.¹, Артемьева Л.В.^{1*}, Чичерина Г.С.², Потапова О.Ф.², Майбородин И.В.¹, Овсянникова Т.В.¹, Ефремов Я.А.³, Морозов В.В.¹

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

3 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: vam@niboch.nsc.ru

Основной причиной репродуктивных потерь, занимающих одно из первых мест среди гинекологических заболеваний, является бесплодие, как следствие, вызванное нарушением функций эндометрия. Используемое в настоящее время лечение, направленное на исправление данной дисфункции, не всегда эффективно. Одним из новых подходов в лечении бесплодия может быть клеточная терапия, основанная на регенеративном потенциале стволовых клеток эндометрия.

Клетки выделяли методом ферментативной диссоциации из диагностических образцов пайпель-биопсии функционального слоя эндометрия женщин с диагнозом эндометрит и культивировали до третьего субкультивирования. В результате выделения и культивирования получены культивируемые *in vitro* фибробластоподобные клетки, адгезивные к пластику, сохраняющие пролиферативную активность после криохранения. Согласно результатам проточной цитометрии и цитохимического окрашивания, клетки несли CD14-, CD31-, CD34-, CD38-, CD45-, CD45RA-, HLA-DR-, a-SMA-, CD326-, CD71+, CD73+, CD90+, CD146+ антигены. После введения клеток псевдобеременным самкам мышей линии BALB/c обнаружили гипертрофию эндометрия, усиленную васкуляризацию эндометрия, увеличение числа желез с секретом внутри в толще эндометрия и увеличенное число сосудов в мышечной оболочке экспериментального рога матки по сравнению с контрольным рогом, согласно результатам цитологического окрашивания.

По совокупности морфологических особенностей, адгезивных свойств, пролиферативной активности *in vitro* до и после криохранения, по фенотипу полученные клетки можно отнести к стволовым клеткам эндометрия. Васкуляризация эндометрия и мышечной оболочки матки, образование новых функционально активных маточных желез, предположительно, связаны с секрецией ростовых факторов введенными клетками. Для определения механизмов восстановления ткани эндометрия с участием стволовых клеток функционального слоя эндометрия, а также возможности их использования при лечении бесплодия, связанного с недостаточным развитием эндометрия, необходимы дальнейшие исследования.

СОЗДАНИЕ 3D ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО КОНСТРУКТА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТИ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

Астахова Н.М.^{1,2*}, Корель А.В.¹, Щелкунова Е.И.¹, Николаев С.В.³, Орищенко К.Е.³, Кирилова И.А.¹

1 ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, Россия

2 Инновационный медико-технологический центр (Технопарк) АО «ИМТЦ», Новосибирск, Россия

3 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: Nastakhova@niito.ru

Тканевой инжиниринг, использующий клетки, ростовые факторы и 3D матрицы в качестве носителей клеток, является современным клиническим подходом для регенерации значительных по площади дефектов костной ткани и коррекции травматических повреждений скелета. Цель работы — изучение биосовместимости органического и неорганического костных аллогraftов и медицинской керамики НЕВЗ при заселении их аутологичными остеогенными клетками пациентов. Для тестирования субстратов матриц были выделены клетки хондрогенного и остеогенного рядов лабораторных мини-свиней как модельного объекта для экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Были выбраны иммуногистохимические методы окраски, определяющие специфические маркеры каждого типа клеток: щелочная фосфатаза и ализариновый красный для остеобластов, коллаген II типа и альциановый синий для хондробластов. Микроструктура поверхностей депротенизированной и деминерализованной губчатой костей человека и медицинской керамики НЕВЗ были исследованы с помощью метода сканирующей электронной микроскопии. Гистологические срезы образцов из деминерализованной губчатой кости человека были окрашены азур-эозином и гематоксилином и проанализированы визуально под микроскопом при увеличениях $\times 100$, $\times 200$. Определены средние значения площадей пор. Полученные результаты показывают, что для заселения матриц остеобластами, которые имеют значительный размер в дифференцированном виде (до $29,9 \mu\text{m}$), предпочтительнее использовать образцы с размером пор от $250 \mu\text{m}$ и более. В экспериментах по длительному культивированию хондробластов и остеобластов с визуальным контролем на аппарате Cell-IQ были уточнены размеры и морфология типов клеток в гетерогенных популяциях, получены оценки подвижности клеток в приближении броуновского движения. Впервые были оценены такие параметры, как митотический индекс, расстояние, пройденное клеточной популяцией в единицу времени, траектория движения, средняя скорость движения хондробластов и остеобластов при инкубации их на культуральном пластике в течение 124 ч. Полученные данные будут использоваться как контроль при определении оптимальной биосовместимости матриц и для вычисления скорости заселения клетками 3D объемов матриц с различной внутренней структурой и физико-химическими свойствами. Разработаны алгоритмы для вычисления коэффициентов диффузии компонентов культуральной среды в материале скаффолда по результатам измерений восстановления флуоресценции после фотоотбеливания для оптически прозрачных материалов и по результатам измерений распространения парамагнитных частиц методом МРТ для оптически непрозрачных материалов. Коэффициенты диффузии предполагается использовать при расчетах динамики распределения компонентов культуральной среды в материале скаффолда в процессе заселения их клетками. Подбор оптимальных условий позволит разработать стандартные протоколы получения индивидуального тканеинженерного конструкта для регенеративной медицины.

Работа выполняется при финансовой поддержке проекта РФФИ № 15-29-04875.

СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Байзигитов Д.Р.*, Коваленко В.Р.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия
Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

*e-mail: bayzigitovd@gmail.com

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) — одна из самых распространенных разновидностей наследственных кардиомиопатий, встречается с частотой 1:500 в общей популяции. Заболевание является семейным, с аутосомно-доминантным типом наследования, развивается вследствие мутаций в генах, кодирующих синтез саркомерных белков, и обычно проявляется в виде асимметричной гипертрофии миокарда левого желудочка.

На сегодняшний день картировано более 1400 мутаций в генах, кодирующих белковые компоненты сердечных саркомеров. Однако следует отметить, что четкие клинические различия между отдельными формами заболевания отсутствуют, и установление его точного генетического варианта возможно только на основе молекулярно-генетического исследования. Для выяснения роли конкретной мутации в развитии заболевания возможно при использовании изогенных линий, которые позволяют сравнивать клетки, имеющие одинаковый генетический материал и различающиеся только по одному конкретному параметру. При этом идентификация генетической причины ГКМП имеет большое значение, поскольку связана с возможностью проведения эффективного медико-генетического консультирования и мониторинга заболевания.

Нами был объединен протокол получения ИПСК из периферической крови с оптимизированной направленной дифференцировкой в кардиомиоциты и последующей метаболической селекцией. Было проведено секвенирование клинического экзома 15 пациентов. Обнаружены мутации в генах *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*. ИПСК человека были получены при помощи эписом из мононуклеаров периферической крови. Для получения ИПСК пациентов с ГКМП были выделены мононуклеарные клетки из периферической крови, предоставленной НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина. Полученные ИПСК были соответствующим образом охарактеризованы. Проведены тесты по оценке плюрипотентности. На 10 пассаже было проведено ПЦР в реальном времени для определения количества эписом на клетку. При последующей оптимизированной направленной дифференцировке получали кардиомиоциты. Наш совмещенный и оптимизированный протокол является очень надежным и применим для масштабируемой дифференцировки в направлении кардиомиоцитов. Это обеспечивает простой и экономичный метод для получения большого количества функциональных кардиомиоцитов. Это будет способствовать дальнейшему применению КМ-ИПСК для моделирования заболеваний, поиску новых лекарственных веществ и восстановительной медицины.

ФОРМИРОВАНИЕ СОСУДИСТОЙ СЕТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРИ КОНТАКТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ РЕГУЛИРУЕТСЯ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМОЙ

Белоглазова И.Б.^{1*}, Степанова В.В.³, Коптелова Н.В.², Зубкова Е.С.¹, Дергилев К.В.¹, Парфенова Е.В.^{1,2}

¹ ФГБУ РКНПК МЗ РФ, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Университет Пенсильвании, Филадельфия, США

*e-mail: irene.beloglazova@gmail.com

Для репарации поврежденной ткани необходимым условием является быстрое восстановление ее кровоснабжения за счет формирования функциональной сосудистой сети в зоне повреждения, которое происходит при взаимодействии эндотелиальных (ЭК) и муральных клеток (МК). Среди МК особая роль в регуляции ангиогенеза принадлежит мезенхимальным стромальным клеткам (МСК), проявляющим свойства перicytes и участвующим как в стимуляции образования первичного эндотелиального сосудистого отростка, так и в его стабилизации. Для исследования механизмов, посредством которых МСК могут координировать образование ЭК сосудистой сети, мы использовали двухмерную модель ко-культивирования ЭК пупочной вены человека с МСК клетками жировой ткани человека (МСК ЖТ) на непокрытом пластике. Мы обнаружили, что только контактное взаимодействие между ЭК и МСК ЖТ способствует формированию ЭК сосудоподобных структур на пластике (СПС). Этого не происходит при бесконтактном ко-культивировании этих клеток в трансвеллах. При контактном ко-культивировании ЭК с МСК происходит повышение экспрессии рецептора урокиназы (uPAR) на поверхности ЭК, что важно для формирования СПС, так как блокирование uPAR с помощью специфических антител ингибирует этот процесс. Таким же эффектом обладали антитела к α v-субъединице интегрина, что также может свидетельствовать об участии uPAR в данном процессе посредством его взаимодействия с витронектином (VN), который в свою очередь взаимодействует с α v-интегриновыми рецепторами. Мы также обнаружили, что эндоцитоз имеет важное значение для формирования СПС в присутствии МСК ЖТ, поскольку добавление антагониста LRP — RAP, ингибитора внутриклеточного транспорта белков — монензина или ингибитора полимеризации микротрубочек — колхицина — тормозили этот процесс. Формирование СПС начинается после 14 ч. ко-культивирования ЭК и МСК ЖТ, что совпадает по времени с синтезом и секрецией внеклеточного матрикса (ВМ) ко-культурой. Однако ЭК без МСК не образовывали СПС даже при помещении их на матрикс, синтезированный как монокультурами, так и ко-культурой в течение 48 ч. После 24 ч. в ко-культуре отчетливо видны фибронектиновые филаменты, которые являются основой для сборки ВМ посредством связывания с другими матриксными белками. Через 48 ч. МСК располагались внутри сформированного ВМ, а ЭК, формирующие СПС, были расположены на поверхности ВМ и МСК. Связывание урокиназы (uPA) на поверхности клетки с uPAR, заякоренным в мембране через ГФИ якорь и обладающим поэтому латеральной подвижностью, приводит к перераспределению образовавшегося комплекса на лидирующий край клетки, обеспечивая тем самым направленность ее движения. Антитела к ингибитору урокиназы PAI-1 также снижали образование СПС. PAI-1 необратимо ингибирует протеолитическую активность uPA и повышает сродство образовавшегося комплекса к LRP, что приводит к эндоцитозу и запуску перестройки цитоскелета и перераспределению uPAR на лидирующий край клетки, что позволяет поддерживать

непрерывное движение клетки. Полученные результаты свидетельствуют о важности прямых контактов между ЭК и МСК для формирования СПС и роли урокиназной системы (uPA, uPAR и PAI-1) в этом процессе и могут иметь значение для разработки технологий получения васкуляризированных тканеинженерных конструкций.

ПЕРИФОКАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА НА ИМПЛАНТАЦИЮ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Божокин М.С., Нащекина Ю.А., Божкова С.А., Нетылько Г.И., Наконечный Д.Г.

ФГБУ РНИИТО им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: writeback@mail.ru

Цель исследования — оценить изменения в области созданного дефекта коленного сустава крысы при имплантации мембраны на основе полилактида методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Материалы и методы. Половозрелым беспородным крысам (n=10) с помощью бормашины РЭСТАР формировали поверхностный дефект хряща коленного сустава диаметром 1,0 мм и глубиной 0,5 мм. Животным опытной группы (n=5) в область дефекта имплантировали полилактидную однослойную мембрану (d=1 мм, h=0,3 мм, размер пор 20 мкм), фиксируемую фибриновым клеем. В контрольной группе (n=5) закрытие дефекта не выполняли. На 14, 30 и 90 сутки после эвтаназии животных выполняли макроскопию области повреждения и СЭМ.

Результаты. Инфекционно-воспалительных процессов в области операции не выявлено. На 14 сутки в обеих группах макроскопически визуализировалась зона дефекта. По данным СЭМ в опытной группе дефект не имел явно выраженной округлой формы, размер мембраны составил 0,5 мм, суставная поверхность была частично покрыта новообразованной тканью с иррегулярной структурой. Обращенная к области повреждения сторона мембраны имела неровную, неоднородную структуру, отличающуюся от исходной. В контрольной группе на 14 сутки дефект был округлой формы прежнего размера и частично покрыт вновь образованной пористой, предположительно, волокнистой тканью, поверхностно отличающейся от интактного хряща. На 30 сутки в контрольных образцах было отмечено формирование множественных краевых трещин и увеличение дефекта до 1,2 мм, пористое содержимое заполняло весь дефект. В то же время у животных основной группы остатки мембраны явно не визуализировались. Область дефекта была неправильной формы с нечеткими краями, покрыта плотной, немного пористой, по-видимому, вновь образованной тканью, поверхностная структура которой отличалась от интактного хряща и от волокнистого, сформированного на месте дефекта в опытной группе. На 90 сутки в основной группе макроскопически зона дефекта определялась, но мембрана не визуализировалась. По данным электронной микроскопии дефект (d=2 мм) овальной формы с четкими краями заполнен новообразованным регенератом с неоднородной поверхностью. В контрольной группе дефект увеличился до 2,4 мм, со значительным увеличением в глубину.

Выводы. Исследуемая мембрана на основе полилактида является биodeградируемой, ее применение способствует заполнению дефекта хряща вновь образованным регенератом. Тем не менее, развитие дегенеративных процессов в области созданного повреждения продолжается, однако несколько медленнее, чем в контрольной группе. Необходимы дополнительные патоморфологические исследования для определения характера формирующегося в области дефекта регенерата.

СТИМУЛЯЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА ИШЕМИЗИРОВАННОЙ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ МЫШИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ С ГЕНОМ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ (NGF)

Болдырева М.А.*, Макаревич П.И., Белоглазова И.Б., Парфенова Е.В.

ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва, Россия

*e-mail: mboldyreva@inbox.ru

Большую надежду в области терапевтического ангиогенеза возлагают на новые эффективные комбинации различных факторов, способных стимулировать весь комплекс репаративных процессов, которые невозможны без восстановления как кровоснабжения, так и иннервации. Хорошо известно, что процессы роста нервов и роста сосудов тесно взаимосвязаны. Так, фактор роста нервов (NGF), будучи важнейшим нейротрофическим фактором, участвующим в развитии и регенерации нервов, может действовать и как непрямой активатор ангиогенеза, обладая способностью стимулировать экспрессию и секрецию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), важнейшего ангиогенного фактора.

Целью данного исследования являлась оценка возможности стимулировать ангиогенез в ишемизированных скелетных мышцах с помощью локального введения созданной нами плазмидной генетической конструкции, несущей ген *NGF* человека. Ее ангиогенная эффективность исследовалась *in vivo* на модели ишемии задней конечности мыши. В группе животных, которым вводили плазмиду с геном *NGF*, было выявлено увеличение плотности сосудов в ишемизированных скелетных мышцах, которое сопровождалось значительным уменьшением числа ампутаций и размера некроза конечности, а также более быстрым восстановлением в них кровотока. Протяженность некроза стопы также была значительно меньше в экспериментальной группе по сравнению с контрольной: к 21 дню длина стопы составляла $17,0 \pm 0,41$ мм в опытной группе и $9,0 \pm 1,84$ мм в контрольной группе ($p < 0,005$). Уже к 14 дню было отмечено выраженное увеличение перфузии конечности (в экспериментальной группе $44,62 \pm 7,68\%$ против $16,74 \pm 5,85\%$ в контроле, $p = 0,005$), что свидетельствовало об образовании под действием NGF функционально активных сосудов: среднее количество сосудов в поле зрения в опытной группе примерно в 2 раза превышало количество сосудов в контроле ($p < 0,05$).

В данном исследовании показана возможность использования генной терапии на основе плазмидной конструкции с геном фактора роста нервов для стимуляции ангиогенеза и восстановления кровоснабжения в ишемизированных скелетных мышцах. Одновременная стимуляция роста сосудов и нервов может быть необходима для достижения терапевтического эффекта при лечении диабетических макроангиопатий и нейропатий с трофическими язвами, для лечения бокового амиотрофического склероза, повреждений периферических нервов, ишемических инсультов, в эстетической медицине, а также для ускорения заживления ран.

ВЛИЯНИЕ ДВУХ ВАРИАНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ IN VITRO

Бондаренко Н.А.^{1,4}, Мамаев А.Л.^{2,3}, Лыков А.П.^{1,4}, Ким И.И.^{1,4}, Суровцева М.А.^{1,4}, Беклемишев А.Б.^{2,3}, Повещенко О.В.^{1,4*}, Повещенко А.Ф.^{1,4}

1 ФГБНУ НИИКЭЛ, Новосибирск, Россия

2 ФГБНУ НИИ биохимии, Новосибирск, Россия

3 ООО «Омега БиоЛаб», Новосибирск, Россия

4 ННИИПК им. ак. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

*e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Известно, что ген ангиогенина человека локализован на 14q11 хромосоме. Зрелая молекула ангиогенина содержит 123 аминокислотных остатков и весит 14,4 кДа. Ангиогенин при взаимодействии с эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками инициирует миграцию, инвазию, пролиферацию и формирование сосудоподобных структур.

В работе исследованы эффекты двух вариантов рекомбинантного химерного ангиогенина, полученных экспрессией соответствующих синтетических генов в клетках *Pichia pastoris* (ангиогенин №2) и *Escherichia coli* (ангиогенин №3), на функциональную активность мононуклеаров периферической крови человека (МНК), костномозговых мезенхимальных стволовых клеток (КМ-МСК) и эндотелиоцитов пуповины (HUVES). Оба варианта химерного ангиогенина имеют идентичные аминокислотные последовательности и молекулярные массы (29,2 кДа) и включают N-концевую область, содержащую аминокислотную последовательность домена E и 2-х Z-доменов белка A из *Staphylococcus aureus* и C-концевую область, включающую аминокислотную последовательность зрелого ангиогенина человека.

Не выявлено токсического эффекта ангиогенинов на МНК. В то же время ангиогенины снижают пролиферативный потенциал КМ-МСК. Ангиогенин 2 и ангиогенин 3 разнонаправленно влияют на продукцию NO МНК, в частности ангиогенин 3 снижает уровни продукции МНК NO. Под влиянием ангиогенинов снижается продукция NO КМ-МСК.

В отношении HUVES показано, что ангиогенин 3 активирует пролиферацию клеток по сравнению с базальным уровнем пролиферации и VEGF. Кроме того, показано, что ангиогенин 2 и ангиогенин 3 стимулируют миграцию HUVES в камере Бойдена, но в меньшей степени, чем VEGF. Также показано, что ангиогенины снижают уровни продукции HUVES NO, но в меньшей степени, чем VEGF.

Таким образом, ангиогенин 2 и ангиогенин 3 не проявляют токсического эффекта в отношении тестируемых клеток, стимулируют миграцию эндотелиоцитов пуповины и разнонаправленно влияют на уровни продукции исследуемыми клетками оксида азота.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫХ ПОДХОДАХ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Борисов А.Г.^{1,2,*}, Савченко А.А.^{1,2}, Кудрявцев И.В.^{2,3},

1 НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия

2 Центр клинической иммунологии, Красноярск, Россия

3 НИИ экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: 2712939@mail.ru

Механизмы нарушения противоопухолевого иммунитета многообразны и связаны, в конечном итоге, с невозможность адекватного иммунного ответа на опухолевый процесс. Поэтому стратификация больных в подгруппы со сходными показателями иммунной системы является первым важнейшим шагом в реализации индивидуального подхода к лечению этой категории пациентов.

Обследовано 63 больных почечноклеточным раком (ПКР) в возрасте 40-55 лет, проходивших лечение в Красноярском краевом клиническом онкологическом диспансере имени А.И. Крыжановского. Диагноз у всех больных верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы были обследованы 78 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FC-500 (BeckmanCoulter, USA). Использовалось пятицветное иммунофенотипирование по 6 панелям. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.).

При изучении иммунологических показателей обнаружена большая вариабельность значений. Последующий кластерный анализ основных иммунологических показателей позволил выделить четыре кластера, определенных нами как варианты иммунного ответа. Первый с увеличением числа клеток врожденного иммунитета и, прежде всего, нейтрофилов выявлен в 4,76%. Второй с увеличением числа цитотоксических Т-лимфоцитов и иммуноглобулинов класса G диагностирован в 19,05% случаев. Третий со снижением иммуноглобулинов, нейтрофилов и Т-лимфоцитов — иммунодефицитный в 31,75%. Наиболее распространенным оказался ареактивный вариант (44,44%), иммунологические показатели которого у больных ПКР не выходили за контрольный диапазон.

Анализируя особенности клинического течения в этих группах, установлено, что только у больных ПКР T1-2N0M0 встречался вариант иммунного реагирования с активацией врожденного иммунитета. Помимо этого, у больных этой группы диагностировались варианты с активацией адаптивного иммунитета (19,35%), иммунодефицитный (32,26%) и ареактивный (38,71%). У больных ПКР T3N0M0 также в 2/3 случаях диагностировался иммунодефицитный (21,05%) и ареактивный (47,37%) вариант иммунного реагирования и в 31,58% случаях активация адаптивного иммунитета. У больных ПКР T3-4N0-1M1 выявлен только иммунодефицитный и ареактивный вариант реагирования соответственно 46,15% и 53,85%.

Таким образом, стратификация пациентов по иммунотипам может лечь в основу при назначении иммунотропных препаратов, так как позволит повысить эффективность лечения больных раком и реализует персонафицированные подходы к диагностике и лечению нарушений функции иммунной системы.

ПОЛУЧЕНИЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯЛИЗИРОВАННОГО МАТРИКСА ПОЧКИ КРОЛИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕРГЕНТНО-ФЕРМЕНТАТИВНОГО МЕТОДА

Брумберг В.А.*, Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Осташкин А.С., Губарев К.К., Рудаков В.С., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Добровольская Е.И., Карасева Т.В., Усупжанова Д.Ю., Лаук-Дубицкий С.Е., Бушманов А.Ю., Самойлов А.С.

