

# Гены & Клетки

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



**VII МОЛОДЁЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ  
по молекулярной и клеточной биологии  
Института цитологии РАН**

Санкт-Петербург, 12–15 октября 2020 г.

[www.genescells.ru](http://www.genescells.ru)

ИНСТИТУТ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

«Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). МСК выделяли из костного мозга мышей ( $n=5$ ) по общепринятой методике. С учетом иммунологических свойств мезенхимальных клеток, подбор совместимых пар «донор-реципиент» не осуществляли. Клетки культивировали в среде  $\alpha$ MEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (20%) в условиях 5%  $CO_2$  и температуре 37 °C. Мечение МСК производили сукцинимидным эфиром дикарбоскифлуоресцеина по протоколу производителя. Меченые клетки вводили в хвостовую вену в количестве  $1 \times 10^6$  / кг. Мышей выводили из эксперимента через 1 ( $n=5$ ), 24 ( $n=5$ ) и 72 ( $n=5$ ) ч после введения взвеси клеток, извлекали сердце, легкие, печень, селезенку, почки. Выполняли гистологическую проводку биологического материала по общепринятому способу и готовили парафиновые блоки. Изучение срезов тканей проводили с использованием люминесцентного микроскопа Axio Scope A1 ( $\times 100$ , длины волн возбуждения — 475 нм, эмиссии — 530 нм).

Через 1 ч максимальное количество меченых МСК обнаруживали в легких (12–14 клеток в поле зрения, медиана  $Me=13$ ), в меньшем числе — в почках (3–8 клеток в поле зрения,  $Me=4$ ), в сердце (2–5,  $Me=3$ ), в селезенке (2–3,  $Me=2$ ), в печени (1–2,  $Me=1$ ). Через 24 ч наибольшая концентрация детектируемых элементов выявлена в почках (3–6 клеток в поле зрения,  $Me=4$ ), в остальных исследованных органах — менее 2 клеток в поле зрения. К концу эксперимента (72 ч) количество флуоресцирующих МСК в тканях животных значительно снизилось и составляло не более 1 клетки в поле зрения. Наблюдаемая динамика содержания меченых элементов в органах согласуется с опубликованными данными [2].

Таким образом, изучено биораспределение меченых МСК после внутривенного введения лабораторным животным. Исследуемые клетки элиминируются из тканей в течение 3 суток.

Работа выполнена при поддержке гранта ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере».

#### Литература:

1. Ткачук В. А., Нестеров А. Н., Литвинова Н.Ю. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов. М.: МГУ им. МВ Ломоносова. 2017.
2. Jasmin J., Jelicks LA., Tanowitz HB. et.al. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect.* 2014; 16(11): 923–35

Ю.Д. Василец, К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева,  
А.В. Комова, И.Б. Белоглазова,  
Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова

#### ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА (TGF-BETA) УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ СБОРКИ 3D КАРДИАЛЬНЫХ СФЕРОИДОВ

ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Министерства Здравоохранения Российской  
Федерации, Москва, Россия

Yu.D. Vasilets, K.V. Dergilev, Z.I. Tsokolaeva,  
A.V. Komova, I.B. Beloglazova,  
E.I. Ratner, E.V. Parfenova

#### TRANSFORMING GROWTH FACTOR (TGF-BETA) REGULATES THE ASSEMBLY OF 3D CARDIAL SPHEROIDS

National Medical Research Center of Cardiology,  
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow,  
Russia

eleagnusom@gmail.com

В тканях организма человека взаимодействие клеток между собой и компонентами межклеточного матрикса реализует сеть биохимических и механических сигналов, имеющих важное значение для поддержания клеточного гомеостаза. Были предприняты многочисленные попытки разработать трехмерные модели клеточных культур для изучения их свойств и понимания механизмов регуляции клеточного микроокружения *in vivo*. Одной из таких моделей кардиального микроокружения являются кардиосферы (КС) — гетерогенная популяция прогениторных клеток сердца, которые способны самопроизвольно воссоздавать 3D микроокружение, подобное «клеточным нишам» миокарда, и обеспечивать сохранение межклеточных контактов, принципов метаболического и секреторного регулирования. Однако механизмы, регулирующие их формирование, остаются малоизученными.

Цель исследования: изучить влияние TGF-beta на сборку 3D кардиальных сфероидов.

В работе использованы образцы миокарда мышей C57Bl6. Для получения эксплантной культуры использовалась среда IMDM, 20% фетальной сыворотки теленка (ФСТ), глутамин, 2-меркаптоэтанол (МЭ), антибиотики; для сборки кардиосфер — комбинированная среда 35% IMDM/65% DMEM-F12, 3% ФСТ и ростовые факторы. Исследование иммунофенотипа проводили с помощью метода иммунофлуоресцентного окрашивания, экспрессию генов *SNAI*/*SLUG* — ПЦР в реальном времени.

