

проведено путём трансфекции ВВ-МСК синтетическими олигонуклеотидами. Эффект от применения ВВ-МСК оценивали с использованием *in vitro* модели дедифференцировки миофибробластов человека (ИЦХ, вестерн-блоттинг, ОТ-ПЦР, модель контракции коллагенового диска) и *in vivo* модели индуцированного блеомицином фиброза лёгких у мышей C57Bl/6, с интратрахеальным введением ВВ-МСК через 14 дней после введения блеомицина.

Мы показали, что у животных в группе с введением ВВ-МСК площадь депонированного коллагена и выраженность фиброза легких по шкале Эшкрофта значительно уменьшились, а площадь функциональной легочной ткани увеличилась на 40–45% по сравнению с контрольными группами. Мы предположили, что такое влияние ВВ-МСК на прогрессирование фиброза основано на их способности регулировать трансдифференцировку стромальных клеток в активированные фибробласты и миофибробласты — основные драйверы фиброза. Мы показали, что *in vitro* ВВ-МСК стимулировали дедифференцировку миофибробластов на морфологическом и функциональном уровнях за счет переноса специфических микроРНК. Мы продемонстрировали, что не одна микроРНК, а комплекс, состоящий из микроРНК-129 и -29с, оказал решающее влияние на наблюдаемые эффекты *in vitro* и *in vivo*. Данные микроРНК подавляют синтетическую активность клеток, уменьшая синтез коллагена I типа, а также способствуют дедифференцировке клеток, снижая количество компонентов фокальных контактов — винкулина, альфа-актинина 1 и 4 типа. Подавление микроРНК-129 и -29с в ВВ-МСК значительно снизило их антифибротический эффект *in vivo*, что привело к увеличению количества активированных фибробластов, миофибробластов и фибротических очагов в легких.

Таким образом мы показали, что комплекс специфических микроРНК, состоящий из микроРНК-29с и -129 и переносимый в составе ВВ-МСК, способен стимулировать дедифференцировку миофибробластов *in vitro* и *in vivo*, тем самым способствуя подавлению прогрессирования фиброза. Работа поддержана РФФИ (№ 20-04-60487 и № 20-315-90120).

РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТОДОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ЛЕНТИВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ, КОДИРУЮЩИМИ КОРОТКИЕ ШПИЛЕЧНЫЕ РНК

Л.С. Басович¹, А.Б. Малашичева²

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: L.Basovich@yandex.com

Ключевые слова: РНК-интерференция, короткие шпилечные РНК, лентивирусный вектор, трансдукция, трансфекция, сайленсинг генов.

РНК-интерференция представляет собой механизм посттранскрипционного геноспецифического сайленсинга, обусловленного деградацией мРНК в эукариотических клетках посредством ее узнавания комплементарной малой интерферирующей РНК (миРНК), находящейся в комплексе RISC с белком AGO-2, обладающим эндонуклеазной активностью.

Применение метода трансфекции миРНК неэффективно в связи с непродолжительным нокдауном гена. Другая

форма РНК-интерференции включает использование коротких шпилечных РНК (кшРНК), доставляемых трансдукцией лентивирусными векторами, что позволяет получить клеточную линию со стабильным нокдауном гена.

Целью исследования являлось выявление наиболее эффективного сочетания введения шпилечных конструкций для подавления сверхэкспрессии гена.

Для реализации РНК-интерференции были сконструированы лентивирусные частицы, кодирующие ген комплементарной кшРНК. Регулирование экспрессии рассматривалось в двух сочетаниях: трансдукцией кшРНК через 24 часа после активации гена интереса и реализацией РНК-интерференции за 24 часа до сверхэкспрессии. В качестве генов интереса выступал ген GFP, ген ZBTB-16 и гены сигнального пути Notch (рецепторы Notch1, 3, 4).