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

*e-mail: brumb1225@gmail.com

Хроническая почечная недостаточность (ХПН) — одна из ведущих причин смертности в мире, включая 8-16% взрослой популяции. Частота встречаемости ХПН с каждым годом увеличивается. Почки млекопитающих обладают определенным регенеративным потенциалом, который появляется после частичной резекции и обусловлен пролиферацией пула зрелых или стволовых клеток, представленных в почке, например гломерулярными париетальными эпителиальными клетками (GPECs). Однако получение клинически значимой регенерации клеточного состава клубочков с использованием GPECs затруднено вследствие комплексной структуры почечной ткани, а восстановление регенеративного потенциала с использованием клеток почечной линии дифференцировки недостаточно для восстановления функции почек при ХПН. Последние достижения в тканевой инженерии и регенеративной медицине позволили сформулировать ряд новых подходов к лечению ХПН. В частности, использование скаффолдов, представленных децеллюляризованным внеклеточным матриксом, проявило себя как многообещающая технология в области реконструкции почечной ткани. Децеллюляризованные матриксы почек можно рассматривать как очаги индуцирования регенерации почечной ткани, поскольку они способны эффективно вовлекать в этот процесс аутологичные стволовые или дифференцированные клетки. Цель данной работы — получение децеллюляризованного матрикса почки кролика с использованием проточного биореактора EBERS TEB500 MasterUnit. Для эксперимента был выбран кролик породы «советская шиншилла» весом 3,0 кг, все манипуляции с животным были выполнены в соответствии с правилами работы с лабораторными животными. После изъятия органа почечная артерия была канюлирована, промыта несколько раз 0,9% физиологическим раствором и гепарином для удаления резидуальной крови. Децеллюляризация проводилась в стерильных условиях с использованием стандартного детергентно-ферментативного протокола в условиях шестиступенчатой перфузии с применением промывочного (1xPBS, гепарин), гипотонического (0,4% KCl) растворов, а также ионных (додецилсульфат натрия) и неионных детергентов (Triton X100) в заранее собранном и подключенном к биореактору модуле децеллюляризации. Эффективность децеллюляризации оценивали гистологическим окрашиванием срезов коркового, медулярного слоев гематоксилином и эозином, а также количественным выделением ДНК из высушенного образца гомогената ткани. При гистологическом исследовании срезов децеллюляризованной почечной ткани было выявлено отсутствие ядерного материала подоцитов, сохранение базальных мембран гломерулярных капилляров и мезангиального матрикса. Содержание ДНК в образце высушенного гомогената ткани составило 50 ng/mg, что свидетельствует об эффективности децеллюляризации. При оценке децеллюляризованной почечной ткани на стерильность бактериальной и вирусной контаминаций выявлено не было. Таким образом, стандартный детергентно-ферментативный протокол позволяет добиться эффективного удаления ядерного материала клеток, их цитозольных компонентов и мембран, что обеспечивает получение эффективного и безопасного почечного скаффолда.

ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 3Д-МАТРИКСОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА ИЗ БИОСТАБИЛЬНЫХ ПОЛИУРЕТАНОВ

Черноносова В.С.^{1,2*}, Гостев А.А.¹, Гао Ю.³, Карпенко А.А.¹, Лактионов П.П.^{1,2}

1 ННИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

3 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: vera_mal@niboch.nsc.ru

Полиуретаны — обширный класс полимеров, которые наряду с хорошими механическими свойствами обладают и хорошей био- и гемосовместимостью [Tissue Eng. В Rev. (2008) v. 14, p. 3–17; Polimery (2013) v. 58, p. 37–41]. Однако основная часть полиэфирных полиуретанов характеризуется низкой биологической стабильностью, а высокая эластичность этих полимеров приводит к чрезмерной усадке изделий, изготовленных методом электроспиннинга, что сильно осложняет процесс изготовления тканеинженерных конструкций.

В представленной работе были исследованы свойства волокнистых матриксов, изготовленных методом электроспиннинга из литевых полиуретанов TECOFLEX EG-80A и PELLETHANE 2363-80A. Для уменьшения усадки было предложено вводить в раствор полимера белок в концентрации более 5%, что позволяет уменьшить усадку полимера до 10-20%. Все полученные материалы имели волокнистую структуру с толщиной волокон $1,12 \pm 0,44 \div 1,39 \pm 0,6$ мкм и размером пор $3,6 \pm 1,3 \div 5,8 \pm 2,7$ мкм. Было показано, что соотношение полиуретана и белка в растворе для электроспиннинга влияет на механические свойства матриксов. Наилучшими физико-механическими характеристиками обладают матриксы, состоящие из 3% TECOFLEX и 10-15% желатина (вес/объем, вес/вес); 5% TECOFLEX и 15% желатина; 3.5% PELLETHANE и 5-10% желатина. Прочность на разрыв для матриксов из TECOFLEX с желатином составляет от 10.8 ± 0.3 мПа до 15.6 ± 1.8 мПа, а для матриксов из PELLETHANE с желатином — от $8,1 \pm 1,2$ мПа до $8,4 \pm 0,5$ мПа. Удлинение в области упругой деформации материала составило для матриксов из TECOFLEX с желатином ~350% и для матриксов из PELLETHANE с желатином ~190%, причем прочность в этой области составляет до 80% от максимального значения. Инкубация матриксов в физрастворе при 37°C в течение месяца приводила к изменению структуры волокон, однако практически не влияла на их прочность. Способность первичных фибробластов и эндотелиоцитов прикрепляться и пролиферировать на поверхности матриксов, состоящих из смеси полиуретанов с желатином, была исследована в экспериментах *in vitro* при помощи Almar Blue реагента и флуоресцентной микроскопии с использованием красителей Cell Tracker Orange и SYBR Green I. Было показано, что количество фибробластов на матриксах через 48 ч. составляет 50-75% (относительно клеток, рассеянных на культуральный пластик), а количество эндотелиоцитов на поверхности матриксов варьирует от 40 до 60% в зависимости от состава матрикса. По данным флуоресцентной микроскопии морфология клеток на матриксах практически не отличается от морфологии клеток на культуральном пластике.

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что матриксы на основе полиуретанов могут найти применение в регенеративной медицине, например для изготовления протезов сосудов малого диаметра, заплат или створок клапанов, т.е. там, где необходима высокая прочность и эластичность конструкции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 14-15-00493.

ВЛИЯНИЕ АПОПТОТИЧЕСКИХ ТЕЛЕЦ И МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК ДРУГИХ ТИПОВ НА РАЗВИТИЕ ССЛ₄-ГЕПАТИТА У МЫШЕЙ

Долганова О.М.^{1*}, Шварц Я.Ш.¹, Шахмурадова А.И.¹, Филимонов П.Н.²

1 ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины» РАН, Новосибирск, Россия

2 ФГБНУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» Минздрава России, Новосибирск, Россия

*e-mail: Kh_Olgam@mail.ru

В процессе апоптоза клетки образуют внеклеточные везикулы различного типа, среди которых различают апоптотические тельца (АТ), микровезикулы (МВ) и экзосомы. Известно, что АТ, МВ и экзосомы могут оказывать как про-, так и противовоспалительное, тканепротективное действие. При этом эффект внеклеточных везикул может определяться их клеточным происхождением и исходным функциональным состоянием клеток. Целью настоящего исследования было изучение возможного протективного действия мезенхимальных стволовых клеток (МСК), а также спленоцитов и перитонеальных макрофагов и полученных из этих клеток при апоптозе АТ и МВ на развитие острого ССЛ₄-индуцированного гепатита у мышей.

Исследование проводили на мышцах-самцах линии СВА, содержащихся на стандартной лабораторной диете со свободным доступом к воде и пище. Выделение и культивирование МСК проводили согласно М. Soleimani с соавт. (2009), культуру первичных спленоцитов получали по Гольдберг Е.Д. с соавт. (1992), культуру первичных перитонеальных макрофагов — стандартным методом прилипания к подложке. Полученные культуры клеток использовали для получения АТ и МВ после индукции апоптоза, который вызывали методом гипоксии в сочетании с депривацией сыворотки (Crescitelli et al., 2013). Полученные АТ, МВ, а также МСК, спленоциты и перитонеальные макрофаги вводили внутривенно мышам из расчета 1 млн. клеток/животное. Затем через 24 ч. внутривенно вводили 0,1 мл 10 % раствора ССЛ₄ в растительном масле. Еще через 1 сутки проводили определение активности АЛТ в сыворотке крови, концентрации малонового диальдегида (МДА) в гомогенате и подсчет площади очагов некроза в ткани печени. При статистической обработке данных использовали пакет программ Statistica 7.0.

Показано, что введение мышам с ССЛ₄-интоксикацией АТ, МВ полученных при апоптозе МСК приводило к достоверному снижению активности АЛТ (в 4 и 2,2 раза соответственно), снижению концентрации МДА в гомогенате и уменьшению площади очагов некроза в ткани печени по сравнению с группой с введением ССЛ₄. Введение ССЛ₄-индуцированным мышам АТ, МВ полученных при апоптозе макрофагов и спленоцитов не оказывало достоверного влияния на активность АЛТ, содержание МДА и не приводило к изменению площади очагов поражения ткани печени. Введение животным МСК, макрофагов и спленоцитов также не оказывало достоверного влияния на изменение активности АЛТ, МДА и степень поражения ткани печени у мышей.

Таким образом, обнаружено, что АТ, МВ, образующиеся при апоптозе МСК, оказывают тканепротективное действие, вызывая снижение активности АЛТ в сыворотке крови, содержания МДА в гомогенате и уменьшение зон некроза в ткани печени у мышей с острым ССЛ₄-индуцированным гепатитом.

ТРАНСКРИПЦИЯ ТАНДЕМНО ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК ПРИЦЕНТРОМЕРНЫХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ КЛЕТОЧНОГО СТРЕССА И СТАРЕНИЯ.

Пономарцев Н.В.^{1,2}, Айзенштадт А.А.^{3,4}, Пономарцев С.В.¹, Шилина М.¹, Лисковых М.¹, Золина Т.³, Александрова Л.³, Галембо И.³, Гринчук Т.М.¹, Енукашвили Н.И.^{1*}

1 Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

2 Institute of Molecular and Cell Biology, A-STAR, Singapore

3 Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия

4 НИЛ клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: nie@newmail.ru

Тандемно повторяющаяся некодирующая сателлитная ДНК (сатДНК) прицентромерных районов хромосом транскрибируется в дифференцированных клетках во время переключения клеточных программ при стрессе, старении, малигнизации, а также в эмбрионах и эмбриональных стволовых клетках. Возможность транскрипции в мультипотентных мезенхимальных стволовых клетках (МСК) остается неизученной. Данные о функциональной активности таких транскриптов в клетках взрослого организма получены только на модели теплового шока (ТШ) малигнизированных линий. Однако малигнизация сама по себе приводит к активации транскрипции сатДНК, а механизм ответа на тепловое воздействие в такой модели отличается от ответа нормальных клеток.

Целью работы являлась оценка уровня транскрипции сатДНК в МСК в условиях переключения клеточных программ, индуцированного тепловым воздействием или клеточным старением. Для экспериментов использовали МСК пуповинной крови и эндометрия с верифицированными карио- и иммунофенотипами. Уровень транскрипции сатДНК и гена *Ddx5*, кодирующего один из регуляторов ее транскрипции, оценивали с помощью RT-PCR. Уровень конденсации прицентромерного хроматина в интерфазном ядре оценивали по размеру FISH-сигнала методами конфокальной микроскопии. *Ddx5* мРНК инактивировали с помощью лентивирусной конструкции, содержащей антисмысловую вставку. Ядерные стресс-тельца визуализировали с помощью антител к HSF-1.

Деконденсация прицентромерной сатДНК наблюдалась как при тепловом стрессе, так и в условиях длительного культивирования МСК. Деконденсация сопровождалась повышением уровня транскрипции сатДНК и белка *Ddx5*. В условиях клеточного стресса, вызванного нагреванием, уровень транскрипции плавно повышался в течение часа после начала нагревания и возвращался к норме через 3 ч. Белок *Ddx5* формировал гранулы, колокализированные с ядерными стресс-тельцами и прилегающие к участкам деконденсированного гетерохроматина. Транскрипция сатДНК и сборка ядерных стресс-телец не наблюдались в клетках с инактивированным *Ddx5*. Однако в таких культурах наблюдалось уменьшение количества клеток с активированными каспазами 3/7. При длительном культивировании (6.5 мес) МСК наблюдались схожие изменения: деконденсация прицентромерного гетерохроматина в интерфазных ядрах и активация транскрипции сатДНК и *Ddx5*. При инъекциях длительно культивируемых клеток бестимусным мышам образование опухолей не было зарегистрировано. По данным RT-PCR, через два месяца в области инъекций, а также сердце, легких и печени ДНК человека не обнаруживалась.

Полученные результаты подтверждают транскрипцию ДНК в МСК в условиях переключения клеточных программ и роль Ddx5 в регуляции данной транскрипции.

Работа поддержана грантами: Программа РАН «Молекулярная и клеточная биология» (01200955639), РФФИ № 16-34-01163, 16-34-00603.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АУТОЛОГИЧНОГО И АЛЛОГЕННОГО ФИБРИНОВОГО КЛЕЯ В КАЧЕСТВЕ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ПРЕХОНДРОЦИТОВ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

Енукашвили Н.И.^{2*}, Айзенштадт А.А.^{1,3}, Багаева В.¹, Золина Т.Л.¹, Александрова А.¹, Супильникова О.В.^{1,3}, Адылов Ш.Ф.¹

1 Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия

2 Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

3 НИЛ клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: nie@newmail.ru

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и получаемые из них прехондроциты (МСК-ПХ) являются эффективным инструментом для восстановления и поддержания суставных хрящей. Данный подход основан на использовании МСК как а) предшественников хондроцитов для формирования хрящевых имплантатов, б) продуцентов большого количества биологически активных факторов в области имплантации. Доставка МСК и МСК-ПХ в поврежденный сустав может быть произведена путем внутрисуставной имплантации клеток, суспендированных как в жидкости, так и в специальных средах, скаффолдах, обеспечивающих удержание клеток в области инъекции и дополнительное снабжение клеток биологически активными веществами. Скаффолды, основанные на фибриновом клее (ФК), представляются перспективными вследствие высокой биосовместимости, способности к биодеградации, удобства использования. Чаще всего ФК приготавливается на основе коммерческих наборов (Tissucol®, Tisseel®, Greenplast kit®). Однако ФК из криопреципитатов аутологичной плазмы (Ау-ФК) пациента или аллогенной плазмы пуповинной крови (ПК-ФК) в некоторых случаях может рассматриваться как более предпочтительный вариант. К достоинствам Ау-ФК относятся минимизация побочных эффектов, рисков инфицирования и возникновения аллергических реакций, доступность и снижение стоимости процедуры. ПК-ФК обогащен биологически активными веществами и получается из утилизируемого в процессе сохранения стволовых клеток пуповинной крови материала. Мы разработали протокол, позволяющий получать ФК в закрытой системе в течение всего процесса от забора крови до самой процедуры трансплантации, что делает возможным клиническое применение Ау-ФК и ПК-ФК. Целью данной работы являлась оценка возможности использования полученных в закрытой системе скаффолдов на основе Ау-ФК и ПК-ФК для имплантации МСК и МСК-ПХ. Исследовали влияние скаффолдов на жизнеспособность, иммунофенотип, хондрогенный и иммуномодуляторный потенциалы МСК различного происхождения. Оба типа скаффолдов не оказывали влияния на жизнеспособность и иммунофенотип МСК. Они не оказывали влияния на дифференцировку в хондрогенном направлении в стандартных условиях. Однако оба типа скаффолдов облегчали дифференцировку в хондрогенном направлении в провоспалительном окружении *in vitro*, что, как мы полагаем, связано с подавляющим действием скаффолда на выработку провоспалительных цитокинов INF γ , IL1 и TNF α . Наши результаты подтверждают возможность использования Ау-ФК и ПК-ФК в качестве скаффолдов в травматологии и ортопедии. Принимая во внимание легкость получения, возможность использования при минимально инвазивном вмешательстве (артроскопии) и минимизацию риска инфицирования при работе в закрытых системах, мы рассматриваем Ау-ФК и ПК-ФК как перспективные скаффолды для МСК и МСК-ПХ в травматологии и ортопедии.

ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ КАК СТИМУЛЯТОР АНГИОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Зубкова Е.С.*, Белоглазова И.Б., Макаревич П.И., Болдырева М.А., Парфенова Е.В.,
Меньшиков М.Ю.

ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,
Москва, Россия

*e-mail: zubkova@cardio.ru

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) — это мультипотентные клетки, присутствующие во многих тканях и имеющие значительный потенциал для использования в регенеративной медицине. В настоящее время проводятся или закончены более 350 клинических исследований применения МСК для лечения широкого спектра патологических состояний (<https://clinicaltrials.gov>). Однако, несмотря на высокий регенеративный потенциал МСК, обусловленный в значительной степени уникальными паракринными свойствами, клинические исследования в некоторых случаях не показали достаточной эффективности. Это может быть обусловлено снижением регенеративных свойств МСК с возрастом и при хронических патологиях и обосновывает актуальность разработки подходов к культивированию, повышающих их терапевтический потенциал. В связи с этим особый интерес представляет изучение возможности и механизмов воздействия воспалительных факторов на МСК, поскольку регенерация ткани в первую очередь сопровождается привлечением в область повреждения лейкоцитов, которые, секретировав провоспалительные цитокины (в том числе фактор некроза опухолей, ФНО- α), активно воздействуют на функции МСК. Для исследования этого вопроса мы культивировали МСК жировой ткани (МСК ЖТ) в присутствии ФНО- α . Было установлено, что ФНО- α влияет на сократительный аппарат клеток, повышая количество F-актиновых стресс-фибрилл, способствует миграции и инвазии МСК ЖТ и усиливает их пролиферацию. ФНО- α вызывает активацию ряда сигнальных путей (ERK1/2, Rac1, Akt), в том числе приводящих к генерации активных форм кислорода и активации фактора транскрипции NF- κ B. Это, в свою очередь, опосредует экспрессию и секрецию МСК ЖТ проангиогенных факторов: *MCP-1*, *IL8*, *VEGF*, *ANGPT1*, *MMP9*. При сокультивировании в фибриновом геле эндотелиальных клеток с МСК ЖТ, предстимулированными ФНО- α , значительно увеличивается образование сосудоподобных структур. На модели ишемии задней конечности мыши мы показали, что трансплантация МСК ЖТ, предстимулированных ФНО- α , значительно ускоряет восстановление кровотока в поврежденной конечности и уменьшает выраженность некроза мышц.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ФНО- α оказывает комплексное воздействие на МСК ЖТ, активируя внутриклеточный сигналинг, усиливая их пролиферацию и миграцию, экспрессию и секрецию ангиогенных факторов. Это приводит к усилению ангиогенных свойств МСК ЖТ и их регенеративного потенциала. Полученные результаты могут служить основой для разработки метода предтрансплантационной подготовки МСК ЖТ путем культивирования в присутствии ФНО- α при их использовании для клеточной терапии ишемических заболеваний.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ KIT ПРИ ОМЛ С НОРМАЛЬНЫМ КАРИОТИПОМ

Виноградов А.В.^{1*}, Изотов Д.В.²

1 Министерство здравоохранения Свердловской области, Екатеринбург, Россия

2 ГБОУ ВПО УГМУ, Екатеринбург, Россия

*e-mail: vinogradov-av@yandex.ru

Известно, что мутации гена *KIT*, кодирующего одноименную рецепторную тирозинкиназу, вызывают лиганд-независимую активацию рецептора и, как следствие, сигнальных путей RAS/MAPK, PI3K/AKT и JAK/STAT, иницируя клеточный цикл, пролиферацию и подавление апоптоза, что является патогенетическим механизмом примерно 15% случаев острых миелоидных лейкозов (ОМЛ). Целью исследования было определение частоты мутаций и структурных изменений тирозинкиназы Kit при ОМЛ.

Исследованы пробы костного мозга и периферической крови 45 пациентов с ОМЛ в возрасте от 17 лет до 81 года, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре с 2008 по 2015 г. Всем пациентам выполнено цитогенетическое и/или молекулярно-генетическое исследование (ПЦР на t(8;21), inv(16), t(9;22), аномалии 11q23), на основании результатов которых установлен нормальный кариотип лейкозных клеток. Для 30 образцов проведена детекция мутаций экзонов 7-12 и 16-19 гена *KIT* методом прямого автоматического секвенирования в соответствии с ранее описанной методикой (Виноградов А.В. и соавт., 2013). Третичную структуру моделировали с использованием распределенной сети предсказания структуры белка Phyre 2.0, для визуализации и анализа использовали программное обеспечение PyMol v1.3r1.

Структурные изменения в кодирующей последовательности гена *KIT* определялись в 16,7% случаев, при этом в 4 пробах была выявлена трансверсия с.1621A>C в 10 экзоне, приводящая к замене аминокислотного остатка метионина на лейцин в позиции 541 кодируемого белка, в одной — делеция протяженностью с 1529 по 1774 позиции нуклеотидов в 10-12 экзонах, приводящая к утрате 82 аминокислотных остатков.

541 аминокислотный остаток расположен в конечном участке трансмембранного домена и не вовлечен в какие-либо стабилизирующие молекулу взаимодействия, а замена метионина на лейцин не приводит к заметному изменению разности свободных энергий между диким и мутантным вариантами белка. Кроме того, по данным литературных источников, частота встречаемости указанной замены при патологических состояниях незначительно отличается от таковой в популяции. Таким образом, M541L является однонуклеотидным полиморфизмом, не имеющим значения при ОМЛ.

Напротив, выявленная крупная делеция затрагивает юкстамембранный домен (включая сайты аутофосфориллирования Y568 и Y570), обеспечивающий поддержание белка в аутоингибированном состоянии, и может быть ассоциирована с быстрым прогрессированием и неблагоприятным прогнозом.

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ЗЕЛЕННОГО ЧАЯ С КРЕМНЕЗЕМОМ, ОБРАБОТАННОГО МЕХАНОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ, ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ МЫШЕЙ

Казаринов Н.П.^{1*}, Акулова А.П.¹, Донченко Н.А.¹, Ломовский О.И.², Ломовский И.О.², Бычков А.Л.²

1 ФГБУН СФНЦ Агробиотехнологий РАН, Новосибирск, Россия

2 ФГБУН ИХТТМ СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: nkazar@mail.ru

Актуальность. Зеленый чай — богатый природный источник антиоксидантов. Препараты кремнезема в последние годы активно используются для детоксикации и в качестве источника микроэлемента кремния. Антиоксиданты часто применяют в комплексной терапии туберкулеза для коррекции нарушений, возникающих под действием туберкулезной интоксикации и химиотерапии. Как правило, при туберкулезе поражается печень, поскольку в ней происходит инактивация противотуберкулезных препаратов. Частота лекарственных поражений печени при туберкулезе составляет 15–20%. Неблагоприятное воздействие на печень оказывает длительная туберкулезная интоксикация, которая ведет к жировой дистрофии и амилоидозу. Считается, что природные антиоксиданты, например содержащиеся в растительных продуктах, обладают слабой активностью. Поэтому их рекомендуют использовать в качестве средств профилактики. Нами был опробован растительный препарат зеленый чай с биогенным кремнеземом из рисовой шелухи, обработанный механохимическим методом в ИХТТМ СО РАН, что позволило повысить его антиоксидантную активность.

Цель исследования: изучить влияние зеленого чая, обработанного механохимическим методом с кремнеземом, на печень мышей при экспериментальном туберкулезе.

Материалы и методы. Исследование проведено на 20 нелинейных мышах массой 25–30 г, зараженных *M. bovis* (штамм Омск-5). Заражение проводили внутрилегочно 0,1 мг культуры в 0,1 мл физиологического раствора. Животных разделили на 2 группы. В 1 группе экспериментальных воздействий не проводили. Второй группе в качестве жидкости для питья давали отстоянный водный раствор препарата зеленого чая с кремнеземом (0,01 г на 10 мл воды). Мыши выпивали около 5 мл в сутки на животное. Каждый день раствор меняли на свежий. Длительность эксперимента составила 30 сут. Развитие туберкулеза подтверждали в ходе вскрытия и методом бактериоскопии. Проводили микроскопическое изучение гистологических срезов печени. **Результаты исследований.** В обеих группах относительная масса печени была примерно одинаковой. По макроскопическим признакам отличий не обнаружено. В ходе гистологического исследования у всех животных 1 группы выявлена дистрофия гепатоцитов (преимущественно зернистая и вакуольная), затрагивавшая все доли печени. У 3 животных вокруг капилляров и центральных вен найдены отложения белковых масс толщиной 10–40 мкм, схожих с амилоидом. Встречались единичные некротизированные гепатоциты с ярко-оксифильной цитоплазмой и крупные лимфоцитарно-макрофагальные инфильтраты размером до 200 мкм. У животных 2 группы печень имела практически нормальное строение. Дистрофия затрагивала лишь отдельные участки, лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов было меньше, их размеры не превышали 50 мкм, в них содержалось больше нейтрофилов. **Выводы.** При экспериментальном туберкулезе у мышей развиваются выраженные дистрофические изменения печени, выявляемые микроскопическими методами, без воздействия противотуберкулезных препаратов. Зеленый чай с кремнеземом, обработанный механохимическим методом, обладает заметным гепатопротекторным действием при туберкулезе мышей.

