

вектора на основе лентивируса, кодирующего *EGFP* под контролем промотора гена-маркера плюрипотентности, *REX1*. Для первичного выявления плюрипотентных клеток достаточно обработать несколько колоний лентивирусами и через два дня определить, есть ли свечение *EGFP*. Преимущества использования лентивирусов: 1) простота обработки клеток и анализа; 2) доставка генетического материала практически во все клетки; 3) трансдукция клеток различных видов млекопитающих; 4) замолкание лентивирусных трансгенов в плюрипотентных клетках. Иммуноцитохимический анализ на гены-маркеры *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* имеет недостатки: экспрессия *Oct4* и *Sox2* в ИПСК может быть экзогенной, а *Nanog* практически не экспрессируется в ИПСК Американской норки. *Rex1* — маркер плюрипотентности не только ИПСК человека, но и других видов млекопитающих. Использование промотора *REX1* для контроля экспрессии *EGFP* позволит быстро элиминировать не плюрипотентные клетки.

Для создания репортерного вектора мы использовали промотор *REX1* из плазмиды *phREX1-Luc* (Addgene, 17222) и вектор *LeGO-G2* (Addgene, 25917). Плазмиду *phREX1-Luc* гидролизировали эндонуклеазами рестрикции *BglII*, *CciN* и *XbaI*, затем выделили из агарозного геля фрагмент, содержащий промотор. Полученный фрагмент лигировали с вектором *LeGO-G2*, гидролизованным по сайтам рестрикции *CciN* и *BamHI*. В результате мы получили плазмиду *LeGO-REX1-EGFP*, несущую ген *EGFP* под контролем промотора гена *REX1* и содержащую компоненты, необходимые для сборки псевдотипированных лентивирусов.

Мы показали, что трансфекция клеток Phoenix (HEK293) и эмбриональных стволовых клеток мыши DGE51 плазмидой *LeGO-REX1-EGFP* приводит к ожидаемой экспрессии *EGFP* с промотора CMV. Следующий этап тестирования репортерного вектора — трансдукция лентивирусами плюрипотентных клеток различных видов млекопитающих.

Использованы линии клеток ЦКП «Коллекции плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепроцессуального и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL; <http://ckp.icgen.ru/cells/>).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00644.

КОМПЬЮТЕРНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ТЕХНОЛОГИЙ СЕКВЕНИРОВАНИЯ В АНАЛИЗЕ ХРОМОСОМНЫХ КОНТАКТОВ В КЛЕТКЕ

Юрий Львович Орлов¹⁻⁴, Сергей Сергеевич Ковалев^{2,3}, Артур Игоревич Дергилев³, Роман Олегович Бабенко^{2,3}, Эльвира Расимовна Галиева³, Елена Юрьевна Леберфарб²

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² ФИЦ "Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Москва, Россия;

³ Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск, Россия;

⁴ Геномный Институт Сингапура (Genome Institute of Singapore), Сингапур

orlov@d-health.institute

Развитие экспериментальных технологий, основанных на высокопроизводительном секвенировании ДНК и иммунопреципитации хроматина, дает возможность исследования регуляторных портретов, в том числе в эмбриональных стволовых клетках [1, 2]. Было показано

существование кластеров сайтов транскрипционных факторов в геноме, функционирующих в эмбриональных стволовых клетках мыши, связанных с факторами репрограммирования и поддержания плюрипотентности *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* [2]. Исследование хромосомных контактов в интерфазном ядре клетки имеет огромное значение для понимания молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов, хромосомном регуляторном коде и его влиянии на развитие заболеваний [3]. Последнее десятилетие активно развиваются методы исследования хромосомных контактов в геноме — Hi-C и ChIA-PET. Технология Hi-C (High conformation Capture — «конформации хромосом высокого порядка») позволяет определять все хромосомные контакты в ядре клетки. Технология ChIA-PET (Chromatin Interaction Analysis by Paired-End-Tag sequencing) включает стадию иммунопреципитации хроматина и предназначена для исследования хромосомных контактов, опосредованных белком [3]. Было показано существование обширных промотор-ориентированных хромосомных контактов в геноме человека [4]. Проведен вычислительный эксперимент по анализу сайтов связывания в геноме человека по базам данных ENCODE, Cistrome, показано присутствие кластеров сайтов связывания факторов плюрипотентности. В данной работе мы представляем обзор компьютерных методов обработки данных о хромосомных контактах в различных типах клеток, обсуждаем ландшафт транскрипции в опухолевых стволовых клетках.

Благодарности. Работа поддержана РНФ [грант 19-15-00219] (ЮО, РБ, ЭГ). СК поддержан бюджетным проектом ИЦиГ 0259-2019-0002.

Литература:

1. Chen X., Xu H., Yuan P. et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 2008; 133(6): 1106–17.
2. Цуканов А.В., Дергилев А.И., Богомолов А.Г., Орлов Ю.Л. Реконструкция геномного распределения кластеров сайтов связывания транскрипционных факторов, связанных с поддержанием плюрипотентности. Гены и клетки 2018; Приложение № 1: 114.
3. Fullwood M.J., Liu M.H., Pan Y.F. et al. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* 2009; 462(7269): 58–64.
4. Li G., Ruan X., Auerbach R.K. et al. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell* 2012; 148(1–2): 84–98.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ЯЗВ

Екатерина Вадимовна Орлова, Людмила Михайловна Смирнова, Ляйля Наилевна Каюмова, Полина Геннадьевна Свист

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

polina_svt@mail.ru

Важнейшей медико-социальной проблемой является лечение трофических язв различной этиологии в том числе на фоне язвенно-некротического ангиита (ЯНА), протекающий с выраженными нарушениями трофики кожи и имеющим изначально торпидное течение. Низкая интенсивность реэпителизации при ЯНА связана со снижением скорости миграции и пролиферации кератиноцитов на фоне изменения состава матрикса и активностью цитокинов, выделяемых фибробластами и макрофагами

в раневую среду. В длительно незаживающих язвах снижен уровень $\alpha 5\beta 1$ -интегрин, что определяет немигрирующие фенотипы кератиноцитов. В следствии этого клеточная терапия язвенных дефектов аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками (АМСК) является перспективной за счет высокой пролиферативной активности клеток продуцирующих ростовые факторы, интерлейкины и хемокины, участвующие в формировании и функционировании стромального микроокружения, что влияет на регенерацию кожных покровов в короткие сроки.

