

# КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

ISSN 1075-775X

Том V, № 3, 2010



## В НОМЕРЕ:

- Материалы III Международного симпозиума «Актуальные вопросы клеточных технологий»
- Состояние, возможности и перспективы развития клеточных технологий: региональные аспекты
- Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядросодержащих клеток пуповинной крови после криоконсервирования
- Аутогенные IL-10-модифицированные дендритные клетки в иммунотерапии рассеянного склероза: анализ первых результатов клинических исследований
- Характеристика мирового рынка клеточных технологий

# КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

---

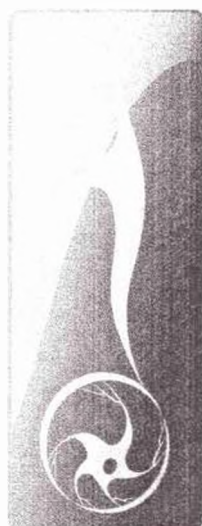
Том V, № 3, 2010

*Журнал рекомендован ВАК Министерства образования  
и науки РФ для опубликования основных научных  
результатов диссертаций на соискание ученой степени  
доктора и кандидата наук*



## СОДЕРЖАНИЕ

<p>ОТ РЕДАКЦИИ ..... 6</p> <p>МАТЕРИАЛЫ III МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ» ..... 14</p> <p>ОБЗОР ..... 57</p> <p><i>Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В., Иезин Г.В., Сухорукова Е.Г.</i> Периферические маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток ..... 57</p> <p>ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ..... 66</p> <p><i>Григорьев Н.Л., Ялвач М.Э., Шафигуллина А.К., Салифутдинов И.И., Киясов А.П., Масгутов Р.Ф., Штарлин Ю.Г., Кабанов А.В., Ризванов А.А.</i> Влияние Плуроника РВ5 на пролиферацию и постнатальную дифференциацию мезенхимных стволовых клеток человека in vitro ..... 66</p> <p><i>Григорьян А.С., Киселёва Е.В., Штанский Д.В., Филипов М.Р., Хамраев Т.К., Топорова А.К., Галиев А.Б., Фаркашди Ш.</i> Новый тип тканеинженерной конструкции на основе политетрафторэтилена с биомиметическим многофункциональным биосовместимым нерезорбируемым покрытием ..... 71</p> <p><i>Григорчук Л.А., Гриценко В.И., Зубов П.М., Зубов О.Л., Рязанцев В.В., Бабийчук Л.В., Будроцева О.В., Любич С.А.</i> Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядросодержащих клеток пупочной крови после криоконсервирования ..... 77</p>	<p><i>Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д., Останкова Л.В., Мацевитая И.Ю., Останков М.В., Сироус М.А., Порожан Е.А., Гольцев К.А., Димитров А.Ю.</i> Проявление иммунокорригирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени разных сроков гестации в условиях развития экспериментальной модели реакции «трансплантат против хозяина» ..... 82</p> <p>ОБЩЕТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ДИСКУССИОННЫЕ РАБОТЫ ..... 87</p> <p><i>В.Е. Рябинин</i> Состояние, возможности и перспективы развития клеточных технологий: региональные аспекты ..... 87</p> <p>КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ ..... 90</p> <p><i>Одинак М.М., Чирский В.С., Бисага Г.Н., Пашенков М.В., Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Калинина Н.М., Давыдова Н.И., Бычкова Н.В., А.В. Поздняков</i> Аутогенные IL-10-модифицированные дендритные клетки в иммунотерапии рассеянного склероза: анализ первых результатов клинических исследований ..... 90</p> <p>STEM CELLS BUSINESS ..... 96</p> <p><i>В.Л. Зорин, В.Р. Черкасов, А.И. Зорина, Р.В. Деев</i> Характеристика мирового рынка клеточных технологий ..... 96</p> <p>ИНФОРМАЦИЯ ..... 116</p> <p>ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ..... 121</p>
---	--



ОАО «Институт стволовых клеток человека»

Гемабанк

ООО «Гемафонд» (Украина)

ThermoFisher Scientific

## Материалы III Международного Симпозиума «Актуальные вопросы клеточных технологий»

Москва, 27 сентября 2010 г.