ЛЕЧЕНИЕ ОПУХОЛЕНОСЯЩИХ КРЫС МЕЗО-ТЕТРА(4-N-ГИДРОКСИЭТИЛПИРИДИЛ) ПОРФИРИНАМИ $H_2TOEPyP_4$ И $AgTOEPyP_4$

Карпетян Н.Г.*, Ананян Г.В., Далян Е.Б., Арутюнян С.Г.

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

*e-mail: nelkarapetyan@gmail.com

В представленной работе с помощью спектрофотометрических кривых плавления проводилось сравнительное исследование структурных изменений ДНК, выделенных из печени здоровых крыс, из опухолевой ткани больных, а также леченых порфиринами крыс. В качестве потенциальных противоопухолевых препаратов были исследованы мезо-тетра(4-N-гидроксиэтилпиридил) порфирины $H_2TOEPyP_4$ и $AgTOEPyP_4$.

Плавление исследуемых образцов ДНК проводили как в отсутствии, так и в присутствии различных концентраций ионов Mn^{2+} . Известно, что ион Mn^{2+} при относительно высоких стехиометрических концентрациях связывается с местами избыточной плотности зарядов на гуаниновых основаниях ДНК в норме, что приводит к избирательной дестабилизации ГЦ-пар. Таким образом, термостабильность ГЦ-пар приближается к термостабильности АТ- пар, вследствие чего интервал плавления ΔT сужается. При наличии дефектов в структуре опухолевой ДНК доступ ионов металла Mn^{2+} к соответствующим участкам осложняется, что должно привести к незначительному уменьшению параметра ΔT .

Результаты экспериментов выявили, что интервал плавления ΔT ДНК здоровых животных в присутствии ионов Mn^{2+} (при молярном соотношении $[Mn^{2+}]/[ДНК] = 4$) уменьшается в 4.17 раз по сравнению со значением параметра ΔT , полученным в отсутствии ионов Mn^{2+} . В то же время при плавлении в тех же условиях опухолевой ДНК, параметр ΔT уменьшается лишь в 1.79 раз. Это свидетельствует о наличии дефектов в опухолевой ДНК.

Значение ΔT , полученное при плавлении ДНК из опухоли больных животных, леченых порфиринами $H_2TOEPyP_4$ и $AgTOEPyP_4$, уменьшается в 1.95 и 2.38 раз соответственно. Как видно из полученных данных, при лечении крыс порфиринами параметр ΔT имел тенденцию приближения к норме. При этом эффект был более выражен для $AgTOEPyP_4$ порфирина.

Таким образом, можно заключить, что $AgTOEPyP_4$ порфирин обладает некоторыми терапевтическими свойствами.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ НА МАТРИЦЕ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА

Королева В.А.* , Холявка М.Г., Ольшанникова С.С., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

*e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Растительные протеолитические ферменты нашли широкое применение в медицине и ветеринарии. Нативные ферменты медицинского назначения должны храниться не более одного года при температуре 4-8 °С. Иммунизация энзимов способствует увеличению сроков хранения биокатализаторов. К носителям ферментов для применения в области здравоохранения предъявляется ряд требований, например подложка должна быть нетоксичной, неиммуногенной по отношению к организму, устойчивой к химическим и биологическим агентам. Хитозан соответствует вышеназванным требованиям. Хитозан представляет собой линейный полисахарид, содержащий сополимеры N-ацетилглюкозамина и глюкозамина. Его получают путем частичного деацетилирования хитина из панцирей ракообразных.

Цель работы заключалась в разработке методики получения гетерогенных биокатализаторов на основе цистеиновых протеаз, иммобилизованных на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана.

В качестве объектов исследования были выбраны фицин (Sigma) и папаин (Sigma), субстратом для гидролиза являлся азоказеин (Sigma), носителем для иммобилизации — кислоторастворимый среднемолекулярный хитозан ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования = 82 %) (ЗАО «Биопрогресс»). Для сорбции энзимов на матрицах кислоторастворимого хитозана мы использовали следующие буферные системы: 0.05 М глициновый, 0.05 М трис-глициновый, 0.2 М ацетатный, 0.1 М фосфатный, 0.1 М цитратный, 0.05 М боратный буфер с добавлением KCl, 0.1 М боратный буфер без добавления KCl, 0.1 М карбонатный и 0.05 М трис-HCl буфер.

Оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной активности (в ед на мг белка) выявлено при сорбции фицина на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана при использовании глицинового буфера со значением pH 10.0. При учете тех же критериев оптимальными для иммобилизации папаина на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана также оказался глициновый буфер, но со значением pH 9.0.

Таким образом, мы считаем, что глициновый буфер со значениями pH 10.0 и 9.0 перспективен для иммобилизации соответственно фицина и папаина на матрицах кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана. Также можно сделать предположение о том, что энзимы, входящие в семейство цистеиновых протеиназ, имеют сходные оптимальные условия для иммобилизации на матрице хитозана.

Литература:

1. Холявка М.Г. Иммунизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности / М.Г. Холявка [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. Т. 11. № 7. С. 29-35.
2. Логинова О.О. Подбор методики количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности / О.О. Логинова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, А.С. Беленова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2013. № 2. С. 116-119.

ПЕРСОНИФИКАЦИЯ АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ

Котловская Л.Ю.^{1*}, Соловьев М.А.¹, Тимофеев М.С.¹, Котловский М.Ю.³, Тютрин И.И.², Удуд В.В.¹

1 Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томск, Россия

2 Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

3 Красноярский государственный медицинский университет, Красноярск, Россия

*e-mail: lars.ktl@gmail.com

Оценка эффективности противотромботической терапии и антиагрегантной в частности при сердечно-сосудистых заболеваниях несомненно актуальна. Вариантами ее реализации выступают лабораторные тесты (определение индуцированной агрегационной активности тромбоцитов) и мультицентровые исследования в оценке клинически определяемых тромбо-геморрагических осложнений. Оба подхода затратны. Если недостатком первого выступает информация сугубо о функциональном состоянии тромбоцитов, то для второго — полное исключение тренда персонализации. Появление «глобальной» технологии, низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТГ), позволяет решить эти задачи.

Цель — демонстрация возможности персонализации антиагрегантной терапии у пациентов с гипертонической болезнью (ГБ) 1-2 стадии.

Материалы и методы. Оценка эффектов антиагрегантной терапии проводилась у 60 пациентов с диагнозом ГБ 1-2 стадии. Для оценки антиагрегантов с различными механизмами действия пациенты были разделены на три группы. Пациенты 1-ой группы (n=20) получали ингибитор ЦОГ-1 (кардиомагнил 150 мг), 2-ой группы (n=20) — ингибиторы P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов (клопидогрел 150 мг), 3-ей группы (n=20) — ингибиторы фосфодиэстеразы (пентоксифиллин 600 мг). Оценка эффективности терапии проводилась путем анализа временных и амплитудных параметров суспензионной стабильности цельной крови (ССЦК), характеризующей агрегационную активность форменных элементов крови, отображаемой на начальных этапах кривой НПТГ до точки t₁, дважды: исходно и через 24 ч. после приема препарата. Различия считали достоверными при p<0,05.

Результаты. Общим эффектом всех препаратов являлось снижение интенсивности начальных этапов гемокоагуляции (фазы инициации и амплификации): значимое увеличение t₁ (времени от начала исследования до максимального снижения амплитуды НПТГ) после однократного приема кардиомагнила, клопидогрела и пентоксифиллина с 0,7 [0,3; 0,9] до 2,3 [1,5; 2,9]; 2,1 [1,65; 3,2]; 1,05 [0,8; 1,5] соответственно, а также достоверное снижение интенсивности контактной коагуляции — ИКК (показателя, отображающего агрегационную активность форменных элементов крови) в 4,5; 2,5 и 1,8 раз соответственно для сравниваемых препаратов. Было выявлено, что помимо антиагрегантного эффекта получаемые препараты оказывают плейотропные эффекты по отношению к гемостатическому потенциалу в целом, что выражается в хронометрической гиперкоагуляции — укорочении t₅ (времени достижения максимальной амплитуды НПТГ (A₅), соответствующему времени формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка) при однократном приеме кардиомагнила (на 12%) и клопидогрела (на 10%) на фоне структурной гипокоагуляции, что свидетельствует об активации противосвертывающей системы крови. Также было выявлено, что однократный прием пентоксифиллина приводит к формированию структурной и хронометрической гипокоагуляции (увеличение t₅ на

12% и снижение максимальной амплитуды на 13%), возникшей в результате снижения интенсивности образования поперечно-сшитого фибрина.

Выводы: применение метода НПТГ позволяет осуществить персонифицированный подход к ведению пациента: мониторингу и оценке эффективности проводимой антиагрегантной терапии.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ НИТЕЙ ИЗ ХЛОРИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА МОДИФИЦИРОВАННОГО БЕТУЛИНОМ

Куринова М.А.*, Скибина Д., Гальбрайх Л.С.

Московский государственный университет дизайна и технологий, Москва, Россия

*e-mail: kma240190@mail.ru

С целью получения биологически активных нитей на основе хлорированного поливинилхлорида (ХПВХ) исследована система «ацетоновый раствор ХПВХ-модифицирующая добавка (бетулин)». В качестве модифицирующей добавки использовали раствор бетулина в этиленгликоле (ЭГ). Поскольку бетулин растворим в большом числе органических растворителей, было изучено влияние типа растворителя бетулина на структуру и реологические характеристики концентрированного раствора ХПВХ.

Построены и изучены трехкомпонентные системы «ХПВХ (бетулин)-растворитель-осадитель». Фазовые диаграммы были построены с использованием точек мутности с использованием в качестве осадителей ЭГ и ацетона. Определены границы совместимости компонентов в изученных системах. На основании полученных данных в качестве растворителя, обеспечивающего возможность введения бетулина в раствор, был выбран ЭГ.

Содержащие бетулин растворы ХПВХ готовили путем растворения бетулина в ЭГ и последующего его добавления к раствору ХПВХ при интенсивном перемешивании. После обезвоздушивания в статических условиях в течение 24 ч. определяли вязкость и кривые течения растворов при различных значениях скорости сдвига на вискозиметре Rheotest-2.1.

На основании характеристики реологических свойств растворов сделан вывод об упрочнении структуры полимерной системы при введении биологически активного вещества, подтвержденный данными об увеличении энергии активации вязкого течения при увеличении концентрации бетулина в растворе.

Процесс формования бетулинсодержащих хлориновых нитей проводили на лабораторной установке МУЛ-1 коагуляционным способом. В качестве осадительной ванны использовали 30%-ный водный раствор ацетона. Формование нитей осуществляли с использованием фильеры с количеством отверстий 300 диаметром 0.08 мм. Фильерная вытяжка — 89%, длина пути нити в ванне — 85 см. Температуру ванны поддерживали на уровне 18⁰С. Кратность вытягивания составила — 2.0.

Показано, что прочность бетулинсодержащей нити практически не зависит от концентрации модифицирующей добавки, однако по сравнению с нитью, не содержащей бетулин, ее прочность снижается в 1.74 раза.

ФЕНОТИП ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ/СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ МНМ-ИНДУЦИРОВАННОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Лыков А.П.*, Кабаков А.В., Бондаренко Н.А., Казаков Щ.В., Райтер Т.В., Суровцева М.А., Ким И.И., Повещенко О.В., Стрункин Д.Н., Повещенко А.Ф.

НИИКЭЛ, Новосибирск, Россия

*e-mail: aplykov2@mail.ru

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) основная причина смертности женщин во всем мире. Для изучения патогенеза и терапии РМЖ используют экспериментальную модель на животных.

Цель исследования – изучить фенотип и роль опухоль-ассоциированных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (ОА-МСК) при экспериментальной модели РМЖ.

Материалы и методы исследования. Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2013). РМЖ индуцировали интрамаммарным введением МНМ. Через 24 недели оперативно удаляли опухоль молочной железы и ткань молочной железы на противоположной стороне, измельчали ножницами и дезагрегировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа. ОА-МСК от 3 пассажа фенотипировали с использованием CD90 и CD45 на проточнике FACSCanto II.

Собственные результаты. Клетки, выделенные из тканей молочных желез, имели фибробластоподобную форму. Клетки экспрессировали маркер МСК CD90, а также маркер гемопоэтических клеток CD45. В группе животных с индуцированным РМЖ показано увеличение клеток с фенотипом CD45+CD90-, CD45+CD90+ и CD45-CD90+ МСК по сравнению с контрольной группой и МСК из молочных желез с противоположной стороны ($p < 0,05$). Количество CD45-CD90+ МСК в группе животных с невозникшим РМЖ увеличено в сравнении с контролем и снижено в сравнении с количеством МСК из молочных желез с противоположной стороны ($p < 0,05$). Кроме этого, количество CD45+CD90+ МСК снижено по сравнению с контролем и количеством МСК с противоположной стороны ($p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, установлено, что количество ОА-МСК возрастает при МНМ-индуцированном РМЖ.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ β -ЛАПАЧОНА НА ЛИНИИ КЛЕТОК ГЛИОМ ЧЕЛОВЕКА

Макушева Ю.С.^{1*}, Дианов Г.Л.^{1,2}

1 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Оксфордский институт радиационной онкологии, Оксфорд, Великобритания

*e-mail: makusheva@bionet.nsc.ru

Глиомы — наиболее распространенные опухоли головного мозга человека, имеющие нейро-эктодермальное происхождение. Основным способом лечения глиом является хирургическое удаление опухоли с последующей лучевой и химиотерапией. Однако, несмотря на существующие в настоящее время комплексные подходы в лечении глиом, выживаемость пациентов остается крайне низкой. Одной из основных проблем современной химиотерапии является высокая токсичность используемых веществ для здоровых тканей организма. Вариантом решения этой проблемы может стать использование таргетных препаратов, действие которых основано на специфических характеристиках опухолевых клеток. β -лапачон представляет собой именно такой вариант противоопухолевых препаратов, так как он активируется только в клетках с повышенным уровнем экспрессии NQO1. Высокий уровень экспрессии NQO1 характерен для многих солидных опухолей человека, в том числе опухоли молочной железы, легких, толстой кишки и поджелудочной железы. Однако в настоящее время получены лишь ограниченные данные об использовании β -лапачона в качестве противоопухолевого агента в терапии глиальных опухолей человека.

Целью данной работы было исследование механизмов противоопухолевой активности β -лапачона на модели клеточных линий глиом человека.

В работе были использованы три линии клеток глиом: U-87 MG, T98G и U-118 MG. Для определения механизма цитотоксического действия β -лапачона на клетки глиом были проанализированы следующие параметры:

- 1) Выживаемость клеток;
- 2) Экспрессия белков NQO1, p53, PARP1 и p21;
- 3) Уровень образования активных форм кислорода.

Ранее было показано, что белок NQO1 восстанавливает β -лапачон до семихинона, что приводит к образованию активных форм кислорода (АФК). Образование АФК вызывает повреждения ДНК и, в свою очередь, стимулирует гиперактивацию белка PARP1. При оценке выживаемости клеток глиом при обработке β -лапачоном было выявлено значительное снижение жизнеспособности клеток с увеличением концентрации применяемого соединения. Однако инкубация клеток глиом под действием β -лапачона не индуцировала увеличение уровня АФК, а также не приводила к изменению профиля экспрессии белка PARP1 и белков, участвующих в ответе клеток на повреждение ДНК (p53 и p21). Кроме того, необходимо отметить, что снижение экспрессии белка NQO1 (нокдаун *NQO1*) не оказывало влияния на чувствительность клеток глиом к β -лапачону.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить наличие NQO1-независимого механизма гибели клеток глиом при инкубации с β -лапачоном, что требует проведения дополнительных исследований.

РОЛЬ MMP И TGF- β_1 В ПРОЛИФЕРАЦИИ РЕПЛИКОНА ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Маликова А.З.^{*}, Клейменова А.А., Камарова К.А., Козлов М.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

*e-mail: rasssl44@gmail.com

Современная терапия гепатита С основана на использовании препаратов прямого действия, эффективно блокирующих вирусные белки и ферменты. Их применение дает устойчивый антивирусный ответ у 90% пациентов. Однако, принимая во внимание, что число инфицированных вирусом гепатита С составляет около 200 млн. человек, количество больных, не восприимчивых к подобным препаратам, может достигать 20 млн. человек. В связи с этим сохраняет свою актуальность поиск новых терапевтических мишеней, в первую очередь белков клетки-хозяина, необходимых для внутриклеточного воспроизводства вируса.

Вирус гепатита С (HCV) обладает способностью активировать экспрессию клеточных генов и использовать их белковые продукты для собственной репликации. Известно, что клетки, инфицированные HCV, резко увеличивают продукцию матриксных металлопротеиназ (MMP) и латентной формы белка трансформирующего фактора роста β_1 (TGF- β_1), а вирусный белок капсида участвует в регуляции экспрессии 50% TGF- β_1 -зависимых генов. В свою очередь, MMP протеолитически активируют TGF- β_1 , что стимулирует репликацию HCV, однако механизм этого процесса недостаточно изучен. В нашей работе мы исследовали роль MMP и TGF- β_1 в пролиферации вирусного репликона.

Используя антитела к белку TGF- β_1 и к его рецептору TGF- β_1 RII, нам удалось замедлить пролиферацию субгеномного (Sub-Luc-neo) и полноразмерного (Full-Luc-neo) репликона HCV в гепатоцитах человека линии Huh7. Полученные результаты косвенно указывали на различие в уровнях экспрессии TGF- β_1 и TGF- β_1 RII между двумя видами клеток. Кроме того, SB431542 — ингибитор киназной активности цитоплазматического домена TGF- β_1 RII — эффективно блокировал репликацию HCV в случае полноразмерного репликона.

Далее мы показали, что полипотентные ингибиторы MMP, приномастат и CTS-1027, проявляют анти-HCV активность, демонстрируя более высокую селективность ингибирования по отношению к репликону Sub-Luc-neo. Нами была синтезирована серия орто-сульфанильных производных бензогидроксамовой кислоты, потенциальных неселективных ингибиторов MMP. Было показано, что анти-HCV активность данных соединений выше по сравнению с приномастатом и CTS-1027 и зависит от структуры сульфанильного заместителя. Кроме того, нами был сделан предварительный вывод о том, что анти-HCV действие ингибиторов MMP определяется их полипотентной активностью, поскольку селективный ингибитор MMP-2 ARP-100 не подавлял пролиферацию полноразмерного репликона HCV.

Таким образом, полученные результаты косвенно указывают на связь между анти-HCV активностью полипотентных ингибиторов MMP и процессингом латентной формы TGF- β_1 и заслуживают дальнейшего изучения.

МОНИТОРИНГ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КАРДИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ В ЗОНУ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ МИОКАРДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ РЕПОРТЕРНОЙ СИСТЕМЫ

Милевская Е.А.^{1,2,3*}, Чепелева Е.В.^{2,4}, Павлова С.В.^{1,2,4}, Покушалов Е.А.^{2,4}

1 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

2 ННИИПК имени академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

3 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

4 ФГБНУ ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: milevskayaliza@gmail.com

Применение клеточных технологий в терапии последствий ишемического поражения миокарда является перспективным направлением современной медицины. Ключевым моментом успеха любой клеточной терапии является высокая эффективность доставки целевых клеток и их приживление в целевой зоне.

В данной работе мы оценили эффективность приживления кардиальных стромальных клеток (КСК) после трансплантации в зону ишемизированного миокарда крыс после окклюзии передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. КСК характеризуются наличием маркеров стромальных клеток (CD105, CD90, CD73, CD29) и активно пролиферирующих клеток, CD117 (c-kit). Также при характеристике КСК выявляются черты, присущие эндотелиальным клеткам: экспрессия фактора вон Виллебранда (vW), производство белков экстраклеточного матрикса (фибронектина, коллагенов I и IV типа), сродство к изолектину В4, формирование капилляроподобной структуры в тесте на матригеле. Трансплантацию клеток в миокард проводили в культуральной среде (группа I) и в фибриновом матриксе (группа II) для улучшения фиксации клеток в ткани. Клетки (КСК-Luc) были модифицированы трансдукцией лентивирусной конструкции pLentiPGK V5-LUC Neo, несущей ген фермента люциферазы. Проведена селекция меченых клеток с помощью антибиотика G418. Активность люциферазы в клеточных экстрактах регистрировали на приборе WALLAC 1420 MULTILABEL COUNTER.

Была подтверждена линейная зависимость активности люциферазы в экстрактах клеток от их количества, что позволило провести количественную оценку эффективности трансплантации и приживления КСК-Luc. Было показано, что в первые 48 ч. после трансплантации КСК-Luc в обеих группах пролиферируют, но клетки в составе тромбинового матрикса делают это более интенсивно ($168,00 \pm 8,43\%$ относительно исходного количества) по сравнению со «свободными» клетками ($119,75 \pm 11,67$). Дальнейшее наблюдение показало, что в обеих группах животных происходило снижение количества КСК-Luc в миокарде. На 14 день наблюдения количество КСК-Luc, трансплантированных в фибриновом матриксе, составляло менее 2% от исходного. В миокарде крыс I группы трансплантированные клетки в количестве 2% выявлялись на сроке наблюдения 10 дней. Известно, что трансплантация стромальных клеток мезенхимального происхождения оказывает значительный терапевтический эффект за счет паракринных факторов. Таким образом, пролонгированность пребывания трансплантированных КСК, обеспеченное фибриновым матриксом, будет способствовать более длительному воздействию паракринных факторов на ремоделирование миокарда после ишемического поражения, в т.ч. усилению ангиогенеза и уменьшению фиброза.

Проект поддержан программой фундаментальных исследований СО РАН № II.2П «Интеграция и развитие» 2016 г. № II.2П/VI.62-3.