Результаты эффективности применения метода РНК-интерференции были оценены методами ПЦР в реальном времени через 48 часов, проточной цитометрией через 72 часа и иммунофлуоресцентной окраской клеток через 96 часов после трансдукции.

Анализ экспрессии гена GFP показал эффективное сочетание трансдукции вирусом, кодирующим кшРНК, за 24 часа до сверхактивации.

Анализ экспрессии гена *HEY1* методом количественной ПЦР указал на наибольшую эффективность сайленсинга при запуске механизма РНК-интерференции за 24 часа до сверхэкспрессии генов рецепторов сигнального пути Notch.

Подавление экспрессии транскрипционного фактора ZBTB-16, напротив, эффективнее при трансдукции лентивирусными частицами, кодирующими соответствующую кшРНК, через 24 часа после активации целевого гена.

Таким образом, последовательность введения генетических конструкций при помощи лентивирусной трансдукции должна быть подобрана индивидуально для каждой пары ген-кшРНК. Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-14-00152.

ЖИВАЯ ТРЕХМЕРНАЯ МОДЕЛЬ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА ДЛЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ И ТЕСТИРОВАНИЯ НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ И МЕТОДОВ ТЕРАПИИ

А.Н. Бастрич¹, Д.А. Петрова¹, Б.Я. Алексеев², А.А. Рослякова¹, Д.Г. Бельцевич¹, П.А. Никифорович¹, Н.С. Кузнецов¹, Е.В. Бондаренко¹, С.А. Сергиенко³, Г.Д. Ефремов³, Л.С. Урусова¹

¹ НЦМУ Национальный центр персонализированной медицины эндокринных заболеваний, ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, Россия

³ НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: Bastrich.Asya@endocrincentr.ru

Ключевые слова: раковые органоиды, трехмерная модель опухолевой ткани, аденокортикальный рак, злокачественное новообразование коры надпочечника, органоподобные культуры.

Аденокортикальный рак (АКР) представляет собой редкое злокачественное новообразование коры

надпочечников, отличающееся, как правило, крайне агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом. Общая, неранжированная по стадиям заболевания, пятилетняя выживаемость колеблется от 16 до 38% [1].

Персонализированная терапия позволяет существенно повысить эффективность лечения онкобольных [2]. Трехмерные раковые органоидные культуры (органойды) можно получать из биопсий или резекций опухолей, размножать *ин витро* и хранить в замороженном виде с возможностью разморозить живую культуру в любое время [3]. Органойды сохраняют генетическую и клеточную гетерогенность исходной опухоли и позволяют определять индивидуальный ответ опухоли на лекарственную терапию/метод с наивысшей для *ин витро* моделей предсказательной силой [4]. На сегодняшний момент, вероятность получения персонализированной самоподдерживающейся линии органойдов может достигать 95% и зависит от вида рака. Разработаны методики получения органойдов рака молочной железы, рака яичников, рака легкого, рака кишечника, рака предстательной железы и др. [5], но нет ни одной публикации об успешном культивировании органойдов АКР.

Критически важными компонентами системы культивирования раковых органойдов являются: среда культивирования, внеклеточный матрикс для культивирования и метод подготовки образца опухоли перед началом культивирования. Образцы АКР были получены в результате хирургического удаления опухолей, проведенных в НМИЦ эндокринологии. Применение стандартной системы культивирования, успешно опробованной ранее для получения линий органойдов рака прямой кишки, не привело к росту органойдов АКР *ин витро*. В результате анализа опубликованных данных по биологии развития и составам сред для первичных культур, был определен фактор X, который критически важен для роста тканей здорового надпочечника человека *ин vivo* и *ин витро*. Добавление фактора X в среду для культивирования органойдов привело к росту трехмерных клеточных структур АКР, имеющих характерную для органойдов морфологию, и, впервые в мире, позволило получить самоподдерживающуюся линию органойдов классического морфологического варианта АКР. Иммуногистохимический анализ подтвердил злокачественную природу органойдных структур. Источник финансирования — грант НЦМУ 075-15-2020-310.