Цели. Разработка методики применения АМСК в терапии ЯНА по результатам сравнительного, нерандомизированного, проспективного, одноцентрового исследования.

Задачи. Сравнительная оценка эффективности и безопасности применения АМСК в клеточной терапии ЯНА в сравнении со стандартным лечением.

Материалы и методы. Группа из 4 пациентов в процессе наблюдения с язвами, существующими более 3 месяцев, площадью до 7 см, получавшие стандартные схемы терапии не приведшие к рубцеванию дефекта на 50% и более.

АМСК — суспензию живых аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученную путем аспирации костного мозга при проведении пункции гребня подвздошной кости согласно инструкции с помощью стандартного хирургического инструментария и лекарственных средств в процедурном кабинете. В технологической цепочке АМСК используют реагенты, оборудование и расходные материалы, отвечающие требованиям GMP. Клеточный продукт имеет вид опалесцирующей жидкости содержащей МСКМ в индивидуальной дозировке из расчета 40 000 клеток на 1 см² язвы в физиологическом растворе; наносится на язвенный дефект с помощью пипетки-дозатора с одноразовым стерильным наконечником объемом 1000 мкл. Экспозиция 15 мин. до покрытия стерильной повязкой. Кратность наблюдения 1 раз в 2 недели.

Выводы. При контроле на 14 сутки отмечено уменьшение воспалительного процесса, второй и последующие контрольные осмотры показали динамическое рубцевание язвы на 25–40% площади, что подтверждает эффективность АМСК в комплексной терапии торпидного варианта ЯНА.

ЗАМЕЩЕНИЕ ДЕФЕКТА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРОЛИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛЛОГЕННЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ПРОДУКТОВ

Надежда Валерьевна Орлова¹, Александр Николаевич Муравьев^{1, 4}, Татьяна Ивановна Виноградова¹, Наталья Михайловна Юдинцева², Юлия Александровна Нащекина², Александр Анатольевич Лебедев¹, Магомедсадик Гасанович Шейхов¹, Петр Казимирович Яблонский^{1, 3}

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

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

⁴ Частное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, Россия

nadinbat@gmail.com

До сих пор остро стоит вопрос хирургической реконструкции мочевого пузыря (МП). В настоящее время при

неэффективности консервативных методов применяют замещение МП фрагментами желудочно-кишечного тракта, что приводит к ряду осложнений. Зарубежными учеными предпринят удачный опыт замещения МП у человека выращенным *in vitro* тканевым аналогом, содержащим аутологичные гладкие миоциты и уротелий. Однако при ряде патологий использование аутологичного материала невозможно. Перспективной для таких пациентов является аллогенная клеточная трансплантация. Мировой опыт экспериментального применения аллогенных клеток для реконструкции МП ограничивается несколькими исследованиями.

Цель: экспериментальное изучение возможности применения аллогенного тканеинженерного композита для замещения дефекта стенки мочевого пузыря.

Материалы и методы: 15 кроликам выполнена парциальная резекция МП с последующим замещением дефекта скаффолдом на основе поли-L,L-лактида, содержащим аллогенные клетки различного тканевого происхождения: гладкие миоциты с уротелием, фибробласты и мезенхимальные стволовые клетки (МСК), меченные железосодержащими наночастицами. Результаты оценивались через 2,5 месяца.

Результаты: у 5 из 6 животных, получивших скаффолд с МСК, не отмечено признаков отторжения имплантата. В конце периода наблюдения емкость МП была сравнима с дооперационной. Наличие меток в месте имплантации подтверждено данными магнитно-резонансной томографии. Визуально в месте имплантации определялся участок вновь сформированной стенки мочевого пузыря, в котором зафиксирована электромиографическая активность. Гистологически выявлены начальные стадии репарации и ангиогенеза. При конфокальной микроскопии криосрезов из зоны имплантации обнаружены меченые клетки, принимающие участие в формировании структуры, сходной с уротелием. Во всех случаях имплантации бесклеточной матрицей или скаффолдов, содержащих гладкие миоциты с уротелием и фибробласты, произошло отторжение имплантата с разной степенью выраженности воспалительной реакцией и уменьшением емкости МП.

Заключение: выполненный эксперимент подтверждает возможность применения аллогенных МСК в составе многокомпонентного композита для частичной реконструкции МП. Дальнейшая разработка и внедрение в практику методик создания тканеинженерных аналогов мочепузырной стенки может способствовать улучшению результатов лечения урологических патологий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-50-00068 и гранта РФФИ № 13-04-12027 ofi_m.

НОРМАЛИЗАЦИЯ КАРИОТИПА ИПСК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ ПАЦИЕНТА С МАСШТАБНОЙ ДУПЛИКАЦИЕЙ ДИСТАЛЬНОГО УЧАСТКА ТРЕТЬЕЙ ХРОМОСОМЫ И НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ

Полина Орлова^{1, 2}, Мария Гридина¹, Алексей Кораблев¹, Олег Серов¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск Россия

p.orlova@g.nsu.ru

Широкое применение метода сравнительной геномной гибридизации выявило высокую частоту встречаемости