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА СОДЕРЖАНИЕ BDNF И HSE В ГИППОКАМПЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В ПЕРВЫЙ МЕСЯЦ ПОСЛЕ РОЖДЕНИЯ

Морозова А.Ю.^{1*}, Журавин И.А.², Арутюнян А.В.¹, Милютин Ю.П.¹, Морозова П.Ю.³

1 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

2 Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*e-mail: amor2703@gmail.com

В настоящее время проблема ранней диагностики и определения гипоксических поражений ЦНС в период эмбрионального развития приобрела большую актуальность. Известно, что пренатальная гипоксия запускает целый каскад патологических процессов, развитие которых приводит к гибели нервных клеток в основном путем апоптоза. Одновременно с активацией индукторов апоптоза при гипоксии происходит образование эндогенных нейропротекторов (BDNF, NGF), что ведет к формированию восстанавливающих механизмов. Считается, что BDNF реализует свое действие через генетические механизмы торможения апоптоза. Известно, что нейронспецифическая енолаза (HSE) характеризует мембранные функции гематоэнцефалического барьера, т.к. постепенная гибель нейронов при нейродегенерации приводит к выходу нейронспецифических ферментов и их изоферментов. Из поврежденных клеток они попадают во внеклеточную среду, что позволяет определить структурно-функциональные нарушения биомембран в ЦНС. Цель данной работы заключалась в оценке влияния пренатальной гипоксии на содержание BDNF и HSE в гиппокампе (Hr) и сыворотке крови крыс на 1-й, 10-й и 30-й дни жизни. В ходе работы использовалась модель гипобарической пренатальной гипоксии, которой подвергались животные на 14 день беременности. Содержание BDNF и HSE определялись методом иммуноферментного анализа сэндвичевого типа. Показано, что после пренатальной гипоксии происходит снижение содержания BDNF в Hr крыс: на 1-й день жизни в 1.7 раз, на 10-й день жизни в 2.2 раза по сравнению со значениями контрольной группы животных, аналогичные изменения наблюдаются у крыс на 30-й день жизни, а именно данный показатель снижается в 1.3 раза. Содержание HSE в Hr снижается на 1-й, 10-й, 30-й дни жизни в 1.3, 3.2 и в 2.3 раза по сравнению с контролем в те же дни постнатального развития. При сравнении содержания BDNF в сыворотке крови контрольных крыс и животных, перенесших пренатальную гипоксию, наблюдалось повышение на 1-й и 30-й дни жизни (в 3 и 2 раза, соответственно). Аналогичные изменения были выявлены в содержании HSE. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что пренатальная гипоксия может приводить к отставанию развития синапсов, нарушению целостности структуры мембран нейрональных клеток, а также к нарушению их развития в раннем онтогенезе. Кроме того, можно предположить о возможности использования рассмотренных нами белков в качестве показателей функционального нарушения ЦНС у новорожденных детей, которые испытывают тяжелые гипоксические поражения ЦНС в период внутриутробного развития.

ВЛИЯНИЕ АНИЗОТРОПИИ ВОЗБУДИМОСТИ КЛЕТОК НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОЛНЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ В МОНОСЛОЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ

Низамиева А.А.*, Калита И.Ю., Цвеляя В.А., Кудряшова Н.Н., Агладзе К.И.

Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

*e-mail: nizamieva@phystech.edu

Сердечные аритмии являются одной из самых распространенных причин смерти в мире, поэтому изучение механизма их образования — одна из приоритетных задач современной науки. Данная работа посвящена созданию моделей сердечных аритмий, в частности модели образования спиральной волны. В качестве одной из экспериментальных моделей сердца для исследования аритмий используется конфлюэнтный монослой кардиомиоцитов. В данной работе использовалась первичная культура неонатальных кардиомиоцитов, которая в последствии формировала электромеханический синцитий. Для наблюдения распространения волн использовался метод оптического картирования с применением Ca-зависимого красителя Fluo-4. Для создания регулируемой анизотропии в наших экспериментах использовалось фотосенсибильное вещество класса азобенzenов — азотаб ((2-{4- [(E)-2-(4-этоксифенил) диазен-1-ил] фенокси} этил) триметиламмония бромид). В темновом, термически релаксированном состоянии, или в состоянии, достигаемом синим светом ($\lambda > 440$ нм), транс-изомер азотаба обратимо снижает спонтанную активность и уменьшает скорость распространения волн возбуждения вплоть до полной блокады. Волны возбуждения могут быть возобновлены путем облучения ближним УФ ($\lambda \approx 365$ нм), который переводит азотаб в цис-форму. Управление таким способом степенью возбудимости сердечной ткани позволяет создавать различные модели сердечных аритмий. В данной работе были созданы две основные модели: модель однонаправленного блока и модель с градиентом возбудимости.

Модель однонаправленного блока представляет из себя систему с различной степенью возбудимости. У освещенных ультрафиолетом областей порог активации возбуждения ниже, чем у неосвещенных или освещенных слабее, поэтому при создании резкого градиента УФ (при определенных концентрациях азотаба) волна возбуждения проходит из неосвещенной области в освещенную, а обратно нет. Данная модель напоминает поведение полупроводникового диода и описывает основной механизм образования спиральной волны. Модель распространения спиральной волны в градиенте возбудимости на монослое кардиомиоцитов основывалась на граничных степенях возбудимости, выявленных в первой модели. Например, при засветке UV 18% интенсивности скорость проведения волны возбуждения падала в два раза относительно 100% засветки. Спиральная волна, образованная в таком градиенте возбудимости, чаще дрейфовала в сторону меньшей возбудимости.

Теоретические расчеты, сделанные на модели Алиева-Панфилова, при разнице в скоростях в 2 раза показали тот же результат.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ miRNA С mRNA ГЕНОВ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Ниязова Р.Е.* , Иващенко А.Т., Атамбаева Ш.А., Пыркова А.Ю.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: raiguln@mail.ru

В mRNA 185 генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, только в mRNA 61 генов для 2564 miP найдены 304 сайта связывания miRNA. Из них 95 сайтов расположены в CDS, 50 находятся в 5'UTR и 169 сайта имеются в 3'UTR. Из базы данных по miRNA, участвующих в развитии инфаркта миокарда, ни одна из miRNA не имела сайтов связывания в mRNA 185 генов. Возможно, эти miRNA действуют на mRNA генов, которые не вошли в базу генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда. Это предположение требует проверки.

Среди mRNA 61 генов мишеней некоторые могут связывать пять и более miRNA. По пять miRNA связываются с mRNA генов *LRP1*, *LRP8*. По семь miRNA связываются с mRNA генов *CYP1A2* и *DNASE1*. Девять miRNA связывается с mRNA гена *CCL5* и *SP1*. Эти данные свидетельствуют о сильной зависимости экспрессии этих генов от miRNA. mRNA генов *TFAM* и *SP1* имеют множественные сайты связывания miR-466, которая относится к классу уникальных miRNA. mRNA гена *ADRB1* имеет множественные сайты связывания miR-3960, которая тоже относится к классу уникальных miRNA. mRNA генов *CD40LG*, *CDKN2B* и *IGF* имеют множественные сайты связывания miR-574-5p, относящейся к классу уникальных miRNA. Выявлена новая miRNA (miR-762), которая имеет множественные сайты связывания с mRNA гена *CDKN1C*. Ранее нами было показано, что в геноме человека кодируются уникальные miRNA, которые имеют более 300 сайтов связывания. К числу таких miRNA относятся miR-619, miR-5095, miR-5096, miR-3960, miR-1322 и некоторые miRNA из семейства miR-1273. Экспрессия значительной части генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, может зависеть от этих уникальных miRNA. Например, miR-619-5p имеет 14 генов-мишеней, miR-5585-3p имеет 12 генов-мишеней, miR-5095 и miR-5096 имеют восемь и шесть генов мишеней соответственно. Семейство miR-1273a,c,d,e,f,g,h имеет 34 сайтов связывания, включая 19 сайтов связывания miR-1273g-3p в mRNA 14 генов.

Некоторые miRNA имеют большую свободную энергию связывания с mRNA нескольких генов. miR-1273d, miR-4758-5p и miR-4763-5p связываются с mRNA генов *PPIA*, *NFKB1* и *SH2B1* со свободной энергией связывания, равной 125 kJ/mole, что составляет 88-94% от максимальной свободной энергии связывания этих miRNA. miR-1226-5p, состоящая из 26 н., связывается с mRNA гена *ALDH2* со свободной энергией связывания, равной 127 kJ/mole, что составляет 86% от максимальной свободной энергии связывания. miR-1183, состоящая из 27 н., связывается с mRNA гена *THBS1* с свободной энергией связывания, равной 132 kJ/mole, что составляет 90% от максимальной свободной энергии связывания. miR-6089-5p, состоящая из 24 н., связывается с mRNA генов *ADAM8* и *TFAM* с свободной энергией связывания равной, 132 kJ/mole, что составляет 89% от максимальной свободной энергии связывания. Эта же miRNA связывается с mRNA гена *IL6R* с свободной энергией связывания, равной 138 kJ/mole, что составляет 93% от максимальной свободной энергии связывания. Приведенные данные показывают, что взаимодействие рассмотренных miRNA и mRNA может служить основой для выбора ассоциаций miRNA и mRNA для диагностики инфаркта миокарда. Под ассоциацией понимается связь одной miRNA с mRNA одного или нескольких генов либо одной или нескольких miRNA с mRNA одного гена.

БИМЕДИЦИНСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ АЛЬБУМИНА В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

Серченя Т.С.^{1*}, Ольшевская И.В.², Нечесова Т.А.³, Свиридов О.В.¹

1 Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

2 Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

3 РНПЦ «Кардиология», Минск, Беларусь

*e-mail: serchenya@iboch.bas-net.by

В результате исследования разработан новый диагностический набор реагентов для измерения микроколичеств альбумина в моче человека методом конкурентного иммуноферментного анализа для *in vitro* диагностики микроальбуминурии. Микроальбуминурия является маркером эндотелиальной дисфункции, отражает ранние стадии поражения почек у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и сахарным диабетом и является предиктором неблагоприятного прогноза этих заболеваний у данной категории пациентов. Разработанный набор реагентов характеризуется широким диапазоном определяемых концентраций (0,5-300 мг/л) и высокой аналитической чувствительностью (0,3 мг/л), «открытие» и «линейность» находятся в диапазоне 85-115%, коэффициент вариации не превышает 10%. Анализ проходит в одну стадию и не требует предварительного разведения исследуемых проб. Для установления клинико-диагностических характеристик набора были проведены сравнительные медико-биологические исследования. В работе использовали значительную выборку проб пациентов с установленным диагнозом заболеваний сердечно-сосудистой системы (n=136), которые находились на лечении в кардиологических отделениях ГУ РНПЦ «Кардиология». Средний возраст обследуемых составил $55,9 \pm 2,4$ лет, мужчины — 68 человек и женщины — 68 человек. 126 пациентов находились на обследовании по поводу артериальной гипертензии (АГ), из них у 15 пациентов была АГ I степени, у 82 человек — АГ II степени и у 29 пациентов — АГ III степени. Степень АГ устанавливали согласно Рекомендациям Европейского общества по АГ (2003 г.). У 10 пациентов был установлен диагноз ишемической болезни сердца (ИБС), который верифицировался по данным нагрузочных проб. В качестве исследуемого материала использовали утреннюю порцию мочи. Для проведения анализа отбирали по 20 мкл образцов, в пробы не добавляли консерванты и стабилизаторы. Наличие альбумина в моче в диапазоне 20-200 мг/л диагностировали как микроальбуминурию. В результате исследования установлено, что частота встречаемости микроальбуминурии у пациентов с АГ повышается по мере увеличения ее степени и в группах с АГ II и III степени составила 15,9 и 20,7%, соответственно. В группе пациентов с АГ I степени отсутствовали пробы с уровнем альбумина более 20 мг/л. Распространенность повышенного содержания этого белка у пациентов с ИБС составила 20%. При этом средняя концентрация альбумина у обследуемых пациентов в случае нормоальбуминурии увеличивалась в ряду АГ I – АГ II – АГ III – ИБС и составила 6,2, 7,1, 8,1 и 9,2 мг/л, соответственно. По результатам биомедицинских исследований распространенность микроальбуминурии во всей группе пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями была 15,4%, что согласуется с имеющимися данными по частоте встречаемости микроальбуминурии у пациентов с контролируемой АГ. Тенденция к увеличению содержания альбумина в моче в зависимости от степени АГ при нормоальбуминурии подтверждает значимость этого маркера для оценки прогрессирования сосудистых изменений и установления сердечно-сосудистых рисков.

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД В ОЦЕНКЕ И КОНТРОЛЕ ФИЗИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

Пиянзин А.И.^{1,2*}, Понькина Е.В.¹

1 Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

2 Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

*e-mail: bio777777@mail.ru

Физическое развитие детей является важным показателем роста и формирования организма, используется при комплексной оценке состояния здоровья каждого ребенка или детского коллектива, контроле клинических испытаний лекарственных препаратов и разрабатываемых программ питания. Нормативы физического развития основываются на следующих методах: метод индексов (весо-ростовые соотношения), процентильный (центильный) метод — вероятностное распределение в процентных интервалах), метод регрессионного анализа (расчет коэффициента регрессии массы тела по длине тела). Все перечисленные подходы в оценке физического развития имеют те или иные преимущества и недостатки. Основной недостаток этих методов — отсутствие прогноза изменений антропометрических параметров для отдельно взятого ребенка. В связи с этим одной из актуальных задач современной педиатрии является разработка методов индивидуальной характеристики физического развития детей и подростков. Изучение закономерностей роста и развития детей является комплексной научной проблемой, которая должна решаться совместно с врачами-педиатрами, антропологами, математиками, специалистами по информационным технологиям и др. Физическое развитие ребенка является протекающим во времени процессом. Возрастные антропометрические показатели детей (рост, вес и др.) можно рассматривать как временной ряд. Использование методов прогнозирования временных рядов позволяет выполнить анализ траектории физического развития ребенка и оценить перспективы на краткосрочный период.

Пациенты и методы. База данных сформирована из антропометрических данных детей, не имеющих значительных отклонений здоровья, и детей с эндокринными и онкологическими заболеваниями. В качестве базового метода анализа и прогнозирования траектории физического развития ребенка рассматривается метод эмпирической спецификации и идентификации трендов с последующей экстраполяцией тренда на краткосрочный и среднесрочный периоды. Анализ и прогнозирование временных рядов показателей физического развития детей проводился с помощью электронных таблиц Excel 13.0. С помощью метода наименьших квадратов строилась линия тренда. Дополнительно анализировалась линия скользящего среднего, величина достоверности аппроксимации.

Полученные результаты. Аprobация выбранного нами подхода с использованием реальных данных физического развития детей показала его работоспособность и достаточную высокую точность прогнозирования.

Заключение. Мониторинг динамики физического развития ребенка позволяет спрогнозировать возможные дальнейшие отклонения антропометрических показателей ребенка, назначить соответствующие профилактические мероприятия. Междисциплинарный подход к решению медицинской задачи анализа, контроля и прогнозирования физического развития детей создает условия для повышения эффективности работы врача-педиатра и является перспективным для персонализированной медицины.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА ДЛЯ ТЕРАПИИ ХСН ДО И ПОСЛЕ КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ЭРИТРОПОЭТИНОМ

Чернявский А.М.¹, Повещенко О.В.^{1,2*}, Лыков А.П.^{1,2}, Бондаренко Н.А.^{1,2}, Суровцева М.А.^{1,2}, Ким И.И.^{1,2}, Фомичев А.В.¹

1 ННИИПК им. ак. Е.Н.Мешалкина, Новосибирск, Россия

2 ФГБНУ НИИКЭЛ, Новосибирск, Россия

*e-mail: poveshenkoov@yandex.ru

Клеточные технологии с использованием аутологичных костномозговых стволовых/прогениторных клеток (СПК) являются альтернативным способом лечения пациентов с ишемической болезнью (ИБС) и хронической сердечной недостаточностью (ХСН), так как способствуют улучшению перфузии миокарда и увеличению фракции выброса левого желудочка. Основной проблемой трансплантации СПК в органы является степень приживаемости их в месте введения. Цель исследования – оценить морфофункциональные свойства СПК до и после кратковременной инкубации с эритропоэтином. Работа выполнена с соблюдением принципов ВМА (2013). Клетки костного мозга получали от 14 пациентов с ИБС и ХСН II-III класса (NYHA) при помощи пункции гребня подвздошной кости. Обогащенную фракцию СПК получали центрифугированием на градиенте плотности фиколл/верографина. Прекондиционирование СПК с эритропоэтином проводили в культуральных флаконах с добавлением 10% аутологичной сыворотки в течение 40 минут при 37⁰С в СО₂-инкубаторе. Фенотип СПК до и после кондиционирования с эритропоэтином проводили на проточном цитометре "FACS CantoII" (BD, США) с использованием коммерческих моноклональных антител к CD34, CD45, CD133, KDR (VEGFR₂), CD184 (BD, США) и к рецептору эритропоэтина, меченных FITC, PE, APC. Апоптоз СПК изучали с использованием Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection kit (BD, США). Нахождение СПК в фазах клеточного цикла изучали с использованием PI (BD, США). Пролиферативный потенциал оценивали в МТТ-тесте. Показано, что в трансплантате присутствуют не только гемопоэтические стволовые клетки, но и эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК), экспрессирующие не только CD34, но и CD133, KDR. Кроме того, в трансплантате содержатся «более зрелые» ЭПК с фенотипом CD31. Показано, что СПК экспрессируют хоуминг-рецептор (CXCR4, CD184), а также рецептор к эритропоэтину. После прекондиционирования СПК с эритропоэтином отмечено значимое увеличение экспрессии хоуминг-рецептора и рецептора к эритропоэтину на СПК по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$). Прекондиционирование СПК с эритропоэтином значимо способствовало уменьшению количества апоптотических клеток и возрастанию количества клеток в G₀G₁ и M фазах клеточного цикла ($p < 0,05$). Нами не выявлено значимых различий пролиферативного потенциала СПК до и после кондиционирования клеток с эритропоэтином как спонтанного, так и антиген- или митоген-стимулированного. Таким образом, что клеточный трансплантат пациентов с ХСН содержит не только гемопоэтические стволовые клетки, но и эндотелиальные прогениторные клетки на разных стадиях цитодифференцировки, экспрессирующие хоуминг-рецептор и рецептор к эритропоэтину. Прекондиционирование СПК с эритропоэтином способствует усилению уровня экспрессии рецептора к эритропоэтину на клетках, снижению апоптоза и увеличению митоза, что указывает на высокую вероятность приживания данных клеток в месте их введения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ (номер проекта 16-15-00057).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СПИРТОВ НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОЛНЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ В МОНОСЛОЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ ЖЕЛУДОЧКОВЫХ МИОЦИТОВ КРЫС

Подгурская А.Д.*, Цвеляя В.А., Крашенинникова А.В., Слотвицкий М.М., Кудряшова Н.Н., Агладзе К.И.

Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный, Россия

*e-mail: alisapodgurskaya@mail.ru

Широкий спектр химических соединений и лекарственных средств обладает потенциальным кардиотоксическим эффектом; особую роль в данном ряду занимают спирты. Показано, что употребление этанола в больших количествах является основной причиной развития кардиомиопатии, в то время как лежащий в основе этого механизм остается малоизученным. Тем не менее в исследованиях на изолированных кардиомиоцитах было выявлено, что этанол ингибирует потенциал-зависимые ионные каналы (быстрые натриевые, кальциевые L-типа и каналы транзитного выходящего калиевого тока). Гептанол используется электрофизиологами в качестве ингибитора щелевых контактов. Таким образом, целью данной работы являлось исследование скоростей распространения волны возбуждения и предельно усваиваемых частот в монослое неонатальных желудочковых миоцитов крыс в зависимости от добавленных концентраций этанола и гептанола. Так, в экспериментах с этанолом и гептанолом скорость распространения волны возбуждения убывала экспоненциально при концентрациях от 0.05 до 1.8 мМ. В экспериментах с гептанолом наблюдался блок проводимости при 1.8 мМ, что подтверждает его разобщающую роль для клеток. В отличие от этанола, при высоких (0.8-1.4 мМ) концентрациях которого скорость распространения волны возбуждения падала в 5 раз по сравнению с нормальными условиями. Соответственно, значительно уменьшалась длина бегущего импульса, и, следовательно, уменьшался размер, необходимый для существования реентри. Значения предельно усваиваемых частот также убывали при увеличении концентрации этанола: при 0.8-1.4 мМ более чем на 60%. Таким образом, этанол может обладать проаритмогенным действием.

ЭНДОТЕЛИЗАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ПРОТЕЗОВ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА, ИЗГОТОВЛЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА

Степанова А.О. *, Рассказов Г.А., Лактионов П.П.

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия
2 ННИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

*e-mail: alena.o.lebedeva@gmail.com

Необходимым условием нормального функционирования в организме тканеинженерных протезов сосудов, и особенно не склонных к стенозированию протезов сосудов малого диаметра, является формирование на внутренней поверхности протеза нормального эндотелия (Melchiorri, 2013). Для формирования такого слоя необходимо обеспечить эффективную адгезию и пролиферацию клеток эндотелия (и клеток предшественников) на поверхности протеза. Кроме того, для получения протезов, заселенных клетками эндотелия, необходим биореактор и протоколы заселения, культивирования эндотелиоцитов на внутренней стенке протеза.

На модели первичных эндотелиоцитов из пупочной вены человека (HUVES) нами оптимизирован состав 3D матриц, используемых для изготовления сосудистых протезов, разработан и изготовлен биореактор для культивирования клеток, оптимизированы условия заселения и культивирования HUVES на внутренней поверхности протезов в биореакторе.

3D матрицы и протезы сосудов внутренним диаметром 1,8 мм были изготовлены методом электроспиннинга из раствора поликапролактона (ПКЛ) с желатином в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол. Данные об эффективности адгезии и жизнеспособности клеток на поверхности матриц с разной концентрацией желатина продемонстрировали, что оптимальной подложкой для эндотелиоцитов являются матрицы из ПКЛ с 10% желатина, обработанные глутаровым альдегидом. Скорость оседания и адгезии эндотелиоцитов (10^6 клеток/мл, высота столба 6 мм) на поверхности культурального пластика и 3D матриц определяли методом световой и флуоресцентной микроскопии. Показано, что скорость оседания составляет 50 кл/мин·мм², клетки начинают формировать контакты с подложкой уже через 10 мин. после посева и полностью адгезируют через 45 мин. Для культивирования эндотелиоцитов на внутренней стенке протезов сосудов сконструирован и изготовлен биореактор, устанавливаемый в чашку Петри 100×100×16 мм (Sarstedt), с электромагнитными приводами мембранного насоса и узла вращения протеза сосуда. Исполнительные устройства приводятся в действие блоком электромагнитов, который устанавливается в CO₂-инкубатор и управляется внешним программируемым контроллером. Отработана стадия равномерного заселения стенки протеза клетками, которая включает вращение протеза на ¼ оборота каждые 30 секунд в течение первого часа и на ¼ оборота каждые 5 мин. в течение 5 ч. После заселения HUVES культивировали в потоке культуральной среды (60 мкл/0,3 сек, 1 цикл включает 3 включения мембранного насоса и вращение на ¼ оборота в течение 2 мин). Показано, что при культивировании в таких условиях клетки равномерно заселяют стенку протеза, причем в режиме вращения длинная ось клеток ориентирована перпендикулярно, а в режиме прокачивания — вдоль оси протеза.

Таким образом, изготовлены 3D матрицы и протезы сосудов, пригодные для культивирования эндотелиальных клеток, разработан и изготовлен биореактор для получения клеточно-наполненных тканеинженерных конструкторов, отработаны условия получения сосудистых протезов с эндотелиальным слоем на внутренней поверхности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-15-00493.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА МОДИФИКАЦИИ ГЕНОМА CRISPR-CAS9 ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК СО СЛОЖНЫМ КАРИОТИПОМ

Карагяур М.Н.¹, Васильев П.А.¹, Дыйканов Д.Т.¹, Рысенкова К.Д.¹, Семина Е.В.², Рубцов Ю.П.¹

1 МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

2 Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Минздрава РФ, Москва, Россия

e-mail: darth_max@mail.ru

CRISPR-Cas9 — это революционный подход, позволяющий быстро и достаточно точно модифицировать геном эукариотических клеток. Эту систему с успехом используют для нокаута генов в линейных клетках с целью создания удобных модельных систем для изучения роли отдельных белков или РНК в жизнедеятельности клетки. Несмотря на быстроту и удобство модификации геномов клеточных линий, нередко возникают осложнения, связанные с тем, что для популярных линий иммортализованных или трансформированных клеток характерен неустойчивый переменный кариотип. Это приводит к тому, что выбранный для модификации ген может быть расположен не на двух хромосомах, а представлен большим числом копий (вплоть до 5) из-за переменного числа хромосом. Поэтому при создании клеточных моделей с выключенными генами возникает необходимость более строгого контроля степени модификации генома, а, кроме того, возникает потребность в повторной модификации с целью увеличения процента клеток, в которых произошла модификация выбранного участка геномной ДНК. В связи с этим потенциально может увеличиваться пропорция клеток, в которых нуклеаза Cas9 расщепляет ДНК не в месте выбора, а в других, нежелательных местах (т.н. off-target активность).