Литература:

1. Мельниченко Г.А., Алексеев Б.Я., Бельцевич Д.Г. и др. Проблемы эндокринологии. 2014. 60 (2): 51–67.
2. Jackson S., Chester J. Int. J. Cancer. 2015. V. 127. P. 262.
3. Drost J., Clevers H. Nat. Rev. Cancer. 2018. V. 18. P. 407.
4. Kretzschmar K.J. Mol. Med. 2021. V. 99. P. 501.
5. Driehuis E., Kretzschmar K., Clevers H. Nature Protocols. 2020. V. 15. P. 3380.

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ДИНАМИКЕ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Е.И. Бахмет¹, М.Н. Гордеев¹, А.С. Зиновьева^{1,2}, Е.Е. Петренко^{1,2}, А.Н. Томилин¹

¹ ФГБНУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: e.bakhmet@incras.ru

Ключевые слова: Nanog, Oct4, Sox2, ЭСК

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) отличаются способностью к самообновлению и к дифференцировке во все типы соматических, а также в половые клетки, то есть являются плюрипотентными. В последнее время, принято выделять несколько типов плюрипотентных стволовых клеток, в зависимости от стадии эмбриогенеза, работающих сигнальных путей и факторов роста, необходимых для поддержания таких клеток в культуре. Наличие такой динамики плюрипотентных состояний ставит новые задачи в изучении транскрипционных факторов, необходимых для функционирования ЭСК. Кроме того, появляются свидетельства роли некоторых факторов плюрипотентности в определении судьбы клетки — её спецификации в том или ином направлении.

В ходе наших исследований, мы показали, что полиЦ-связывающий белок Pcbp1 необходим для правильного перехода из наивного (раннего) плюрипотентного состояния в праймированное (позднее). Этот белок участвует в тонкой настройке МАРК-сигнального пути, и препятствует дифференцировке в направлении первичной энтодермы. При нокауте Pcbp1 в ЭСК, в начале указанного перехода, помимо активации генов «праймированной» плюрипотентности, происходит запуск экспрессии генов первичной энтодермы, что приводит к апоптозу и замедлению созревания ЭСК.

Также нам удалось выяснить, что экспрессия Nanog необходима для корректной спецификации ЭСК в направлении дефинитивной энтодермы. Уровень этого фактора падает при переходе в «праймированное» состояние. При этом, с началом энтодермальной дифференцировки, экспрессия Nanog ре-активируется, что согласуется с данными, полученными при изучении эмбрионального развития мыши. Мы показали, что элиминация этого фактора не влияет непосредственно на запуск этой спецификации, т.к. наблюдается активация типичных маркеров Sox17 и Foxa2. Однако количество энтодермальных клеток в отсутствие Nanog снижается в пять раз.

Нами также получены новые данные о ключевых аминокислотах Oct4, участвующих в опосредовании контакта с его партнёром — Sox2. Замены этих аминокислот на те, что представлены у его паралога, привели к тому, что этот фактор стал функционировать как индуктор нейроэктодермальной спецификации. В настоящий момент мы работаем над выявлением роли Oct4 и Sox2 в мезодермальной и эктодермальной дифференцировке, соответственно.

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА 2D МОДЕЛИ АНГИОГЕНЕЗА IN VITRO

И.Б. Белоглазова¹, Е.С. Зубкова¹, К.В. Дергилев¹, Ю.Д. Василец¹, Е.В. Парфенова^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия.

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

e-mail: irina.beloglazova@cardio.ru

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, ангиогенез, Notch, EndoMT

Модель ангиогенеза на Матригеле является самой известной и простой 2D моделью *in vitro*. В ней эндотелиальные клетки (ЭК) формируют капиллярно-подобные структуры (КПС) только за счет взаимодействия с ростовыми факторами и белками внеклеточного матрикса (ВМ), входящими в состав Матригеля.