Д.И. Андреева, И.М. Газизов,  
М.С. Калигин, А.П. Киясов

### Участие трансфицированных мононуклеаров пуповинной крови человека в регенерации печени крыс

ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия

goober@mail.ru

D.I. Andreeva, I.M. Gazizov, M.S. Kaligin, A.P. Kiyasov

### The role of transfected human umbilical cord blood cells in liver regeneration after partial hepatectomy in rats

Цирроз печени занимает первое место среди причин смертности от болезней органов пищеварения. Единственным эффективным методом лечения цирроза на сегодняшний день является трансплантация печени. Однако ее применение весьма ограничено проблемой нехватки донорских органов, а также возможностью отторжения трансплантированного органа и необходимостью пожизненного приема иммуносупрессивных препаратов. В качестве альтернативы трансплантации печени могут быть разработаны и внедрены методы регенеративной медицины и, в частности, трансплантация стволовых/прогениторных клеток. В клеточной медицине возможно применение как аллогенных, так и аутогенных клеток для лечения ряда заболеваний печени. Однако существуют болезни печени, например наследственные метаболические нарушения, в отношении которых применение аутогенных стволовых клеток очень ограничено. В таком случае весьма перспективным направлением станет разработка методов генетической модификации стволовых и прогениторных клеток и трансплантация готовых «генетически вылеченных» клеток таким больным.

Цель исследования: изучить участие генетически модифицированных мононуклеаров пуповинной крови человека в регенерации печени крыс после частичной гепатэктомии.

Материал и методы. Исследование проведено на 15 беспородных крысах-самцах, которым производили операцию частичной гепатэктомии (ЧГ) по методике Хиггенса и Андерсона и интраоперационно внутриселезеночно вводили  $1 \times 10^6$  ядросодержащих клеток пуповинной крови человека, трансфицированных

геном зеленого флуоресцирующего белка. Трансфекцию мононуклеарной фракции пуповинной крови человека проводили методом электропорации при вольтаже 300, ёмкости 1500 мкф. Животных забивали под эфирным наркозом через 2, 5, 7 сут. после операции, затем органы фиксировали и заливали в парафин по стандартной гистологической методике.

Парафиновые срезы окрашивали иммуногистохимически с моноклональными антителами к зеленому флуоресцентному белку (GFP, разведение 1:800, SIGMA, USA), человеческому лейкоцитарному антигену (HLA-ABC, разведение 1:10, DAKO, Denmark), специфическому антигену гепатоцитов человека (HSA, разведение 1:50, DAKO, Denmark), маркеру гепатобластов и показателю их секреторной активности ( $\alpha$ -фетопротейну, разведение 1:200, DAKO, Denmark). Также клетки выявляли на флуоресцентном микроскопе по свечению зеленого флуоресцирующего протеина.

Результаты. Установлено, что трансплантированные генетически модифицированные клетки пуповинной крови человека довольно быстро попадают в печень: на всех исследованных сроках по результатам флуоресцентной микроскопии было выявлено свечение зеленого флуоресцирующего протеина в этом органе. Для определения морфологии этих клеток провели дополнительное окрашивание срезов печени антителами к GFP и выявили присутствие зеленого флуоресцентного белка в гепатоцитах, синусоидных клетках и холангиоцитах уже на ранних экспериментальных сроках. В это же время мы наблюдали в печени экспрессию HLA-ABC – антигена главного комплекса гистосовместимости, широко представленного всеми ядросодержащими клетками человека. Уже на 2 сут. данный маркер клеток человека присутствовал в синусоидных клетках и гепатоцитах. На 5 сут. были выявлены также небольшие HLA-ABC позитивные клетки, находящиеся в структуре порталных трактов, вблизи желчных протоков. Более того, на 7 сут. HLA-ABC позитивные холангиоциты появлялись в структуре мелких новообразующихся протоков.

Полученные нами экспериментальные данные не оставляют сомнений, что генетически модифицированные стволовые клетки пуповинной крови человека мигрируют в печень и дифференцируются в паренхиматозные и непаренхиматозные клетки печени. Но являются ли эти клетки функционально активными или

Ю.А. Швед<sup>1, 2</sup>, М.И. Блинова<sup>1</sup>, А.Ю. Билибин<sup>2</sup>,  
Г.П. Пинаев<sup>1</sup>

**Создание клеточного продукта на основе  
клеток кожи человека – кератиноцитов  
и биodeградируемой полимерной плёнки**

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

ulychka@mail.ru

Yu.A. Shved, M.I. Blinova, A.Yu. Bilibin, G.P. Pinaev

**Engineering a cell-based product from human  
skin cells – keratinocytes – and a biodegradable  
polymeric film**

Проблема восстановления повреждённых тканей и органов является перспективным направлением современной регенеративной медицины. Одним из приоритетных направлений регенеративной медицины является восстановление структурной целостности кожных покровов, повреждённых в результате ожогов, трофических язв и воздействий другого рода. Для этой цели выращенный *in vitro* клеточный пласт эпителиальных клеток – кератиноцитов, должен быть перенесён на поражённый участок кожи. Однако для отделения клеточного пласта от поверхности культурального сосуда, необходима обработка протеолитическими ферментами. Такая обработка приводит к частичному повреждению рецепторов, находящихся на поверхности клеток. Полимерные матрицы, позволяющие культивировать на них кератиноциты человека с образованием многослойного клеточного пласта, при совместном переносе их в область повреждения, позволят исключить процедуру обработки клеток, выращиваемых по известным технологиям, протеолитическими ферментами и ускорить процесс заживления ран.