В представленной работе мы использовали CRISPR-Cas9 для получения линий клеток с нокаутами отдельных генов. Мы исследовали эффективность модификации при трансфекции линейных клеток конструкциями, кодирующими направляющие РНК к различным генам. При этом мы определяли процент клеток, которые потеряли способность синтезировать белковые продукты, число модифицированных копий нокаутируемых генов, а также частоту появления наиболее вероятных побочных модификаций генома. В результате мы разработали оптимизированную методику, позволяющую уменьшить время и усилия необходимые для получения нокаутных линий клеток со сложным кариотипом, обеспечивающую минимальное число нежелательных модификаций генома.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ HBcAg, ЭКСПОНИРУЮЩИХ ИМИТАТОРЫ ЭПИТОПА, УЗНАВАЕМЫЕ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИМ АНТИТЕЛОМ VRC01

Рудометов А.П.*, Чикаев А.Н., Карпенко Л.И.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

*e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Коровый белок вируса гепатита В (HBcAg) рассматривается как одна из перспективных систем презентации чужеродных эпитопов для создания высокоиммуногенных вакцин. HBcAg состоит, в среднем, из 200 идентичных белковых субъединиц размером 21 кДа, которые обладают способностью самоорганизовываться в коровую частицу. Стоит также отметить качества HBcAg, удобные для биотехнологических работ: высокий уровень экспрессии гена HBcAg и правильная самосборка в коровые частицы природной формы в различных системах экспрессии (как прокариотических, так и эукариотических). При этом самосборка HBc-белка в вирусоподобные частицы возможна при отсутствии других вирусных компонентов и не требует процессинга.

Для встройки в HBcAg были выбраны имитаторы эпитопа, узнаваемые антителом VRC01, которое способно нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1 разных субтипов. Эпитоп, узнаваемый данным антителом, перекрывается с областью CD4bs поверхностного белка gp120 ВИЧ-1 и сформирован дискретным набором аминокислотных остатков, т.е. является конформационным. Ранее с помощью аффинной селекции из библиотек бактериофагов были отобраны фаговые клоны, экспонирующие на своей поверхности пептиды, специфично связывающиеся с VRC01. Пептиды, входящие в состав фаготопов, которые обладали наибольшей аффинностью к VRC01, было решено использовать для встраивания в HBcAg. В качестве вектора, несущего ген С, была использована плазида рUCHVc. Встройку олигонуклеотидов, кодирующих пептиды-имитаторы ВИЧ-1, проводили в область, соответствующую 81 а.о. HBcAg, (район главной антигенной детерминанты кора e1). Наличие олигонуклеотидных вставок было подтверждено рестрикционным анализом и секвенированием. Полученные рекомбинантные белки, содержащие пептиды-имитаторы эпитопа, узнаваемого VRC01, были охарактеризованы в вестерн-блот анализе и ИФА с использованием моноклональных антител (МКА) VRC01 и МКА к HBcAg.

Химерные белки на основе HBcAg были наработаны в препаративном количестве и очищены для проведения иммунизации лабораторных животных с целью оценки их способности индуцировать ВИЧ-1-нейтрализующие антитела. С помощью ИФА было показано наличие антиген-специфических антител в сыворотках иммунизированных животных. Планируется исследование вируснейтрализующей активности сывороток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-14-00660.

УЧАСТИЕ УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И В РЕГУЛЯЦИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ НЕЙРОНОВ

Рысенкова К.Д.^{*}, Климович П.С., Семина Е.В., Рубина К.А., Ткачук В.А.

ФГБОУ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: karina_ry@mail.ru

Активация урокиназной системы, которая включает в себя сериновую протеазу урокиназу (uPA) и урокиназный рецептор (uPAR), обеспечивает ремоделирование внеклеточного матрикса при регенерации сосудов и нервов. Связываясь на поверхности клеток с uPAR, uPA активирует плазминоген, запуская каскад протеолитических реакций, что приводит к локальному разрушению белков внеклеточного матрикса и высвобождению связанных в матриксе факторов роста, а также активирует внутриклеточную сигнализацию, стимулируя миграцию и пролиферацию клеток. В регуляции направленного роста аксонов участвуют навигационные молекулы, рецепторы хемокинов и факторов роста, экспрессируемые на конусе растущего аксона. На сегодняшний день урокиназную систему относят к навигационным молекулам, она участвует в процессах морфогенеза при регенерации нервов, однако ее роль в дифференцировке и выживаемости нейронов до конца не ясна.

В данной работе мы исследовали влияние uPAR на активацию внутриклеточной сигнализации, дифференцировку и выживаемость клеток нейробластомы Neuro2a. Дифференцировка Neuro2a в нейроны достигалась культивированием клеток в среде с пониженным содержанием сыворотки. Оказалось, что экспрессия uPAR зависит от времени инкубации в дифференцировочной среде: чем дольше по времени происходила дифференцировка клеток в нейроны, тем выше была экспрессия uPAR. Максимальная экспрессия uPAR отмечалась через 72 ч. после индукции дифференцировки и достигала разницы в 50% по сравнению с исходным уровнем экспрессии. uPAR на мембране нейронов со-локализовался с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), одним из важнейших маркеров дифференцировки, при этом при гиперэкспрессии uPAR увеличивалась его со-локализация с EGFR. Мы предположили, что uPAR играет важную роль в дифференцировке нейронов. Известно, что для поддержания дифференцированного состояния нейронов важен высокий уровень фосфорилирования EGFR. Маркером дифференцировки нейронов является ядерный белок NeuN. Несмотря на то, что экспрессия uPAR не влияла на экспрессию белков EGFR и NeuN, тем не менее блокирование физиологической активности uPAR антителами приводило к быстрому снижению уровня фосфорилирования EGFR (уже через 5 мин.), а на более отдаленных сроках подавляло экспрессию NeuN (через 24 ч). Кроме того, блокирование uPAR активировало EGFR-зависимую внутриклеточную сигнализацию в нейронах с участием MAP киназы p38 и киназы Akt, а также снижало фосфорилирование киназы Erk1/2. Поскольку известно, что сигнализация в нейронах с участием p38, Akt и Erk1/2 влияет на жизнеспособность клеток и стимулирует апоптоз, мы оценивали пролиферацию и деградацию ДНК в дифференцированной Neuro2a. Оказалось, что блокирование uPAR приводит к почти 4-х кратному снижению пролиферации клеток. При изучении механизма этого явления было обнаружено, что снижение пролиферации сопровождается разрушением ДНК и ограниченным протеолизом фермента PARP-1 с появлением фрагмента 89 кДа, свидетельствующего об апоптотической гибели клеток.

Таким образом, в данном исследовании впервые показана роль uPAR в поддержании дифференцированного состояния нейронов. Мы обнаружили, что выживаемость нейронов зависит от активности uPAR, который поддерживает нейроны в дифференцированном состоянии, как на уровне регуляции внутриклеточной сигнализации, так и на уровне экспрессии маркеров дифференцировки. Блокирование uPAR снижает пролиферацию нейронов и индуцирует в них апоптоз.

Сазыкина С.М.*, Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

*e-mail: sazykina.93@mail.ru

Папаин (КФ 3.4.22.2) — протеолитический фермент, содержащийся в плодах папайи. Энзим относится к цистеиновым протеазам. Молекулярная масса — 23 кДа. Молекула фермента состоит из 212 аминокислотных остатков, где N-концевым остатком является изолейцин, C-концевым остатком — аспарагин. Он находит широкое применение в медицине, пищевой промышленности (например, создание на их основе антигельминтных препаратов, используется при заболевании желудочно-кишечного тракта, обладает ранозаживляющими свойствами). Учитывая важную роль протеолитических ферментов в процессах белкового обмена в клетках растений, изучение механизма действия УФ-света на биосистемы остается актуальной задачей и позволяет выявить механизмы деструктивно-модифицирующего, регуляторного и лечебно-профилактического эффекта УФ-излучения. Цель работы — изучить процессы УФ-индуцированных изменений функциональных свойств папаина.

В качестве объекта исследования нами был выбран папаин фирмы Sigma. Определение количества белка в препаратах и их активности осуществляли модифицированным методом Лоури. УФ-облучение растворов белков проводили в дозах 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м².

Установлено, что при УФ-облучении папаина в дозе 453 Дж/м² наблюдается уменьшение активности фермента на 32% по сравнению с контрольным образцом. При дальнейшем повышении дозы облучения, энзим сохранял свою активность на относительно постоянном уровне. Обсуждается механизм реализации описанных эффектов действия УФ-света.

Список литературы

1. Холявка М.Г., Нарожная М.Н., Останкова И.В., Артюхов В.Г. Исследование УФ-индуцированных изменений структурно-функциональных свойств инулиназ // Радиационная биология. Радиозкология. 2015. Т. 55, № 4. С. 436-441.
2. Артюхов В.Г. Биофизика / учебник для вузов – Москва: Академический Проект; Екатеринбург: Деловая книга, 2009. – 294 с.
3. Mayur G. Sankalia. Papain Entrapment in Alginate Beads for Stability Improvement and Site-Specific Delivery: Physicochemical Characterization and Factorial Optimization Using Neural Network Modeling / Mayur G. Sankalia et al. // AAPS PharmSciTech, 2005. № 6 (2). p. 209-222.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ НА ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ В ТРАВМИРОВАННОМ СПИННОМ МОЗГЕ КРЫС

Санатова Э.Р.*, Салафутдинов И.И., Романова Ю.Р., Лайков А.В., Мухамедшина Я.О.

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

*e-mail: elyaelya18@gmail.com

Актуальность. Травматическое повреждение спинного мозга запускает целый каскад неблагоприятных реакций, включающих апоптоз, окислительный стресс, изменения в метаболизме, дезинтеграцию цитоскелета и прочее. Существует множество белков, реагирующих на травму спинного мозга (ТСМ), и знание их влияния на указанные выше процессы представляет особый интерес для прогнозирования возможности посттравматической регенерации. Исследования временных и количественных изменений в белковом профиле травмированного спинного мозга при применении различных терапевтических подходов для регенерации спинного мозга дает нам возможность оценить их эффективность.

Цель исследования — оценить влияние однократной трансплантации в область повреждения генетически модифицированных клеток микроглии на изменение биосинтеза белковых продуктов в травмированном спинном мозге.

Материалы и методы. Для оценки протеомного профиля белков в травмированной ткани проводили дозированную контузионную ТСМ крысы (порода Wistar, самцы) на уровне Th8. Сразу после нанесения повреждения опытным крысам (n=6) вводили клетки микроглии, трансдуцированные Ad5-EGFP (1 млн в 5 мкл DPBS), в область травмы при помощи гамильтоновского шприца (Sigma). Животным контрольной группы (n=6) после нанесения травмы трансплантацию клеток не проводили. Через 30 суток после нанесения травмы животных наркотизировали и забирали фрагмент СМ в области повреждения. Аналогичным образом забирали материал от интактных животных той же породы, пола и веса. В исследовании использовали разностный двумерный гель электрофорез (2D DIGE) для разделения белков ткани мозга, отдельные, варибельные белковые пятна вырезались, трипсинизировались и картировались (peptide mass fingerprinting) с использованием масс-спектрометра ultrafle Xtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker).

Результаты. После окраски гелей азотнокислым серебром выявлено порядка 520 белковых пятен в каждом геле, полученном из образцов интактного и травмированного спинного мозга (контрольная группа). В ходе анализа вырезанных и трипсинизированных белковых пятен с использованием масс-спектрометрии идентифицировано 45 белков, имеющих как повышенную, так и пониженную концентрацию в области ТСМ при сравнении с интактным спинным мозгом. Оценка изменения протеомного профиля травмированного спинного мозга крыс на фоне трансплантации клеток микроглии показала изменения в экспрессии 120 белков, из которых было идентифицировано 11 белков, экспрессия которых повышается, и 14 белков, имеющих противоположный тренд в области травмы на 30 сутки.

Выводы. В посттравматическом периоде на 30 сутки наблюдаются изменения в экспрессии белковых продуктов как оказывающих положительное влияние на исход травматических повреждений, так и отрицательное. При применении клеточной терапии (клетки микроглии) наблюдается повышение экспрессии белков регенерации и понижение экспрессии белков деградации нервной ткани.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-4020.2015.7).

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ НИКЕЛИД-ТИТАНОВЫХ САМОРАСШИРЯЮЩИХСЯ СТЕНТОВ С ПЕРИФЕРИЧЕСКИМИ СОСУДАМИ В ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ У ЖИВОТНЫХ

Сергеевичев Д.С.^{1*}, Лотков А.И.², Чепелева Е.В.¹, Козырь К.В.¹, Коробейников А.А.¹, Кашин О.В.², Байструков В.И.¹, Зубарев Д.Д.¹, Кретов Е.И.¹

1 ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия

2 ФГБУН Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

*e-mail: d_sergeevichev@meshalkin.ru

Внутрисосудистое стентирование артерий при атеросклеротическом поражении является одним из самых часто выполняемых вмешательств в сердечно-сосудистой хирургии на сегодняшний день. Большинство стентов изготавливают из различных сплавов нержавеющей стали, применяют также и другие металлы: тантал, нитинол — сплав никеля и титана. Разработка и изучение свойств стентов с улучшенными свойствами из различных материалов с новыми видами покрытий являются важной задачей современной науки. В данной работе изучали структуру и свойства саморасширяющихся стентов из никелида титана, подвергнутых плазменно-иммерсионной ионной модификации кремнием, а также оценивали биосовместимость при имплантации стента в организм экспериментальных животных (мини-свиней).

В пилотном эксперименте исследовали 2 группы животных по 3 мини-свиньи в каждой: опытной группе в общую сонную артерию имплантировали экспериментальный образец стента из никелида титана, модифицированный кремнием, контрольной группе — коммерчески доступный аналог из нитинола без обработки. Эндоваскулярную имплантацию проводили миниинвазивным способом с помощью сосудистого доступа через бедренную артерию под рентгеноскопическим контролем. Через 3 месяца после оперативного вмешательства животным выполняли контрольную ангиографию и ультразвуковое исследование для оценки гемодинамики в области имплантации.

В ходе пилотного исследования было установлено, что у животных, которым был имплантирован стент с модифицированным покрытием, скорость потока в артерии и градиент давления в проксимальной зоне имплантации были ниже, чем у контрольной группы. Можно сделать вывод, что иммерсионно-плазменная обработка никелид-титановых стентов в большей степени способствует сохранению проходимости периферических сосудов, чем использование обычных нитиноловых стентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта ФЦП № 14.578.21.0118, уникальный идентификатор проекта RFMEFI 57815X0118.

SIRT1 И PPAR γ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ РЕГУЛЯЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА МАКРОФАГОВ

Стафеев Ю.С.^{1,2*}, Юнусова В.А.^{1,2}, Меньшиков М.Ю.¹, Парфенова Е.В.^{1,2}

1 Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва, Россия

2 МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: yuristafeev@gmail.com

Макрофаги представляют собой клетки миелоидной линии, для которых характерна высокая гетерогенность и пластичность. Одним из свойств, обуславливающих пластичность макрофагов, является их способность к изменению фенотипа в провоспалительном (M1) и противовоспалительном (M2) направлениях. Многие заболевания (ожирение, атеросклероз и др.) связаны с развитием латентного воспаления, которое обусловлено привлечением макрофагов в ткань и их поляризацией по M1-фенотипу, поэтому поиск мишеней для изменения соотношения M1 и M2 макрофагов в тканевых популяциях является важной научной задачей.

В нашей работе была проведена поляризация макрофагов RAW264.7 по M1- и M2-фенотипу по стандартной методике (с использованием бактериального липополисахарида (50 нг/мл) и интерферона γ (20 нг/мл) (M1-стимуляция) и с использованием интерлейкина-4 (50 нг/мл) (M2-стимуляция)). Полученные популяции охарактеризованы морфологически и с использованием ПЦР в реальном времени. В ходе работы была оценена экспрессия генов-маркеров *TNF α* , *CXCL11*, специфических для M1-макрофагов, и генов-маркеров *IGF-1*, *ALOX15*, специфических для M2-макрофагов. В качестве активатора PPAR γ использовали препарат группы тиазолидиндионов розиглитазон, а в качестве активатора сиртуина 1 типа (SIRT1) — новый синтетический активатор DCHC (3-(2,4-дихлорфенил)-7-гидрокси-4H-хромен-4-он). Методом МТТ выявили рабочую концентрацию используемых лигандов, провели поляризацию макрофагов в присутствии лигандов и охарактеризовали полученные популяции методом ПЦР в реальном времени по экспрессии генов-маркеров, указанных выше.

В ходе работы было показано, что розиглитазон и DCHC не оказывают значимого влияния на жизнеспособность клеток линии RAW264.7. В ходе характеристики поляризованных макрофагов показано, что M1-макрофаги, поляризованные в присутствии DCHC и розиглитазона, обладают сниженным уровнем экспрессии провоспалительных маркеров (*TNF α* , *CXCL11*), а также обладают повышенным уровнем экспрессии противовоспалительных маркеров (*IGF-1*, *ALOX15*), что согласуется с данными литературы о ингибиторном воздействии сиртуина 1 типа, а также транскрипционного фактора PPAR γ на основной воспалительный транскрипционный фактор NF- κ B. Таким образом, сиртуин 1 типа и PPAR γ являются перспективными мишенями для создания противовоспалительной терапии, которая может применяться в формате комбинированной терапии для лечения заболеваний, сопряженных с латентным воспалением.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-07840.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ САЙТОВ 2'-О-МЕТИЛИРОВАНИЯ РНК ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Степанов Г.А.^{1*}, Журавлев Е.С.^{1,2}, Филиппова Ю.А.¹, Тикуннов А.Ю.¹, Кулигина Е.В.¹, Семенов Д.В.¹, Рихтер В.А.¹

1 ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

Зрелые формы разных классов РНК эукариот содержат в своем составе многочисленные модифицированные по азотистым основаниям или остатку рибозы «неканонические» нуклеотиды. Пост-транскрипционные модификации некодирующих РНК важны для формирования «правильной» пространственной структуры молекул РНК и межмолекулярных взаимодействий и, в дальнейшем, для функционирования сложных надмолекулярных комплексов. Недавние исследования показали, что глубина модификации нуклеотидов в составе как мРНК, так и нкРНК может носить динамический характер (Chan et al., 2010; Zhou et al., 2015). Одной из наиболее распространенных модификаций нуклеотидов нкРНК является метилирование по 2'-О-положению рибозы. В частности, в структуре рибосомных РНК человека известно порядка 100 консервативных сайтов 2'-О-метилирования.

Метод терминации обратной транскрипции является одним из наиболее часто используемых подходов к выявлению 2'-О-метилированных нуклеотидов в протяженных РНК. Стандартная методология предполагает проведение реакции обратной транскрипции с радиоактивно меченым праймером и разделение кДНК-продуктов в полиакриламидном геле с последующей радиоавтографией.

В настоящей работе было предложено два варианта модификации данного метода с целью разработки подходов к количественной оценке глубины 2'-О-метилирования отдельных нуклеотидов в составе протяженных РНК. Во-первых, была проведена адаптация метода к использованию 5'-флуоресцентно меченных праймеров с последующим анализом продуктов терминации обратной транскрипции на автоматическом ДНК-анализаторе (Филиппова Ю.А. и др., 2015). Предложенный подход позволяет не только выявлять сайты, но и проводить относительную оценку глубины 2'-О-метилирования, таким образом получая более полную информацию о распределении модифицированных мономеров в структуре протяженных участков (до 300-500 н.) РНК-матрицы. Во-вторых, был предложен подход двухстадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с «повышенной» (>1,0 мМ) концентрацией дНТФ на первой стадии, позволяющий определять глубину 2'-О-метилирования отдельных нуклеотидов в составе РНК-матрицы. С использованием такого подхода была проведена оценка глубины модификации нескольких природных сайтов 2'-О-метилирования 28S и 18S рРНК человека: G1490 18S рРНК, C3820 и C4506 28S рРНК. Оба разработанных подхода исключают необходимость проведения рутинных стадий секвенирующего электрофореза в полиакриламидном геле и радиоавтографии, что расширяет возможности использования методов выявления сайтов 2'-О-метилирования РНК в биомедицинских исследованиях. Возможность количественной оценки глубины пост-транскрипционных модификаций РНК открывает новые перспективы для характеристики клеточных моделей и диагностики заболеваний человека.

Работа поддержана грантами РФФИ № 16-04-01414, №16-34-60136 и Стипендией Президента РФ молодым ученым (2063.2015.4).

ИЗМЕНЕНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИПОКСИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ CoCl_2

Сульдина Л.А.^{1*}, Захарова И.С.¹, Стригина Е.В.², Шевченко А.И.¹, Киселева Е.В.¹

1 Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: suldinalubov@gmail.com

Влияние гипоксии на поддержание плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) является одним из актуальных вопросов клеточных технологий. На ранних этапах гипоксии подавляется O_2 -зависимый протеолиз, и происходит активация белка HIF1 α (Semenza, 2001), выступающего регулятором транскрипции множества генов, в том числе кодирующих митохондриальные белки (Hwang et al, 2015). В настоящей работе с помощью методов электронной микроскопии и морфометрического анализа исследовано влияние CoCl_2 (50 мкмоль/л), стабилизирующего белок HIF1 α , на общую морфологию ЭСК человека (линия HuES9) и структурную организацию митохондрий на разных этапах инкубации (0, 1, 2, 3 пассажи). В исходных ЭСК с типичной для плюрипотентных клеток организацией выявлено 2 типа сгруппированных вблизи ядер митохондрий: с плотным (19% органелл) и светлым (81%) матриксом, популяция которых состояла из двух групп органелл, отличающихся по содержанию узких и расширенных крист. На 0 пассаже (2 дня культивирования в присутствии CoCl_2) в клетках отмечалось более дисперсное расположение митохондрий и возрастало число аутофагических вакуолей. На последующих (1-3) пассажах увеличивалась плотность ядрышек, количество мелких прозрачных пузырьков и коротких цистерн шероховатого и гладкого ЭПР, возрастала активность аппарата Гольджи, что указывало на начальные этапы дифференцировки клеток (Park et al., 2004). Анализ динамики структурной организации митохондрий показал, что на 0 пассаже плотные митохондрии практически исчезали. В популяции светлых митохондрий доля органелл, содержащих преимущественно тонкие кристы, увеличивалась по сравнению с 52% в контроле до 79%, а на последующих (1, 2, 3) пассажах уменьшалась и составляла 77%, 53% и 33% соответственно. Численная плотность узких крист в митохондриях на 0 пассаже увеличивалась, а расширенных уменьшалась в 1,3 раза по сравнению с контролем. К 3 пассажиру численная плотность тонких крист в митохондриях снижалась в 2 раза, что позволяет предполагать увеличение их функциональной активности (Perkins, Elisman, 2011). Относительный объем крист в митохондриях уменьшался в 1,5 раза по сравнению с контролем на 0 пассаже и на последующих не изменялся. Поверхностная плотность крист в митохондриях оставалась постоянной на всех пассажах. Было выявлено 3 типа структурных дефектов митохондрий: выпячивание оболочки, нарушение строения крист, появление разреженных участков в матриксе. На 0 пассаже число митохондрий с нарушенной структурой снижалось и повышалось на последующих этапах культивирования.