Мы обнаружили, что клетки эксплантной культуры в соответствующих условиях способны формировать КС, представляющие собой кардиальные сфероиды, в центральной части которых локализуются клетки, экспрессирующие маркеры стволовых клеток *Oct4* и *c-kit*, окруженные клетками мезенхимального фенотипа (*CD105<sup>+</sup>*, *CD73<sup>+</sup>*) и сосудистыми/кардиальными клетками-предшественницами (*Gata4<sup>+</sup>*, *Pesam<sup>+</sup>*, *SMA<sup>+</sup>*). Пересадка КС в среду с высоким содержанием сыворотки способствует их «разборке» и получению 2D культуры клеток. Образование КС сопряжено с повышением экспрессии генов-индукторов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) по сравнению с 2D культурой: *SNAI* (>5 раз) и *SLUG* (>7 раз). Добавление TGF-beta — классического индуктора ЭМП — приводило к активации сборки крупных и мелких сфероидов. Напротив, воздействие ингибитора SB431542 в комбинации с TGF-beta нарушало процесс

сфероидогенеза, что проявлялось в увеличении числа первичных клеточных скоплений и снижением количества полноценных 3D структур.

Таким образом, TGF-beta способствует сборке КС, которая сопровождается повышением экспрессии генов SNAI/SLUG, что указывает на возможное участие ЭМП в процессе их формирования. КС имеют сложную трехмерную организацию, сформированную разными типами клеток и белками внеклеточного матрикса, что позволяет их рассматривать в качестве 3D модели кардиального микроокружения *ex vivo* для биомедицинских исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-15-01368 и РФФИ № 18-015-00430.

**Е.В. Викторова, Д.Г. Коровина**

# **ЖИРОВАЯ ТКАНЬ ОВЦЫ КАК ИСТОЧНИК МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК**

*Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко РАН, Москва, Россия*

**E.V. Viktorova, D.G. Korovina**

# **SHEEP ADIPOSE TISSUE AS A SOURCE OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS**

*Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia*

victorovaekaterina@gmail.com

Получение мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) сельскохозяйственных животных представляет большой интерес для ветеринарной регенеративной медицины. Основными источниками для выделения ММСК является костный мозг и жировая ткань (ЖТ). В связи с этим, целью работы было выделение из ЖТ овец клеток со свойствами ММСК. Биологический материал был получен в условиях вивария методом иссечения 2 грамм жира из подкожно-жировой клетчатки при местной анестезии с соблюдением всех правил асептики и антисептики. ЖТ в количестве трех образцов была получена от трех самцов в возрасте от 8–12 месяцев. Выделение, культивирование и характеристику ММСК ЖТ овец проводили по методике, разработанной нами ранее [1]. Оценку способности ММСК к направленной дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлении *in vitro* изучали с использованием коммерческих наборов StemPro (Gibco, США) и дальнейшим окрашиванием специфическими красителями. В результате была получена популяция клеток со свойствами ММСК. Полученные клетки обладали фибробластоподобной морфологией, адгезией к культуральному пластику и клонообразующей способностью. Среднее значение времени одной цитогенерации составляло ( $48 \pm 0,05$  ч) с митотическим индексом 3,4 %. При индукции к дифференцировке обладали способностью на 14–24-е сут формировать клетки жировой, костной и хрящевой тканей, что подтверждалось специфической окраской. Таким образом, нами было показано, что ЖТ овец является легкодоступным и перспективным источником для выделения клеток со свойствами ММСК. Полученные данные представляют интерес для дальнейшего развития ветеринарной регенеративной медицины.

Работа выполнялась в рамках НИР № 0578-2018-0006 «Создание новых клеточных систем с заданными свойствами на основе стволовых клеток млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных для ветеринарии, вирусологии и биотехнологии».

## *Литература:*

1. Савченкова И.П., Эрнст Л.К., Гулюкин М.И. и др. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков. В сборнике: Современные средства и методы обеспечения ветеринарного благополучия по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел. Москва, 2011: 304–314.

**Е.С. Войнова, П.А. Тюрин-Кузьмин**

# **ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ И ПРОЛИФЕРАТИВНО-ДИФФЕРЕНЦИРОВочНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ СТАРЕНИИ**

*Московский государственный университет, Москва, Россия*

**E.S. Voynova, P.A. Tyurin-Kuzmin**

# **HORMONAL REGULATION AND PROLIFERATIVE-DIFFERENTIAL POTENTIAL OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN THEIR AGING PROCESS**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

voynovaes.pharm@gmail.com

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) располагаются в строме большинства тканей и являются стволовыми клетками взрослого организма. Они представляют большой интерес для современной науки в связи с их потенциальным использованием в регенеративной медицине. В качестве перспективных направлений рассматриваются применение их для аутологичной трансплантации и стимуляции эндогенных механизмов репарации и регенерации поврежденных тканей. Как стволовые клетки, они обладают способностью к самообновлению и дифференцировке — процессов, от которых зависит размер популяции МСК и ее регенеративный потенциал на протяжении жизни человека. Старение популяции стволовых клеток влияет как на пролиферативные свойства МСК, так и на их способность к дифференцировке. Ранее было показано, что так называемое «время удвоения» популяции как на ранних, так и на поздних пассажах выше у пожилых доноров. Более того, этот параметр значительно увеличивается с каждым последующим пассажем. Кроме того, отмечается снижение мультипотентности дифференцировки и проявление признаков репликативного старения.

В качестве моделей стареющих МСК нами использовались клетки, выделенные из доноров разного возраста, и продолжительное пассирование клеток в культуре. Митотическая активность, адиподифференцировка и гормональная регуляция клеток наблюдались в режиме реального времени на уровне одиночных клеток.

В процессе исследования удалось выяснить, что клетки как молодых, так и пожилых доноров, высаженные в большей плотности, эффективнее переходят в адиподифференцировку. Обнаружилось, что сесцентные клетки обладают меньшим потенциалом