Цель исследования – разработка биodeградируемой полимерной матрицы, предназначенной для культивирования клеток кожи человека с целью их трансплантации на повреждённый участок кожи.

В процессе исследования были решены следующие задачи: отработаны условия формирования полимерных плёнок для свободного доступа к клеткам питательных веществ и отвода продуктов метаболизма и определена скорость их деградации в условиях культивирования клеток и после имплантации в организм лабораторных животных. Разработаны методы модификации поверхности полимерных плёнок и подобраны оптимальные условия для культивирования клеток кожи на этих плёнках.

В.И. Шепитько, Е.С. Якушко

**Влияние трансплантации криоконсервированной  
плаценты на течение экспериментального  
неврита зрительного нерва**

Высшее государственное учебное заведение Украины  
«Украинская медицинская стоматологическая академия»,  
Полтава, Украина

v.i. umsa@mail.ru, alyasv@yahoo.com

V.I. Shepit'ko, Ye.S. Yakushko

**The influence of cryopreserved placenta transplantation  
on the flow of optic nerve's experimental neuritis**

Исследования последних лет показали, что криоконсервированные препараты плаценты при их трансплантации выступают в роли естественных стимуляторов иммунных сил организма, оказывают иммунокорриги-

рующее, радиопротекторное, противоопухолевое, противовоспалительное действие. В то же время, механизм противовоспалительного эффекта криоконсервированной плаценты изучен недостаточно.

Целью нашего исследования было изучение влияния трансплантации криоконсервированной плаценты на морфофункциональное состояние зрительного нерва крыс при остром асептическом неврите в отдаленные сроки эксперимента.

Экспериментальная работа проведена на 60 половозрелых крысах линии «Вистар». Материалом для исследования служила ретробульбарная часть зрительного нерва крыс. Животные были распределены по трем группам: 1 группа – контрольная (20 крыс), во 2-й группе – животным (20 крысам) однократно внутрибрюшинно был введен л-каррагинан (5 мг в 1 мл физиологического раствора), в 3-й группе (20 крыс) – на фоне вызванного асептического воспаления однократно под кожно трансплантирована криоконсервированную плаценту размерами 0,5×0,5×0,5 см. Выведение животных из эксперимента было произведено путем передозировки наркоза на 10, 14, 21 и 30-е сут. эксперимента. Материал обрабатывали по общепринятой методике, принятой в электронной микроскопии. Полутонкие срезы окрашивали толудиновым синим, полихромным красителем и изучали в световом микроскопе.

На 10-е сут. у животных 3-й экспериментальной группы наблюдали постепенное восстановление морфологических структур зрительного нерва, в отличие от 2-й группы. Было отмечено восстановление микроскопического строения оболочек зрительного нерва. Диаметры артериол и капилляров в них не отличались от группы контроля. Вены были еще немного расширены. Значения толщины соединительнотканной септы внутри нерва статистически не отличалась от контроля. Нервные волокна на поперечных срезах были округлой формы, покрыты миелиновой оболочкой, их средний диаметр соответствовал диаметру нервных волокон группы контроля. Объем ядер клеток макроглии и ядерно-цитоплазматическое отношение были меньше по сравнению с контролем, но достоверно больше, чем в группе животных с асептическим воспалением, что говорит о более раннем восстановлении функций клеток.

14 сут. характеризовались дальнейшим возобновлением структуры сосудисто-стромального и паренхиматозного компонентов зрительного нерва крыс 3-й экспериментальной группы. В этот период в зрительном нерве животных 2-й группы наблюдались изменения подобные таковым в 3-й группе на 10-е сут. эксперимента.

На 30-е сут. мы наблюдали практически полное восстановление морфологической структуры зрительного нерва животных, которым на фоне асептического неврита была трансплантирована криоконсервированная плацента. Во 2-й группе после экспериментального неврита восстановились мозговые оболочки, микроциркуляторное русло зрительного нерва. Нервные волокна были неправильной формы, меньшего по сравнению с контролем диаметра. Ядра клеток макроглии имели меньший, чем в контроле, объем и ядерно-цитоплазматическое отношение.

Таким образом, при трансплантации криоконсервированной плаценты зрительный нерв крыс после экспериментального неврита восстанавливался практически полностью. Морфофункциональных изменений в нервных волокнах и клетках макроглии не наблюдалось.