Таким образом, кратковременное (2 дня) воздействие гипоксии, вызванной инкубацией с CoCl_2 , снижает гетерогенность популяции митохондрий в ЭСК человека, поддерживает их морфологию, специфичную для неактивного состояния, а также уменьшает частоту возникновения структурных нарушений. Более длительное воздействие гипоксии вызывает появление признаков начинающейся дифференцировки.

Работа поддержана бюджетным финансированием проект №0324-2015-003.

ВЛИЯНИЕ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ И ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И МИГРАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Суровцева М.А.*, Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Ким И.И., Повещенко О.В.

ФГБНУ НИИКЭЛ, Новосибирск, Россия

*e-mail: mfelde@ngs.ru

Введение. Обогащенная тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma, PRP) является аутогенным источником факторов роста. При активации тромбоцитов (лизис мембраны, ионами кальция, тромбином) из альфа-гранул высвобождается большое количество ростовых факторов (PDGF, IGF, EGF, TGF, HGF и др.), которые оказывают влияние на функциональные свойства мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). ММСК являются привлекательным источником клеток для регенеративной медицины, потому что эти незрелые клетки присутствуют во многих органах и тканях организма. **Цель исследования** — оценить влияние PRP и лизата тромбоцитов на пролиферативную и миграционную активность ММСК костного мозга (КМ-ММСК) крысы в режиме реального времени. **Материалы и методы.** КМ-ММСК получали из клеток костного мозга бедренных костей крыс породы Wistar по стандартной методике и культивировали в стандартных условиях. Обогащенную тромбоцитами плазму получали из периферической крови здоровых доноров после центрифугирования в специальных пробирках (Plasmolifting™) на центрифуге Ева-200 (Hettich, Германия) в режиме 3800 об/мин 6 минут. Из обогащенной тромбоцитами плазмы готовили лизат тромбоцитов путем двукратного замораживания (-70°C) – быстрого оттаивания (+37°C). Пролиферативную и миграционную активность ММСК изучали на аппарате xCELLigence System (Roche, США), который позволяет в режиме реального времени оценить функциональную активность клеток. Результаты представлены клеточным индексом (КИ). **Собственные результаты.** КМ-ММСК под влиянием PRP и лизата тромбоцитов начинают адгезироваться к поверхности планшета и пролиферировать уже в первые часы эксперимента (3-6 часов). К 12 ч. эксперимента спонтанная пролиферативная активность КМ-ММСК была выше ($p=0,03$) по сравнению с пролиферацией клеток в присутствии PRP и лизата тромбоцитов. Через 18 ч. эксперимента показатели спонтанной и в присутствии PRP пролиферативной активности становятся практически одинаковыми (КИ=0,17 и КИ=0,18, соответственно). К концу эксперимента пролиферативная активность КМ-ММСК статистически значимо увеличилась под действием PRP (КИ=0,2, $p=0,03$) по сравнению со спонтанной пролиферацией (КИ=0,14) и пролиферацией в присутствии лизатов тромбоцитов (КИ=0,07). Отмечено, что к 15 ч. эксперимента миграционная активность КМ-ММСК увеличивалась в присутствии лизатов тромбоцитов (КИ=0,22, $p=0,02$) по сравнению с контролем (КИ= -0,03) и PRP (КИ=0,01). При этом к 21 ч. эксперимента миграционная активность КМ-ММСК в присутствии лизатов тромбоцитов и PRP была одинаковой (КИ=0,32), что статистически значимо выше по сравнению с показателями в контроле (КИ=0,02, $p=0,03$). К концу эксперимента отмечена тенденция того, что миграционная активность КМ-ММСК увеличилась под действием PRP (КИ=0,39), что сопоставимо с действием лизатов тромбоцитов (КИ=0,34). Таким образом, было выявлено, что на пролиферативную активность КМ-ММСК наибольшим стимулирующим действием обладает PRP. В свою очередь, на миграционную активность КМ-ММСК большим стимулирующим эффектом обладают и PRP, и лизат тромбоцитов, который, в свою очередь, способствует стимуляции миграции клеток в более ранние сроки, начиная с 9 ч. эксперимента.

РОЛЬ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ ФИБРОБЛАСТОВ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Суховских А.В.*, Григорьева Э.В.

Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики,
Новосибирск, Россия

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: anastasia-suhovskih@mail.ru

Рак предстательной железы — одна из самых распространенных причин смертности от онкологических заболеваний у мужчин, что часто связано с крайне агрессивным течением заболевания и быстрым метастазированием опухоли. В связи с этим поиск молекулярных маркеров рака предстательной железы является актуальной задачей. В последние годы все более очевидной становится роль микроокружения опухоли, молекулярные компоненты которого могут служить как диагностическими или прогностическими маркерами, так и мишенями для таргетной терапии. Цель данной работы — изучение роли молекул межклеточных контактов во взаимодействии опухолевых клеток предстательной железы человека с фибробластами в экспериментальной системе *in vitro*. Были использованы иммортализованные фибробласты человека, нормальные эпителиальные клетки предстательной железы человека PNT2 и гормон-независимые метастазирующие опухолевые клетки PC3. Уровень экспрессии 84 генов, вовлеченных в различные типы межклеточных контактов (фокальные, плотные, щелевые, адгезивные контакты, десмосомы, полудесмосомы), с использованием Finder array был определен в нормальных и опухолевых клетках предстательной железы и фибробластах до и после совместного культивирования с помощью Human Cell Junction Pathway. Совместное культивирование нормальных клеток предстательной железы PNT2 с фибробластами не приводит к значительным изменениям транскрипционной активности генов межклеточных контактов, что согласуется с визуальным отсутствием конфронтации между этими типами клеток. Однако в клетках PC3 после совместного культивирования с фибробластами происходит увеличение экспрессии генов, отвечающих за различные типы межклеточных контактов, в особенности фокальные контакты, плотные соединения и адгезивные контакты. В свою очередь, нормальные и опухолевые эпителиальные клетки предстательной железы оказывали значительное влияние на фибробласты в плане транскрипционной активности генов, вовлеченных в поддержание межклеточных контактов, и это воздействие было прямо противоположным. После культивирования с нормальными клетками PNT2 в фибробластах наблюдается повышение уровня экспрессии генов, вовлеченных в фокальные контакты, адгезивные контакты и, в наибольшей степени, плотные контакты. Напротив, совместное культивирование с опухолевыми клетками PC3 приводило в фибробластах к селективному подавлению экспрессии генов, участвующих в фокальных, адгезивных и плотных контактах. Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что опухолевые клетки предстательной железы человека способны значительно подавлять транскрипционную активность генов, вовлеченных в поддержание межклеточных контактов, в прилегающих фибробластах, что может приводить к нарушению контактного торможения и способствовать ускоренной пролиферации опухолевых клеток. Такое снижение экспрессии ключевых молекул межклеточных контактов в клетках опухолевого микроокружения может быть использовано в качестве потенциального диагностического и/или прогностического биомаркера для диагностики и таргетной терапии данного типа рака.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЦИТОХРОМА P450 CYP1A1 (ILE462VAL) У ПОТОМКОВ СМЕШАННЫХ БРАКОВ ТУНДРОВЫХ НЕНЦЕВ С РУССКИМИ

Табиханова Л.Э.^{1*}, Осипова Л.П.^{1,2}, Чуркина Т.В.¹, Воронина Е.Н.^{2,3}, Филипенко М.Л.^{2,3}

1 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

2 Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

3 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: tabikhan@bionet.nsc.ru

В среду обитания человека попадают новые химические вещества (ксенобиотики), многие из которых являются потенциальными канцерогенами и мутагенами. В связи с этим они могут рассматриваться в качестве серьезных факторов, способствующих развитию ряда онкологических и других мультифакториальных заболеваний. Важнейшую роль в защите организма от этих вредных веществ играют ферменты системы биотрансформации ксенобиотиков, в том числе семейство цитохромов P450 (CYP). В данной работе был исследован полиморфизм гена цитохрома P450 *CYP1A1* — вариант *CYP1A1*2C* (*Ile462Val*, rs1048943). В результате этой замены активность фермента повышается в два раза, что приводит к накоплению реактивных интермедиатов и резко увеличивает возможность мутационных изменений ДНК и химически индуцируемого канцерогенеза. Исследования распространенности варианта *CYP1A1 462Val* проведены во многих мировых популяциях, в том числе и у коренных жителей Сибири: нганасан Таймыра и тундровых ненцев Ямало-Ненецкого АО (Тийс и др., 2016). Было показано, что у ненцев частота аллеля *CYP1A1 462Val* равна 23,8 %, что достоверно выше ($p < 0,001$), чем в выборке русских Северной Сибири — 5,8 %. Довольно широкое распространение данного варианта у аборигенов Сибири указывает на наличие популяционного риска развития заболеваний, в патогенезе которых может принимать участие *CYP1A1*2C* (*Ile462Val*, rs1048943), особенно в связи с усиливающимся промышленным загрязнением среды обитания. В настоящее время наблюдается увеличение числа браков между коренными жителями Сибири и пришлым населением, поэтому изучение у метисов полиморфизма генов ферментов системы биотрансформации ксенобиотиков представляется актуальным. Нами изучено 155 потомков 1-го и 2-го поколений от смешанных браков ненцев с русскими. Генотипирование проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Частота варианта *462Val* в метисной выборке составила 18,7%. Таким образом, генофонд потомков смешанных браков ненцев с русскими отличается от родительских популяций, и в настоящей выборке можно предположить понижение риска развития ряда заболеваний, ассоциированных с изучаемым вариантом *Ile462Val* гена цитохрома P450 *CYP1A1*.

Поддержано программой Сибирского отделения РАН II.2. № 0324-2015-0033.

Тийс Р.П., Осипова Л.П., Чуркина Т.В. и др. Полиморфизм гена цитохрома P450 *CYP1A1* (*ILE462VAL*) в популяциях тундровых ненцев Ямало-Ненецкого автономного округа, нганасан Таймыра и русских Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016; 20(1):16-22. DOI 10.18699/VJ16.102

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ОТОТОКСИЧЕСКОЙ ПОТЕРИ СЛУХА, ПРИ НАЗНАЧЕНИИ АНТИБИОТИКОВ ИЗ ГРУППЫ АМИНОГЛИКОЗИДОВ, ПУТЕМ ИНГИБИРОВАНИЯ ГИСТОННОЙ ДЕАЦЕТИЛАЗЫ

Донковцева Е.С., Ташметов Э.Р.*, Лялина Е.И.

Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Республика Казахстан

*e-mail: tashmetov.e@gmail.com

Распространенность потери слуха в зарубежных странах и в странах СНГ в настоящее время по разным оценкам составляет в среднем 1 случай на 5 человек в возрасте старше 12 лет [Павлюшина, 2007; Liu, 2012].

Аминогликозиды являются одними из наиболее часто используемых антибиотиков во всем мире несмотря на серьезные побочные эффекты, такие как ототоксичность и нефротоксичность, возникающие при лечении аминогликозидами. Воздействие аминогликозидов приводит к высвобождению цитохрома *C* из митохондрий и активации каспазы, что позволяет предположить, что волосковые клетки внутреннего уха подвергаются каспаза-опосредованной гибели [Chen, 2009]. Кроме того, аминогликозиды, действуя на волосковые клетки, повышают деацетилирование гистонов путем рекрутирования гистондеацетилаз (*HDACs*) в хроматин [Абакаров, 2005; Huangfu, 2008; Kim, 2010].

Ингибиторы широкого спектра, а также *HDAC*-специфические ингибиторы в известной степени в зависимости от концентрации обладают защитными свойствами, что было изучено на примере экспериментальной модели воспаления, нейродегенерации и окислительного стресса [Layman, 2015; Lin, 2011; Liu, 2012]. Однако изучение ингибиторов *HDAC* в системе внутреннего уха у млекопитающих ограничено за счет неспособности их проникать через гемато-лабиринтный барьер и вызывать ототоксичность.

В отчете, опубликованном в *Cell Death Discovery*, были приведены экспериментальные данные системного применения ингибитора *HDAC* и субероиланилид гидроксамовой кислоты (SAHA), которые показали эффективность прохождения гемато-лабиринтного барьера и безопасность влияния на порог слуха у взрослых мышей [Robert, 2012]. При системном лечении SAHA была зарегистрирована практически полная защита волосковых клеток внутреннего уха от острого ототоксического повреждения (канамицин + фуросемид). Интересно, что лечение SAHA коррелирует с ацетилированием *RelA K310* и локализацией *RelA* в ядре волосковых клеток, которые обычно отсутствуют при лечении аминогликозидами. Ацетилированный *RelA K310* в ядрах волосковых клеток вызывает активацию *NF-kB* пути, приводящую к экспрессии генов про-выживаемости, таких как *Cflar (cFLIP)* и *Bcl2l1 (Bcl-XL)* [Robert, 2012]. Согласно другим нейропротекторным исследованиям, экспрессия генов *CDKN1A (p21)* и *Hspa1a (Hsp70)* также была увеличена в организме мышей с применением SAHA. В то же время экспрессия гена *Bcl2l1* про-апоптоза (*BIM*) была значительно снижена [Robert, 2012]. Также по данным упомянутого исследования, ингибирование *HDAC* не способствует регенерации волосковых клеток у взрослых мышей.

Заключение. На сегодняшний день препарат субероиланилида гидроксамовой кислоты (SAHA) является FDA-одобренным препаратом, его применение в клинической практике для предотвращения ототоксического действия может быть следующим шагом на пути защиты органов слуха у людей, особенно в практике педиатрической службы.

РАЗЛИЧИЯ В КОНТРОЛЕ АПОПТОЗНОЙ ГИБЕЛИ ИНФИЦИРОВАННЫХ МИКОБАКТЕРИЯМИ КЛЕТОК-ХОЗЯЕВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ МЫШЕЙ *EX VIVO* И *IN VITRO*

Уфимцева Е.Г.

ФГБНУ НИИ биохимии, Новосибирск, Россия

e-mail: ufim1@ngs.ru

В настоящее время туберкулез остается одной из значимых проблем здравоохранения во всем мире. По данным ВОЗ в 2014 г. зафиксировали 9 млн. случаев заболевания туберкулезом, около 1.5 млн. больных умерло. Прогрессирующее увеличение числа случаев заражения антибиотико-устойчивыми штаммами *Mycobacterium tuberculosis* является отрицательной тенденцией последних лет, требуя развития новых лекарств. Микобактерии туберкулезного комплекса являются внутриклеточными патогенами макрофагов человека и животных. Следовательно, необходимо создание моделей туберкулезной инфекции, наиболее приближенных к организму млекопитающих, для разработки и тестирования новых антимиkobактериальных средств на основе знания специфики взаимодействий микобактерий с клетками-хозяевами. В настоящее время гибель макрофагов с локализованными в них микобактериями по механизмам апоптоза считается одним из основных способов контроля организма человека и животных за туберкулезной инфекцией, уменьшающей количество патогенных микроорганизмов и инфицированных ими клеток. Исследование динамики взаимоотношений между микобактериями и клетками-хозяевами показало их значительное отличие в гранулематозных воспалительных образованиях мышей в разработанной нами модели гранулем *ex vivo* (Ufimtseva, 2013, 2015) по сравнению с обычно используемой в мировой практике *in vitro* инфекцией перитонеальных макрофагов и клеток костного мозга мышей. Макрофаги гранулем мышей с латентной туберкулезной инфекцией могли контролировать размножение BCG-микобактерий как *in vivo*, так и в культуре *ex vivo*, с сохранением своей жизнеспособности даже при повышенной зараженности клеток. В макрофагах мышей в течение инфекции *in vitro* выявили, наоборот, значительный рост числа BCG-микобактерий, сопровождавшийся повышенной гибелью клеток-хозяев с морфологическими признаками как апоптоза, так и некроза (Ufimtseva, 2016). Гранулемы легких, селезенки и костного мозга мышей Balb/c с латентной BCG-туберкулезной инфекцией проанализировали *ex vivo* на наличие индукторов и ингибиторов, а также маркеров апоптозной гибели клеток. В клетках гранулем при повышенном содержании индуктора апоптоза TNF α , проапоптозных белков Bax и Bad, рецептора смерти Fas/CD95 и скэвинджер-рецептора CD36 не наблюдали ни стабилизации белка P53, ни активации исполнительной каспазы-3 в макрофагах и дендритных клетках, как содержавших кислотоустойчивые бактерии, так их не имевших. Одновременно выявили значительное количество антиапоптозного белка Bcl-2 в цитоплазме и митохондриях большинства клеток мышинных гранулем, в отличие от макрофагов культур клеток костного мозга и перитонеального экссудата мышей, инфицированных BCG-микобактериями *in vitro*. Вероятно, белок Bcl-2 участвовал в сохранении жизнеспособности клеток гранулем не только в культуре *ex vivo*, но и в организме животных при значительном давлении микобактериальных, провоспалительных и проапоптозных факторов на разных этапах туберкулезной инфекции мышей. Таким образом, инфицирование клеток мышей в культуре *in vitro* и животных *in vivo* приводит к разному ответу макрофагов на инфекцию. Выявленные различия нельзя не учитывать при использовании модельных систем туберкулезной инфекции для тестирования и проверки действия новых антимиkobактериальных лекарственных средств и вакцин.

ФОТОКОНТРОЛИРУЕМЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АЗОБЕНЗОЛА И СТИЛЬБЕНА МОДУЛИРУЮТ ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС

Фролова Ш.Р.*, Гайко О., Цвеляя В.А., Агладзе К.И.

Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный, Россия

*e-mail: isheydi02@gmail.com

АзоТАБ (азобензол триметиламмоний бромид), производное азобензола, способен фотоконтролируемо изменять возбудимость культуры клеток неонатальных кардиомиоцитов. Энергетически устойчивая *транс*-форма азоТАБа способна подавлять спонтанную активность и скорость распространения волн возбуждения, в то время как *цис*-форма, энергетически менее стабильная, получаемая в результате облучения *транс*-азоТАБа мягким ультрафиолетом ($\lambda \sim 365$ нм), не оказывает каких-либо видимых изменений электрических свойств монослоев из неонатальных кардиомиоцитов. В результате перевода *транс*-азоТАБа в *цис*-азоТАБ возбудимость культуры кардиомиоцитов восстанавливается. Также восстановления возбудимости культуры кардиомиоцитов можно добиться отмывом азоТАБа от нее. Причем это свойство азоТАБа является обратимым, и такой цикл может быть повторен несколько раз. С целью уменьшения токсичности фотоконтролируемого вещества был синтезирован СТАБ (стильбен триметиламмоний бромид), производное стильбена. СТАБ структурно абсолютно идентичен азоТАБу, но является производным стильбена. По действию на культуру кардиомиоцитов в *транс*- и *цис*-форме он также подавляет возбудимость культуры клеток кардиомиоцитов, но при меньшей концентрации. И главное его отличие также в том, что после перевода *транс*-СТАБа в *цис*-форму блокада возбуждения сохраняется в отличие от *транс*-азоТАБа. Восстановить возбудимость культуры клеток возможно только в результате отмыва ее от *транс*-СТАБа.

Было проведено исследование влияния *транс*- и *цис*-форм азоТАБа и СТАБа на потенциалзависимые ионные каналы, участвующие в формировании потенциала действия. Целью работы было понять, является ли изменение проводимости кардиомиоцитов под действием фотоконтролируемых веществ (азоТАБа и СТАБа) опосредованным через модуляцию потенциалзависимых ионных каналов. Действие *транс*- и *цис*-форм азоТАБа и СТАБа на потенциалзависимые быстрый натриевый (I_{Na_v}), кальциевый L-типа (I_{Ca_v}) и калиевые (I_{K_v}) токи исследовались на изолированных неонатальных кардиомиоцитах с помощью метода пэтч-кламп в конфигурации whole-cell. В результате выяснили, что действительно под действием вышеуказанных веществ быстрый натриевый и кальциевый ток L-типа подавляется, а вот медленные калиевые токи, наоборот, увеличиваются. Причем полное подавление в случае азоТАБа происходит при концентрации 100 μ M, а в случае СТАБа при меньшей концентрации — 60 μ M. По данным исследования токсичности азоТАБа и СТАБа на кардиомиоциты в нашей лаборатории было выявлено, что токсичность на клетки СТАБа меньше азоТАБа, и у СТАБа она начинается после 100 μ M.

Результаты подтверждают наше предположение о том, что подавление возбудимости культуры клеток кардиомиоцитов происходит в результате подавления потенциалзависимых натриевого и кальциевого токов, которые отвечают за формирование потенциала действия. Так как процесс этот обратимый, а в случае СТАБа еще и варьированный в зависимости от того, какой эффект мы хотим закрепить (отмыть и восстановить возбудимость культуры клеток кардиомиоцитов или облучить мягким ультрафиолетом и закрепить блок проводимости в кардиомиоцитах), то эти вещества представляют интерес, например, для аблации.

БЕЗНАТРИЕВЫЕ ВОЛНЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ В МОНОСЛОЕ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ГИПЕРКАЛИЕМИИ

Цвеляя В.А.^{1*}, Крашенинникова А.В.², Кудряшова Н.Н.¹, Агладзе К.И.¹

1 Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

2 ФГБУ Центр экспертизы и контроля качества медицинской помощи Минздрава РФ, Москва, Россия

*e-mail: vts93@ya.ru

Ишемия в сердце может приводить к тяжелым последствиям, в том числе и к фибрилляции желудочков. При ишемии нарушается кровоснабжение, вследствие чего в пораженной области возникают гипоксия, ацидоз и гиперкалиемия. Возникшая аритмия, в дальнейшем, приводит к нарушению насосной функции, прогрессированию ишемии и, как следствие, смерти в течение нескольких минут. В данной работе мы ограничимся рассмотрением изменений в динамике волн возбуждения с помощью оптического картирования и компьютерного моделирования при гиперкалиемии, которая играет решающую роль в первые минуты развития ишемии.

Эксперимент проводился при низком уровне гиперкалиемии, менее 10 мМ калия в среде, и при высоком уровне гиперкалиемии, более 10 мМ до 20 мМ. В первом случае наблюдалось резкое падение скорости проведения волны возбуждения. Однако после 10 мМ скорость переставала изменяться. При ишемии такая концентрация калия может быть достигнута через 10 минут. Таким образом, при большой концентрации калия ткань все еще проводит электрическое возбуждение, хотя натриевые каналы должны быть полностью инактивированы. С помощью блокатора натриевых каналов (ТТХ) также было показано наличие проведения при сильной гиперкалиемии. Эти данные полностью соответствуют результатам компьютерного моделирования.

Таким образом, мы обнаружили существование безнатриевых волн возбуждения (англ. *excitation waves with calcium-current dominated upstroke*) при сильной гиперкалиемии (более 10 мМ K^+ во внеклеточной среде) в монослое кардиомиоцитов и подтвердили инактивацию натриевых каналов при помощи тетродотоксина (ТТХ).

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕОАНГИОГЕНЕЗА В ПЕРИТУМОРОЗНОЙ ЗОНЕ РАКА ПОЧКИ (ПО ДАННЫМ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРА ЭНДОТЕЛИЯ CD31)

Черданцева Т.М.^{1*}, Казарцев А.В.¹, Бобров И.П.², Климачев В.В.¹, Лазарев А.Ф.²

¹ Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

²Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул, Россия

*e-mail: cherdan.morf@yandex.ru

В последние годы выявлен целый ряд изменений, происходящих вблизи опухоли при раке различных локализаций. Показано, что перитуморозная зона (ПЗ) при многих злокачественных новообразованиях имеет важное биологическое значение. Изучение изменений тканей, граничащих с опухолью, важно для выявления фоновых процессов, способствующих развитию опухоли. Именно к этой зоне относится понятие «опухолевое поле», и в ней начинается рост опухоли, ПЗ также во многом способствует прогрессии уже возникшей опухоли.

Ангиогенез имеет важное значение для роста и распространения рака почки (РП). Однако при сложившемся мнении о прогностически неблагоприятном значении активного опухолевого ангиогенеза, влияние развития сосудистого русла в ПЗ на прогрессию рака почки изучено недостаточно.

Цель работы — исследование неоангиогенеза в ПЗ при раке почки.

Материал и методы. Изучен операционный материал 42 больных раком почки. При группировке опухолей по клиническим стадиям (I-IV) было выделено: I стадии (T1N0M0) соответствовали 22 (52,4%) наблюдения; II стадии (T2N0M0) — 1 (2,4%) наблюдение; III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) — 8 (19%) и IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, ТлюбаяN2M1, ТлюбаяNлюбаяM1) — 11 (26,2%). Степень злокачественности опухолей оценивали по Fuhrman S.A. и соавт (1982) [3]. Средний возраст пациентов составил $57,4 \pm 1,4$ года. Мужчин было 25 (59,5%), женщин — 17 (40,5%). В 1-ю группу вошли пациенты с опухолями степени злокачественности G1-2 и отсутствием метастазов. Во 2-ю группу были включены больные со степенями злокачественности G3-4. Применяли следующие методы исследования: морфологический, иммуногистохимический CD31 (клон JC70A «ДАКО») и статистический метод. Рассчитывали плотность микроциркуляторного русла (ПМЦР) в ПЗ в 6 полях зрения при увеличении микроскопа $\times 400$. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 6,0.

Результаты. Сосуды, расположенные вблизи опухоли, не имели мышечной оболочки, в них отсутствовала дифференцировка на артерии и вены. По данным иммуногистохимического выявления маркера CD31 в неизменной ткани почки, взятой из максимально удаленных от опухоли участков, число микрососудов колебалось от 12 до 104 (в среднем $47,8 \pm 1,3$). При этом в неизменных почках 1-ой группы больных ПМЦР составила $61,9 \pm 1,8\%$, а во 2-ой группе уменьшалась до $39,9 \pm 1,2$. ПМЦР в ПЗ на 1-ой группе пациентов составила $23,4 \pm 1,7$, а во 2-ой группе достоверно увеличивалось до $43,5 \pm 2,4$. ПМЦР в ПЗ взаимосвязаны степенью злокачественности опухоли ($r = 0,65$).

Выводы. Ангиогенез в ПЗ носит патологический характер. Активность ангиогенеза в ПЗ зависит от свойств опухоли и значительно возрастает в опухолях с высокзлокачественным потенциалом. ПМЦР в ПЗ коррелировала с важнейшим прогностическим параметром опухоли, и поэтому она может быть использована в качестве дополнительного фактора при прогнозировании лечения рака почки.

АКТИВАЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОГО ОТВЕТА В КЛЕТКАХ МАКРОФАГАЛЬНОЙ ЛИНИИ J774 ПРИ ИНКУБАЦИИ С ДЕКСТРАНОМ

Чечушков А.В.^{*}, Зайцева Н.С., Кожин П.М., Меньщикова Е.Б., Шкурупий В.А.

Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск, Россия

*e-mail: avchekhushkov@centercem.ru

Используемые в клинической практике для восполнения объема циркулирующей крови декстраны в настоящее время обнаруживают новые сферы применения. Так, гидрогели на их основе демонстрируют выраженную способность стимулировать регенерацию кожных покровов при терапии ожоговых ран. В то же время благодаря своей лизосомотропности и медленной скорости катаболизма лизосомальными ферментами млекопитающих декстраны могут быть использованы в качестве высокомолекулярной матрицы для конъюгирования с лекарственными соединениями, в частности с изониазидом при терапии туберкулеза. Однако внутриклеточные события, ассоциированные с накоплением декстрана, не известны.

Сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE координирует уровень экспрессии генов белков, участвующих в детоксикации ксенобиотиков, а также антиоксидантной защите клеток. Кроме того, она существенным образом вмешивается в метаболические процессы, главным образом, восстанавливая внутриклеточное содержание доноров электронов (NADH и NADPH), а также оказывает влияние на внутриклеточные репаративные процессы. Целью данной работы было исследование активации данной сигнальной системы при эндоцитозе декстрана с молекулярной массой 70 кДа клетками моноцитарно-макрофагальной линии J774.

Установлено, что эндоцитоз линейного декстрана с массой 70 кДа сопровождается дозозависимым увеличением ядерной транслокации транскрипционного фактора Nrf2. Одновременно наблюдается увеличение объема внутриклеточных агрегатов белка Keap1, являющегося репрессором Nrf2, что указывает на реализацию неканонического пути активации Nrf2. Анализ экспрессии ARE-зависимых генов демонстрирует увеличение экспрессии генов *Nqo1*, *Gstp1*, *Hmox1*, что указывает на увеличение транскрипционной активности Nrf2. Кодруемые этими генами ферменты, NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза 1 и гемоксигеназа 1, играют важную роль в защите клеток от перекисного окисления липидов мембран, а от активности глутатион-S-трансферазы P1 зависит редокс-потенциал клеток. Функциональная значимость экспрессии этих генов при эндоцитозе декстрана подчеркивается существенным снижением интенсивности процессов перекисного окисления липидов, происходящим через 24 ч. после нагрузки клеток декстраном.

Обнаруженные особенности внутриклеточного ответа на эндоцитоз декстрана позволяют утверждать, что в дополнение к использованию в качестве средства лизосомальной доставки лекарственных препаратов он может снижать токсические эффекты фармакологической терапии, активируя внутриклеточные системы антиоксидантной защиты. Индукция ARE-зависимых генов при лизосомотропном воздействии декстрана интересна также тем, что в генах мастер-регуляторов лизосомального биогенеза TFE3 и TFEB локализованы эволюционно консервативные регуляторные мотивы ARE, что указывает на связь сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и системы лизосомального биогенеза, биологический смысл которой, в то же время, пока не ясен.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ТЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА: КРИТИЧЕСКАЯ РОЛЬ КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Шварц Я.Ш.^{1,2*}, Белгородцев С.Н.³, Филимонов П.Н.², Чередниченко А.Г.², Петренко А.Е.²

1 ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины, Новосибирск, Россия

2 ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

3 Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза МЗ РФ, Новосибирск, Россия

*e-mail: yshschwartz@mail.ru

Одним из перспективных подходов к адьювантному лечению плохо поддающихся химиотерапии хронических инфекционных заболеваний может стать клеточная терапия с применением мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Примером такой инфекции является туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Существующий опыт применения МСК-терапии при инфекционных заболеваниях в целом, и при туберкулезной инфекции в частности, крайне ограничен и нуждается в экспериментальных обоснованиях.

Кондиционирование МСК в культуре может вызывать их фенотипическую поляризацию с проявлением преимущественно про- или антиинфекционной активности. В настоящей работе исследовали эффекты трансплантации происходящих из костного мозга первичных некондиционированных и поли(А:U)-кондиционированных МСК на течение микобактериальной инфекции *in vivo*. Кондиционирование проводили в течение 24 ч. на МСК третьего пассажа препаратом полудан (лиганд к TLR3 поли(А:U)) в дозе 1 мкг/мл. Мышей BALB/c инфицировали внутрибрюшинно *M. bovis* БЦЖ в дозе 1×10^7 КОЕ, далее двукратно спустя 11 и 12,5 нед. после инфицирования внутривенно вводили по 7×10^5 МСК и еще через 1,5 нед. выводили животных из эксперимента. На гистологических срезах легких, печени и селезенки, окрашенных гематоксилин-эозином и по Цилю-Нильсену, определяли выраженность неспецифической и специфической гранулематозной инфильтрации и численность микобактерий, подсчитывали количество КУМ(+) мазков-отпечатков этих органов, число микобактерия-положительных гомогенатов, инкубированных в системе ВАСТЕС MGI 960, и число КОЕ, выросших при посеве гомогенатов на среду Ловенштейна-Йенсена.

Иммуноферментный анализ продукции ИФН- γ , ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-10 и ТФР- β 1 в культуре МСК выявил отчетливое поли(А:U)-индуцированное смещение цитокинового профиля в провоспалительную сторону. Гистологическое исследование показало, что некондиционированные МСК вызывали 3-кратный рост количества микобактерий в гранулемах селезенки, тогда как кондиционированные МСК, наоборот, снижали количество микобактерий в БЦЖ-содержащих гранулемах. Введение некондиционированных МСК было ассоциировано с увеличением числа КУМ(+) и МГИТ(+) препаратов, тогда как все препараты от мышей, получавших кондиционированные клетки, были микобактерия-негативными. Аналогичным образом, некондиционированные МСК увеличивали количество КОЕ в исследуемых органах в 1,5-3 раза, в то время как полудан-кондиционированные МСК, наоборот, снижали численность микобактерий в органах более, чем в 4 раза.

Сделан вывод, что МСК-терапия микобактериальной инфекции и, очевидно, многих других инфекций может быть эффективной только при целенаправленном формировании функционального фенотипа МСК.

БИОСОКРАТИМЫЕ ТКАНЕВО-ИНЖЕНЕРНЫЕ МИКРОКОНСТРУКТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АВТОВОЛНОВЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ

Шутько А.В.^{*}, Горбунов В.С., Гурия К.Г., Агладзе К.И.

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

*e-mail: shutko.av@phystech.edu

Современные методы тканевой инженерии позволяют создавать различные модельные системы, используемые как для исследований биофизических процессов, развивающихся в сердечной ткани [1], так и в целях создания тест-систем для решения прикладных медицинских задач [2]. Стремительное развитие методов мягкой литографии в последние 20 лет существенно расширило возможности по созданию биосократимых микросистем и устройств [3,4]. Использование такого рода модельных систем открывает ряд новых возможностей для исследования автоволновых процессов в сократимых активных средах.

В настоящей работе было реализовано несколько вариантов биосократимых конструкторов на основе сердечной ткани. В качестве полимерной основы для микроконструкторов использовались тонкие пленки из полидиметилсилоксана (ПДМС) различной конфигурации. На полученные конструкции высевались неонатальные кардиомиоциты крысы. Затем клетки инкубировались в среде DMEM при 37°C в 5% атмосфере CO₂ до момента формирования конфлюэнтного монослоя и полного развития сократительного аппарата кардиомиоцитов. На полученных экспериментальных моделях методами оптического картирования исследовались задачи распространения волн возбуждения-сокращения в сердечной ткани.

Созданные нами биосократимые микроконструкторы представляются перспективными в качестве прототипов для создания систем микровакуляризации в тканевой инженерии, а также для изготовления различных lab-on-chip систем для тестирования лекарственных средств.

1. Kadota S. et al. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur. Heart J.* 34, 1147–56 (2013).
2. Benam KH et al., Engineered In Vitro Disease Models. *Annu Rev Pathol Mech Dis.*, 10(1), 195–262 (2015).
3. Camelliti P, Gallagher JO, Kohl P & McCulloch AD. Micropatterned cell cultures on elastic membranes as an in vitro model of myocardium. *Nat. Protoc.* 1, 1379–1391 (2006).
4. Feinberg, A. W. et al. Muscular thin films for building actuators and powering devices. *Science.* 317, 1366–1370 (2007).

NEURONAL CELL LINES AS A MODEL TO INVESTIGATE OCHRATOXIN A NEUROTOXICITY

Babayan N.^{1,3*}, Grigoryan R.¹, Sarkisyan N.¹, Malakyan M.¹, Stopper H.², Aroutiounian R.³

1 Institute of Molecular Biology, NAS RA, Yerevan, Armenia

2 Institute of Pharmacology and Toxicology, Wurzburg, Germany

3 Yerevan State University, Yerevan, Armenia

*e-mail: n_babayan@mb.sci.am

Mycotoxins cause neuropsychological impairment or mental and emotional disorders but the mechanism of neurotoxicity of certain mycotoxin remains unknown. Lately it was hypothesized that Ochratoxin A (OTA) is unlikely to act through a single, well-defined mechanism of action, but a network of interacting epigenetic mechanisms is involved in its toxicity (Marin-Kuan *et al.*, 2013). However, the correct model for risk assessment of mycotoxin neurotoxicity, including predictive test-systems, appropriate endpoints, extrapolation models from *in vitro/in vivo* data to human are not clearly identified, that hinder the comprehensive characterization of mycotoxins' hazard to humans. Regardless of endpoints it has been suggested that *in vitro* screens should include human neural cells to allow evaluation of interspecies differences. The reversible/irreversible effects should be also considered in evaluating of neurotoxicity (Balls and Walum, 1999). **The aim of the work** was the delineation of epigenetic, reversible/irreversible neurotoxic effects of OTA in neuronal cell lines derived from human or mouse organisms.

The human SH-SY5Y and mouse HT22 cell lines were selected as test-models. The epigenetic effect of OTA was assessed using methylation sensitive comet assay; the genotoxicity of OTA was tested using CBMN assay. The DHE assay and FPG-comet assays were used to study the OTA induced oxidative stress.

It was shown, that OTA does not induce DNA-damage at highest tested concentrations (10-30 μM) in both human (SHSY5Y) and mouse (HT22) neuronal cell lines. The cell viability tested in parallel experiment was 85-98% (SHSY5Y) and 95-99% (HT22). At the concentrations of 2.5-10 μM OTA induces epigenetic changes in mouse HT22 neuronal cells which bring to the increased level (up to 45%) of unmethylated CpG islands in DNA. Those epigenetic changes may affect genes responsible for oxidative stress, while the increased level of reactive oxygen species and oxidized purines were detected. All observed processes were reversible after single-dose treatment, but can be retained in a case of chronic exposure. OTA induced epigenetic changes were not revealed in human SH-SY5Y neuronal cells, but the low level and reversible oxidative stress was observed after single-dose treatment with OTA. So, human and animal neuronal cells have different sensitivity against mycotoxin-induced toxicity and careful data extrapolation should be performed when use only animal data.

References

- Balls M. and Walum E. In Neurotoxicology in Vitro. Pentreath V.W. (Edr), Taylor & Francis Press, Philadelphia, 1999; 269–283.
- Marin-Kuan M. *et al.*, Toxicon, 2008; 52:195–202.

The study was supported by the International Scientific-Technical Center (ISTC-2116) and Deutsche Akademische Austauschdienst (DAAD-RSUAS-2015).

Авторский указатель

Абрамова Т.О.	60
Абрамычева Н.Ю.	18
Аверьянов А.В.	13
Аветисян А.В.	8
Агафонов А.П.	9
Агладзе К.И.	116, 121, 138, 139, 143
Адылов Ш.Ф.	102
Ажикина Т.Л.	63
Айзенштадт А.А.	100, 102
Акулова А.П.	87, 105
Александрова А.	102
Александрова Л.	100
Алексеев С.Н.	23
Ананян Г.В.	106
Антоненко О.В.	65
Антонец Д.В.	12, 82
Антонов Е.В.	60
Антонова Л.В.	20, 46
Артемьева Л.В.	88
Артюхов В.Г.	107, 127
Арутюнян А.В.	115
Арутюнян Р.М.	10
Арутюнян С.Г.	106
Арутюнян Т.А.	10
Астахова Н.М.	89
Астрелина Т.А.	54, 97
Атамбаева Ш.А.	117
Багаева В.	102
Багинская Н.В.	11
Бажан С.И.	12
Баженова Е.Ю.	37
Байзитов Д.Р.	90
Байков И.К.	66
Байрамова С.А.	84
Байструков В.И.	129
Баклаушев В.П.	13
Бакулина А.Ю.	33
Баранов К.О.	21, 36
Барбараш Л.С.	20, 46
Барбараш О.Л.	20, 46
Бгатова Н.П.	43
Беклемишев А.Б.	95
Беловежец Т.Н.	21
Белокурова И.Б.	91, 94, 103
Белгородцев С.Н.	142
Бобкова Н.В.	8
Бобров И.П.	76, 140
Божкова С.А.	93
Божокин М.С.	93
Болдырева М.А.	94, 103

Бондаренко Д.А.	66
Бондаренко Н.А.	43, 95, 111, 120, 133
Борисов А.Г.	96
Брумберг В.А.	54, 97
Буздин А.А.	74
Бушманов А.Ю.	54, 97
Быкова И.В.	24
Быстрых О.А.	42
Бычков А.Л.	105
Валетдинова К.Р.	15
Васильев П.А.	123
Васькова Е.А.	16, 52
Васюков Г.Ю.	20
Великанова Е.А.	46
Вернер А.Э.	17
Ветчинова А.С.	18
Виноградов А.В.	104
Власов В.В.	63, 65
Волкова О.Ю.	21, 36
Волчо К.П.	37
Воронина Е.Н.	135
Вяткин Ю.В.	82
Гайко О.	138
Гайнер Т.А.	19
Гайнетдинов И.В.	63
Галембо И.	100
Гальбрайт Л.С.	110
Гао Ю.	98
Гилевич И.В.	23
Глушкова Т.В.	20, 46
Гнеденков С.В.	59
Голосова О.И.	24
Голубицкая Е.А.	79
Горбунов В.С.	143
Гормольцова Е.В.	77
Горчаков А.А.	21, 36
Гостев А.А.	98
Грехов Г.А.	24
Григорьева Е.В.	15, 22
Григорьева Э.В.	134
Гринчук Т.М.	100
Губарев К.К.	97
Губарева Е.А.	23
Гуменюк И.С.	23
Гурия К.Г.	143
Гусельников С.В.	21, 36
Далян Е.Б.	106
Данилова Ю.Э.	24
Деев С.М.	25
Дементьева Е.В.	26, 84
Денисова Н.П.	27
Дергилев К.В.	91

Дианов Г.Л.	112
Дмитриев А.Б.	27
Добровольская Е.И.	54, 97
Докукина Л.Н.	28
Долганова О.М.	99
Долгатов А.Ю.	76
Донковцева Е.С.	136
Донченко Н.А.	87, 105
Доронин И.И.	74
Дубовой А.В.	29
Дурнев А.Д.	30
Дуров О.В.	13
Дыйканов Д.Т.	123
Енукашвили Н.И.	100, 102
Еремеева Н.И.	69
Ефимов В.М.	60
Ефремов Я.А.	88
Жанатаев А.К.	30
Живень М.К.	32
Журавин И.А.	115
Журавлев Е.С.	131
Зайдман А.М.	31
Зайцева Н.С.	141
Закиян С.М.	15, 32, 45, 52
Захарова И.С.	32, 132
Золина Т.	100, 102
Зотов А.В.	77
Зубарев Д.Д.	129
Зубкова Е.С.	91, 103
Ибрагимова М.К.	41
Иванова Л.Н.	32
Иванова Н.А.	31
Иващенко А.Т.	117
Изотов Д.В.	104
Илларионова Н.Б.	37
Иллариошкин С.Н.	18
Ильичев А.А.	12,33
Ильницкая С.И.	11
Искаков И.А.	75
Кабаков А.В.	43, 111
Казаков О.В.	43
Казаков Щ.В.	111
Казанцева П.В.	41
Казаринов Н.П.	87, 105
Казарцев А.В.	140
Каледин В.И.	11
Калиновский А.В.	77
Калита И.Ю.	116
Кальсин В.А.	13
Камарова К.А.	113
Кандров Д.Ю.	24
Капицкая К.Ю.	63

Каплина О.Н.	33
Карагяур М.Н.	123
Карапетян Н.Г.	106
Карасева Т.В.	54, 97
Каримова О.Г.	19
Карпенко А.А.	32, 98
Карпенко Л.И.	12, 33, 124
Касымов А.Р.	77
Кашин О.В.	129
Ким И.И.	43, 95, 111, 120, 133
Кирилова И.А.	89
Киселева Е.В.	34, 132
Клейменова А.А.	113
Климачев В.В.	76, 140
Климович П.С.	125
Клюшников С.А.	18
Кобзева И.В.	54, 97
Коваленко В.Р.	90
Коваль О.А.	51, 55, 68, 79
Кожин П.М.	141
Козлов В.А.	65
Козлов М.В.	113
Козлова М.Г.	54
Козырь К.В.	129
Колосова И.В.	83
Колосова Н.Г.	34
Коноплянников М.А.	13
Коптелова Н.В.	91
Корель А.В.	31, 89
Коробейников А.А.	129
Королева В.А.	107
Косарева О.С.	31
Котловская Л.Ю.	108
Котловский М.Ю.	108
Кочнева Г.В.	35
Кравченко М.А.	69
Крашенинникова А.В.	121, 139
Кретов Е.И.	129
Кривкина Е.О.	46
Кривошапкин А.Л.	80
Кудрявцев И.В.	96
Кудрявцева Ю.А.	20, 46
Кудряшова Н.Н.	116, 121, 139
Кувда Е.В.	23
Кузнецова В.В.	21, 36
Кулемзин С.В.	21, 36
Кулигина Е.В.	51, 55, 79, 131
Куликов А.В.	37
Куликова Е.А.	37
Кунецкий В.Е.	18
Куринова М.А.	110
Лазарев А.Ф.	140

Лайков А.В.	128
Лактионов П.П.	63, 65, 98, 122
Лаук-Дубицкий С.Е.	54, 97
Лебедев И.Н.	38
Лемак М.С.	39
Летягин Г.В.	40
Лир Т.	10
Лисковых М.	100
Литвяков Н.В.	41
Ломовский И.О.	105
Ломовский О.И.	105
Лосик Д.В.	84
Лотков А.И.	129
Лупатов А.Ю.	42,73
Лыков А.П.	43, 95, 111, 120, 133
Лялина Е.И.	136
Ляпун И.Н.	59
Майбородин И.В.	88
Макаревич П.И.	44, 94, 103
Макарцова А.А.	51
Максимова К.Ю.	34
Максютов Р.А.	83
Макушева Ю.С.	112
Маланханова Т.Б.	45, 52
Малахова А.А.	45
Маликова А.З.	113
Мальцева С.В.	80
Мамаев А.Л.	95
Маркель А.Л.	60
Матвеев А.Л.	66, 88
Матвеева В.А.	88
Матвеева В.Г.	46
Медведев С.П.	47, 52, 84
Меньшиков М.Ю.	103, 130
Меньщикова Е.Б.	141
Мечетина Л.В.	21
Милевская Е.А.	114
Милютин Ю.П.	115
Миронов А.В.	20, 46
Морозкин Е.С.	65
Морозов В.В.	88
Морозова А.Ю.	115
Морозова П.Ю.	115
Муралева Н.А.	34
Мурашев А.Н.	48, 66
Мухамедшина Я.О.	128
Наконечный Д.Г.	93
Накохов Р.З.	23
Натальин П.Б.	50
Нащекина Ю.А.	93
Наякшин А.М.	21, 36
Немудрая А.А.	51

Немудрый А.А.	52
Нетесов С.В.	35, 53
Нетылько Г.И.	93
Нечесова Т.А.	118
Низамиева А.А.	116
Никитина В.А.	54, 97
Николаев С.В.	89
Ниязова Р.Е.	117
Нугис В.Ю.	54
Нуштаева А.А.	55, 79
Овсянникова Т.В.	88
Оганесян Г.Г.	10
Ольшанникова С.С.	107
Ольшевская И.В.	118
Орищенко К.Е.	89
Орлов К.Ю.	80
Осипова Л.П.	135
Останин А.А.	78
Осташкин А.С.	54, 97
Павлова С.В.	56, 114
Панарин В.А.	80
Парфенова Е.В.	44, 91, 94, 103, 130
Паршин Д.В.	80
Петренко А.Е.	142
Петров А.В.	57
Пианзин А.И.	58, 119
Плехова Н.Г.	59
Повещенко А.Ф.	43, 95, 111
Повещенко О.В.	43, 72, 95, 111, 120, 133
Подгурская А.Д.	121
Покушалов Е.А.	32, 84
Полтавцева Р.А.	42
Пономарева А.А.	63
Пономарцев Н.В.	100
Пономарцев С.В.	100
Понькина Е.В.	119
Потапова О.Ф.	88
Пузь А.В.	59
Пушкова Е.А.	24
Пыркова А.Ю.	117
Пышная И.А.	79
Райтер Т.В.	111
Рассказов Г.А.	122
Рассказова Е.А.	48
Редина О.Е.	60
Редько А.Н.	23
Рихтер В.А.	35, 51, 55, 68, 79, 131
Романов А.Б.	84
Романова Ю.Р.	128
Рубина К.А.	125
Рубцов Н.Б.	62
Рубцов Ю.П.	123

Рудаков В.С.	97
Рудницкая Е.А.	34
Рудометов А.П.	33, 124
Рыкова Е.Ю.	63, 65
Рысенкова К.Д.	123, 125
Рябчикова Е.И.	35
Рязанова М.А.	60
Саая Ш.Б.	32
Савченко А.А.	96
Сазыкина С.М.	127
Салафутдинов И.И.	128
Салахутдинов Н.Ф.	37
Самойлов А.С.	54, 97
Самохин А.Н.	8
Санатова Э.Р.	128
Свиридов Е.А.	79
Свиридов О.В.	118
Севостьянова В.В.	20, 46
Сейфалиан А.М.	20, 46
Семенов Д.В.	131
Семина Е.В.	123, 125
Сергеева Е.А.	20, 46
Сергеевичев Д.С.	129
Серченя Т.С.	118
Сизенцова Я.Г.	21
Сизиков А.Э.	65
Симонян Р.А.	8
Синебрюхов С.Л.	59
Скибина Д.	110
Скорняков С.Н.	69
Слепухина А.А.	19
Слонимская Е.М.	41
Слотвицкий М.М.	121
Смирнова А.М.	32
Смоленская С.Э.	60
Снытникова О.А.	75
Сократян А.М.	21, 36
Соловьев М.А.	108
Сорокин М.А.	45
Сорокина А.Е.	45
Сотниченко А.С.	23
Стафеев Ю.С.	130
Степанов Г.А.	131
Степанова А.О.	122
Степанова В.В.	91
Стефанова Н.А.	34
Стрельников А.Г.	84
Стригина Е.В.	132
Стронин О.В.	66
Стрункин Д.Н.	111
Струнов А.А.	32
Сульдина Л.А.	132

Супильникова О.В.	102
Суровцева М.А.	43, 95, 111, 120, 133
Сухих Г.Т.	42
Суховских А.В.	134
Сучкова Ю.Б.	54, 97
Табиханова Л.Э.	135
Таранин А.В.	21, 36
Ташметов Э.Р.	136
Телегина Д.В.	34
Тикунов А.Ю.	131
Тикунова Н.В.	66
Тиллиб С.В.	67
Тимофеев М.С.	108
Тихоновский М.А.	13
Ткаченко А.В.	68
Ткачук В.А.	44, 125
Троицкая О.С.	68
Тюменцев М.А.	34
Тютрин И.И.	108
Удут В.В.	108
Ужакова Е.К.	77
Усупжанова Д.Ю.	54, 97
Уфимцева Е.Г.	69, 137
Фадеева Н.П.	70
Федотова Е.Ю.	18
Филатов А.В.	71
Филимонов П.Н.	99, 142
Филипенко М.Л.	135
Филиппова Ю.А.	131
Фомин А.С.	79
Фомичев А.В.	72, 120
Фролова Ш.Р.	138
Хе А.К.	80
Хличкина А.А.	75
Хлусевич Я.А.	66
Холоденко И.В.	73, 74
Холоденко Р.В.	73, 74
Холявка М.Г.	107, 127
Хоменко Т.А.	37
Хоцкин Н.В.	37
Цвеляя В.А.	116, 121, 138, 139
Центалович Ю.П.	75
Цыганов М.М.	41
Чарыкова И.Н.	28
Чепелева Е.В.	114, 129
Черданцева Т.М.	76, 140
Чердынцева Н.В.	41, 63
Черевко А.А.	80
Чередниченко А.Г.	142
Чернов С.В.	77
Черноносова В.С.	98
Черных Е.Р.	78

Чернявский А.М.	72, 120
Чернявский М.А.	72
Чечушков А.В.	141
Чикаев А.Н.	33, 124
Чикаев Н.А.	21, 36
Чинак О.А.	79
Чичерина Г.С.	88
Чупахин А.П.	80
Чуркина Т.В.	135
Шабаев А.Р.	46
Шахмурадова А.И.	99
Шварц Я.Ш.	99, 142
Шевела Е.Я.	78
Шевченко А.И.	31, 32, 132
Шерман К.М.	31
Шернюков А.В.	79
Шилина М.	100
Шкурупий В.А.	141
Шлихт А.Г.	81
Штокало Д.Н.	82
Шутько А.В.	143
Щелкунов С.Н.	83
Щелкунова Е.И.	89
Щербаков Д.Н.	33
Юнусова А.Ю.	68, 79
Юнусова В.А.	130
Якубицкий С.Н.	83
Якубов А.А.	84
Яньшолле В.В.	75
Яньшолле Л.В.	75
Ярыгин К.Н.	42, 73
Ahlfors J.E.	13
Aroutiounian R.	144
Babayan N.	144
Grigoryan R.	144
Malakyan M.	144
Matsui H.	85
Sarkisyan N.	144
Stopper H.	144

Биостанция NIKON ST

интерактивная система поиска и анализа
клеточных изменений

- Полный контроль параметров культивирования
- Фазовый контраст и 5 каналов флуоресценции
- Протоколы съемки и микроскопия в реальном времени

ПО для автоматического распознавания фенотипа, подсчета клеток и колоний, оценки экспрессии, пролиферации, эффективности репрограммирования iPS, wound healing, трекинг и другие приложения



Системы XVIVO

закрытые модули для асептического культивирования

- Класс A (ISO 5)
- Соответствие cGMP
- Одобрено FDA и EMA

Экономия бюджета
Экономия времени
Экономия пространства
Безопасность продукта



ООО «БиоВитрум»
Россия, 199106, Санкт-Петербург
Большой пр. В.О., д.68, лит. А
Тел./факс: (812) 3050606
info@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрумЮг»
Россия, 344016, г. Ростов-на-Дону
ул. Таганрогская, 128
Тел./факс: +7 (863) 2550305
garegin.khachaturyan@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум М»
Россия, 127287, г. Москва,
ул. 2я Хуторская, д. 38А, стр. 8, этаж 7
Тел./факс: (495) 7874046
moscow@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум»
Казахстан, 010000, Астана
ул. Московская 40, офис 108
Тел./факс: +7 (7172) 592717
kz@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум-Сибирь»
Россия, 630001, г. Новосибирск,
ул. Шорная, 3
Тел./факс: (383) 2304900
sibir@biovitrum.ru

Региональные представители:
Г. Казань
Г. Уфа
Г. Нижний Новгород
Г. Владивосток
Г. Екатеринбург

Технология Ion AmpliSeq™

Секвенируйте, используя простые и быстрые протоколы для NGS

Воспользуйтесь всей широтой спектра готовых панелей для исследования в области онкологии, наследственных заболеваний и фармакогеномики.

Конструируйте собственные панели на сайте AmpliSeq.com – просто определите гены или мутации для секвенирования, и мы разработаем и синтезируем панель Ion AmpliSeq™ специально для Вас.

Узнайте больше на нашем сайте: thermofisher.com/contentforall

Подготовка библиотек



Библиотеки Ion AmpliSeq™
и система Ion Chef™

Продолжительность: 7 ч.
Трудозатратное время: 15 мин.

Подготовка матрицы



Система Ion Chef™

Продолжительность: 11 ч.*
Трудозатратное время: 15 мин.

Запуск секвенатора



Системы Ion S5™ и S5 XL

Продолжительность: 2,5 ч.**
Трудозатратное время: 15 мин.

Анализ данных



ПО Torrent Suite™ и
Ion Reporter™

Продолжительность: 5 ч.
Трудозатратное время: –

* Этап подготовки матрицы может проводиться в ночное время без участия оператора
** Указано время для чипа Ion 520 на 200 п.о. при использовании в системе Ion S5

ThermoFisher
SCIENTIFIC

8 (495) 651 6797
www.thermofisher.com

invitrogen



Потрясающе быстрая проточная цитометрия

Проточный цитометр AttuneNxT: когда скорость имеет значение

Проточный цитометр Invitrogen™ Attune™ NxT — непревзойденное сочетание качества анализа и скорости. Даже при десятикратной скорости потока — до 1 мл образца в минуту — вы получите не менее качественные данные, чем при низких скоростях. Гибкая модульная конструкция позволяет прибору развиваться вместе с вами. Возможность установки до 4 лазеров и до 14 цветов на выбор, поддержка 96- и 384-луночного форматов — всё это поможет сконфигурировать цитометр AttuneNxT практически под любые условия эксперимента и любой бюджет. И никаких ограничений!

Увлекательная интерактивная экскурсия — на thermofisher.com/attune

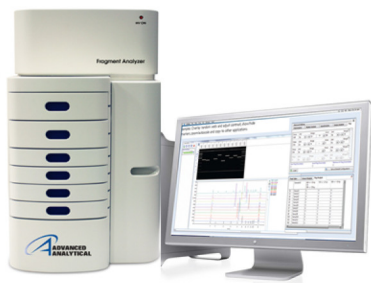
ThermoFisher
SCIENTIFIC

Только для исследовательских целей. Не предназначено для диагностических процедур. © 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Все права защищены. Все торговые марки являются собственностью Thermo Fisher Scientific и ее дочерних компаний, если не указано иначе. **COL11853 0416**

Fragment Analyzer™

быстрое определение эффективности редактирования

Простой протокол:



1. Амплификация области интереса двух образцов – CRISPR отредактированного и образца дикого типа с последующим формированием гетеродуплексов
2. Разрезание гетеродуплексов в местах с неполным соответствием между нуклеотидами
3. Анализ фрагментов на Fragment Analyzer

Аналитическое программное обеспечение PROSize® в рамках системы Fragment Analyzer легко вычисляет размер фрагмента, его концентрацию и молярность, проводит диплоидный анализ, а также анализ частоты мутаций

Амаха™ Nucleofector™

трансфекция с непревзойденной витальностью



Технология нуклеофекции Amaha™ Nucleofector™ от Lonza позволяет проводить высокоэффективную невирусную трансфекцию первичных культур, в том числе получать линии плюрипотентных стволовых клеток iPS для дальнейшего проведения клеточных исследований in vitro или in vivo.

Совместно с технологиями редактирования генома, такими как CRISPR/Cas9, клетки iPS или других типов могут быть специфически модифицированы на уровне генома.

А также все для:

- Выделения ДНК
- Амплификации
- Трансфекции
- Культивирования
- Клеточного анализа
- Микроскопии

ООО «БиоВитрум»
Россия, 199106, Санкт-Петербург
Большой пр. В.О., д.68, лит. А
Тел./факс: (812) 3050606
info@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрумЮг»
Россия, 344016, г. Ростов-на-Дону
ул. Таганрогская, 128
Тел./факс: +7 (863) 2550305
garegin.khachatryan@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум М»
Россия, 127287, г. Москва,
ул. 2я Хуторская, д. 38А, стр. 8, этаж 7
Тел./факс: (495) 7874046
moscow@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум»
Казахстан, 010000, Астана
ул. Московская 40, офис 108
Тел./факс: +7 (7172) 592717
kz@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум-Сибирь»
Россия, 630001, г.Новосибирск,
ул. Шорная, 3
Тел./факс: (383) 2304900
sibir@biovitrum.ru

Региональные представители:
Г. Казань
Г. Уфа
Г. Нижний Новгород
Г. Владивосток
Г. Екатеринбург

ООО «Био-Рад Лаборатории»

105064, Москва, Нижний Сусальный пер., дом 5, стр. 5А,

ТЕЛ: (495) 721-1404

ФАКС: (495) 721-1412

post@bio-rad.com

www.bio-rad.com



Компания **Bio-Rad Laboratories, Inc USA** (Био-Рад, США) является одним из мировых лидеров производства оборудования и реагентов для научных исследований. В рамках взаимодействия с научными, медицинскими, биотехнологическими и образовательными организациями Био-Рад предлагает современные технологии, оборудование и реагенты.

Геномные технологии *(генная экспрессия и генная модуляция)*

- **Аmplификация** *(уникальный спектр приборов)*
- **Цифровой капельный ПЦР третьего поколения**
- **Гельэлектрофорез** *(горизонтальный и вертикальный форматы)*
- **Системы визуализации** *(колориметрия, флюоресценция, хемилюминесценция)*
- **Перенос генов** *(электропорация, болистика, химическая трансфекция)*

Протеомные технологии *(структурная и функциональная протеомика)*

- **BioLogic DuoFlow™** *(модульная гибкая система для биохроматографии)*
- Широкий спектр колонок и носителей
- **NGC™** *(автоматизированная хроматографическая система очистки рекомбинантных белков)*
- Оборудование для анализа и процессинга **2-D** протеомных карт
- **Bio-Plex** *(мультиплексный количественный анализ биомолекул, панели для определения цитокинового профиля, белков сигнальной трансдукции, реагенты для создания собственных уникальных наборов)*
- **S3 сортер клеток**
- **ZOE флуоресцентный имиджер**



Turning vision into information

Nikon

100 лет инноваций на рынке оптических устройств

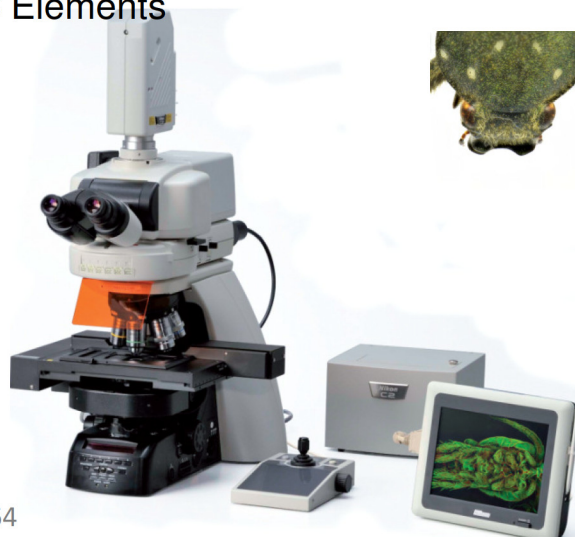
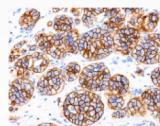
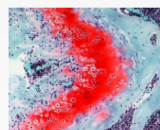
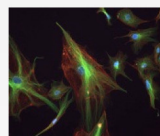
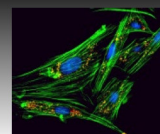
Компания Nikon предлагает широкий спектр оборудования для микроскопии

- Прямые и инвертированные микроскопы
- Системы наблюдения за живыми клетками
- Конфокальные микроскопы
- Системы сверхвысокого разрешения
- Стереомикроскопы
- Цифровые камеры высокого разрешения для микроскопии
- Программное обеспечение NIS Elements

See the evolution

www.nikoninstruments.com

Для получения дополнительной информации
свяжитесь с нами по телефону +7 (495) 663-77-64



Illumina — совершенные решения для геномных исследований и диагностики

Компания **Illumina Inc.** (Сан-Диего, США) является мировым лидером в области секвенирования нового поколения (NGS). Секвенаторы Illumina позволяют проводить генетические исследования для науки, медицины, сельского хозяйства, ветеринарии и криминалистики.

Более 90% опубликованных научных данных, связанных с технологиями секвенирования нового поколения, сделаны на платформах Illumina.

Компания **АЛЬБИОГЕН** — официальный дистрибьютор компании Illumina, осуществляет продажу, техническую поддержку и гарантийное обслуживание продукции на территории Российской Федерации, Республики Беларусь и Казахстана.





PerkinElmer™
For the Better

Оборудование для биомедицинских исследований

Генетика



Клеточная биология



Высокопроизводительный
скрининг



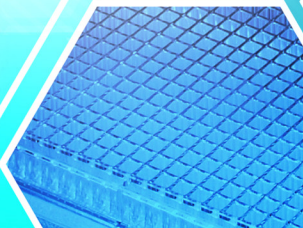
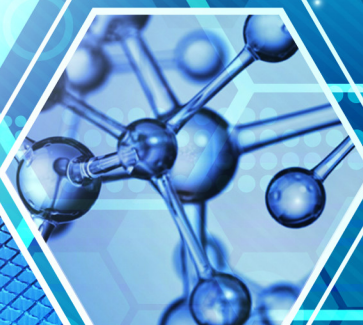
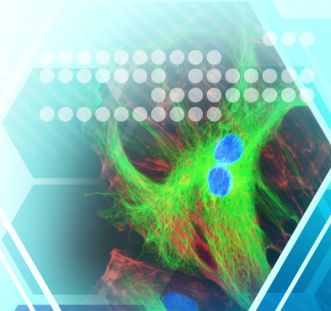
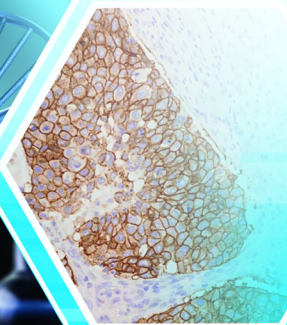
Протеомика



Имиджинг in vivo



Гистология



Авторизованный дистрибьютор Perkin Elmer (США) в России — ООО «БиоЛайн»



группа компаний

ООО «БиоЛайн»
197101, Россия,
Санкт-Петербург,
Пинский пер., д.3, лит. А
тел.: (812) 320 49 49
факс: (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru
www.bioline.ru

Москва, тел.: (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: (383) 227 09 63
Владивосток, тел.: (924) 420 66 62
Екатеринбург, тел.: (343) 287 32 49
Нижний Новгород, тел.: (831) 278 61 47
Ростов-на-Дону, тел.: (863) 268 99 32
Казань, тел.: (843) 570 66 88
Самара, тел.: (927) 768 06 43
Сочи, тел.: (922) 115 09 20

Единый бесплатный номер сервисной службы для всех регионов России: 8 800 333 00 49

Проточные цитометры

ДИА-М
современная лаборатория

Thermo
SCIENTIFIC

MERCK

BECKMAN
COULTER

BIO-RAD

- Анализ клеток в иммунологии и регенеративной медицине
- Анализ дрожжей в пивном производстве
- Анализ плоидности при селекции сельскохозяйственных культур

- Компактные и высокопроизводительные
- От 2 до 14 оптических параметров одновременно



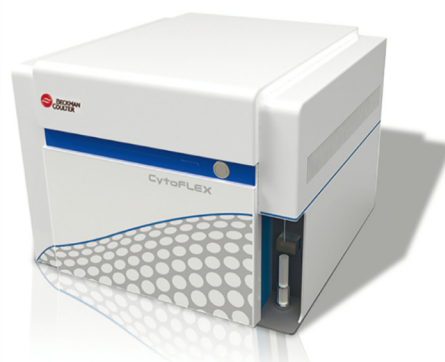
guava easyCyte, Merck

- Экономичный;
- высокопроизводительный;
- до 3 лазеров;
- до 12 каналов детекции.



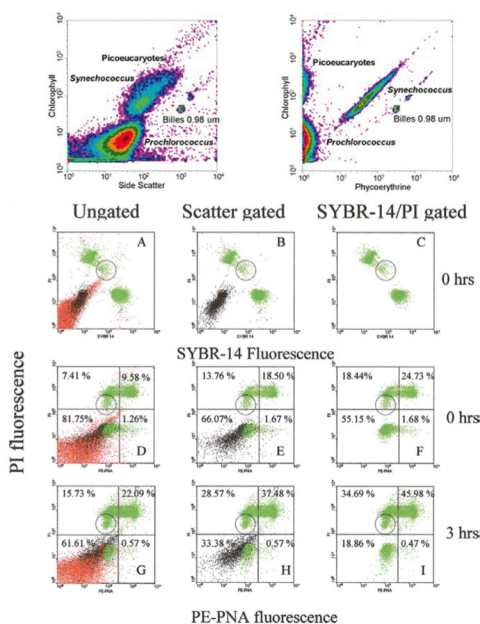
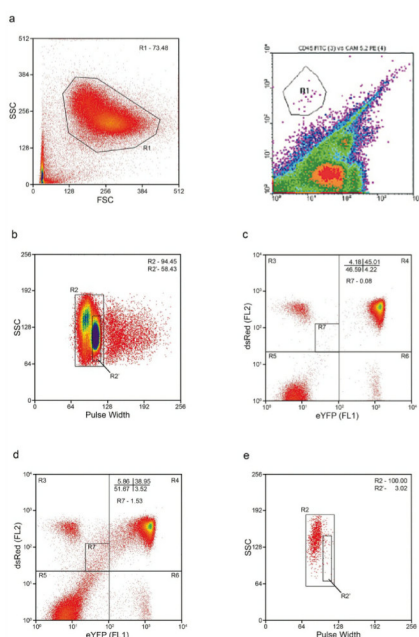
Muse, Merck

- Компактный;
- экономичный;
- 1 лазер;
- до 2 каналов детекции.



CytoFlex, Beckman

- Высококчувствительный;
- до 3 лазеров;
- до 13 каналов детекции.



Attune NxT, Thermo

- Высококчувствительный;
- до 4 лазеров;
- до 16 каналов детекции.

ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ■ ПЛАСТИК ■ СТЕКЛО ■ РЕАКТИВЫ ■ НАБОРЫ

www.dia-m.ru
заказ онлайн



БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Компания «Химмед» поставляет материалы и оборудование любой категории сложности для биотехнологических, фармацевтических производств, аналитических и научно-технических лабораторий, экспертных отделов и отраслевых лабораторий контроля качества.

Реактивы для биохимических исследований

- Антитела
- Готовые тест-системы ИФА
- Рекомбинантные белки
- Готовые наборы для выделения, очистки ДНК, РНК, белков
- Липиды
- Расходные реагенты для ПЦР
- Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции)
- ДНК-полимеразы
- Оценка результатов ПЦР методом электрофореза
- Маркеры молекулярного веса белков (для электрофореза)
- Маркеры молекулярного веса ДНК (для электрофореза)
- Антибиотики/антимикотики для трансфекции
- Красители
- Материалы для цитогенетики
- Культуральные добавки и факторы роста
- Изотонические растворы
- Наборы для обнаружения микоплазмы
- Питательные среды
- Растворы для разделения клеток
- Реактивы для исследования стволовых клеток
- Сыворотки
- Реактивы для молекулярной биологии
- Дeterгенты
- Средства деконтаминации от ДНК, РНК и РНКазы
- Мембраны для переноса
- Расходные материалы для микробиологии

Пластиковые расходные материалы и посуда LIFE SCIENCE

- Пластиковая посуда для культур клеток
- Пластиковая посуда для ПЦР
- Пипетки и наконечники
- Центрифужные пробирки
- Фильтрационные системы
- Криопробирки и аксессуары
- Емкости для хранения
- Рентгеновская пленка
- Колонки для обессоливания
- Устройства для диализа

Оборудование для биохимических исследований

- Биомедицинские, поляризационные и стереомикроскопы
- Оборудование для секвенирования ДНК, проточной цитометрии, ПЦР и ПЦР в реальном времени
- Оборудование для электрофореза и блоттинга, системы гель-документирования
- Роботизированные раскапывающие станции, микропланшетные ридеры и промыватели
- Оборудование для биочипов

