

Госзадание НИР № 25

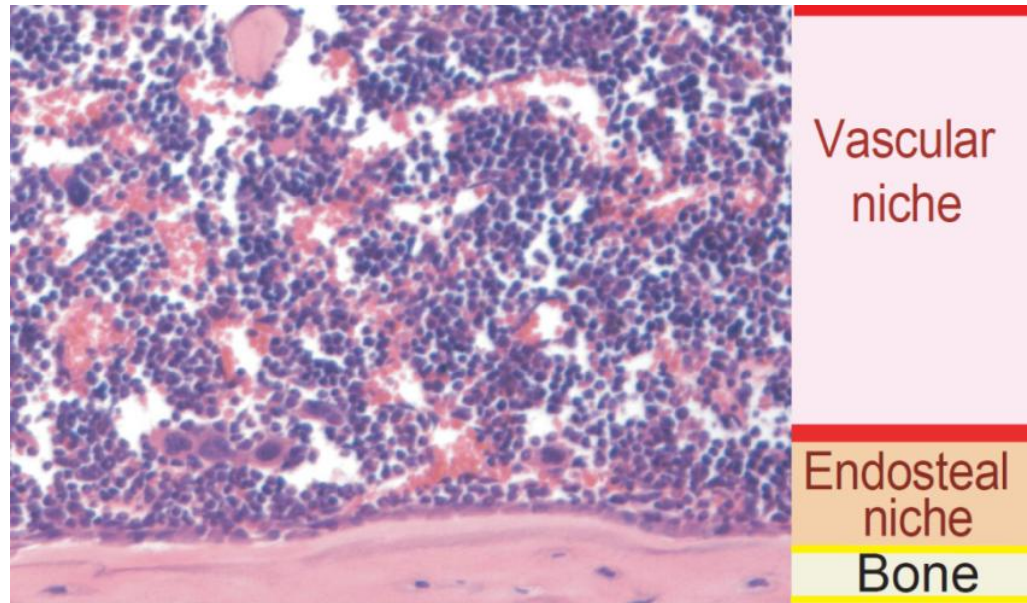
PK01201256250 УДК 61:57 086

**“Изучение взаимодействия мезенхимных
стволовых клеток и эндотелиальных клеток
внутри модели сосудистой ниши костного мозга”**

2012-2014 гг.

Руководитель- проф. А.Ю. Зарицкий

Ниша гемопоэтических стволовых клеток.



Компоненты ниши

- Синусоидные капилляры состоят из специализированных **эндотелиальных клеток**, которые регулируют миграцию/хоуминг ГСК;
- **Мезенхимные стромальные клетки** которые регулирует самоподдержание/дифференцировку ГСК.

(Адоптировано из Boyerinas, 2011)

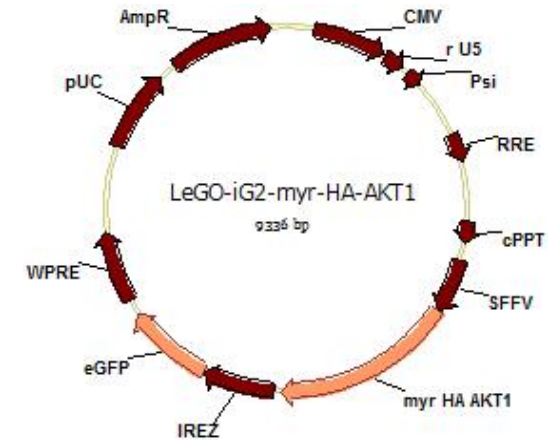
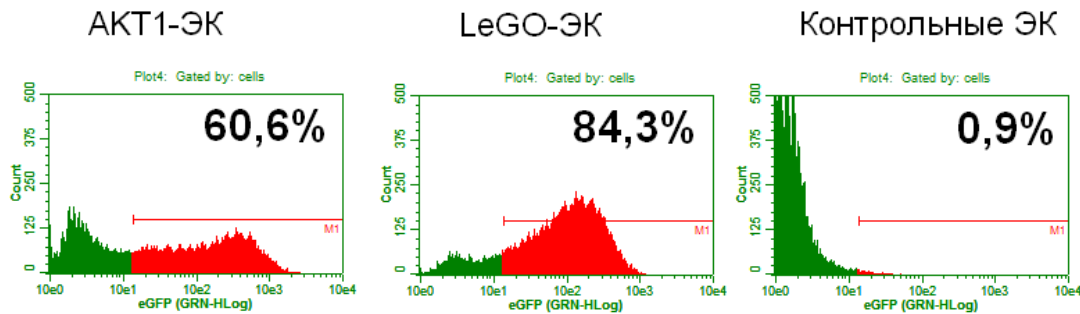


Целью работы являлось моделирование основных компонентов ниши ГСК-эндотелиальных клеток (ЭК) с конститутивно - активным АКТ1; а также мезенхимных клеток с экспрессией лигандов NOTCH1.

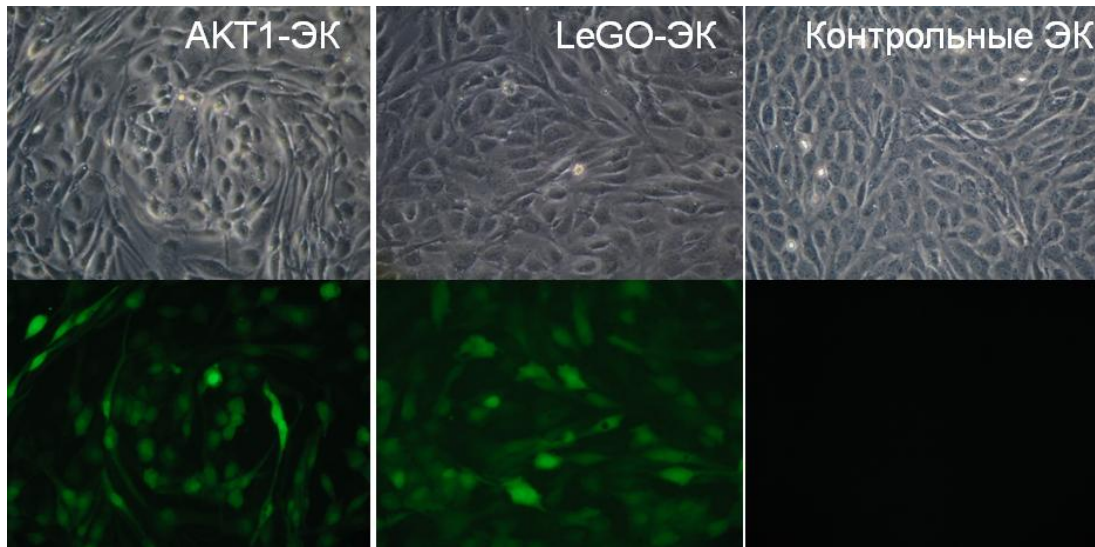
Создание АКТ1 активированного эндотелия.

1. Клонирование АКТ1 с сайтом миристилирования в лентивирусный вектор LeGO-iG2, содержащий eGFP для последующей трансдукции в эндотелиальные клетки (HUVEC).
2. Оценка эффективности трансдукции АКТ1-ЭК в сравнении с LeGO-ЭК и контрольными ЭК:

2.1 Анализ экспрессии eGFP с помощью FACS-анализа.



2.2 Оценка морфологических свойств клеток.



Сокультивирование ГСК с АКТ1-ЭК.

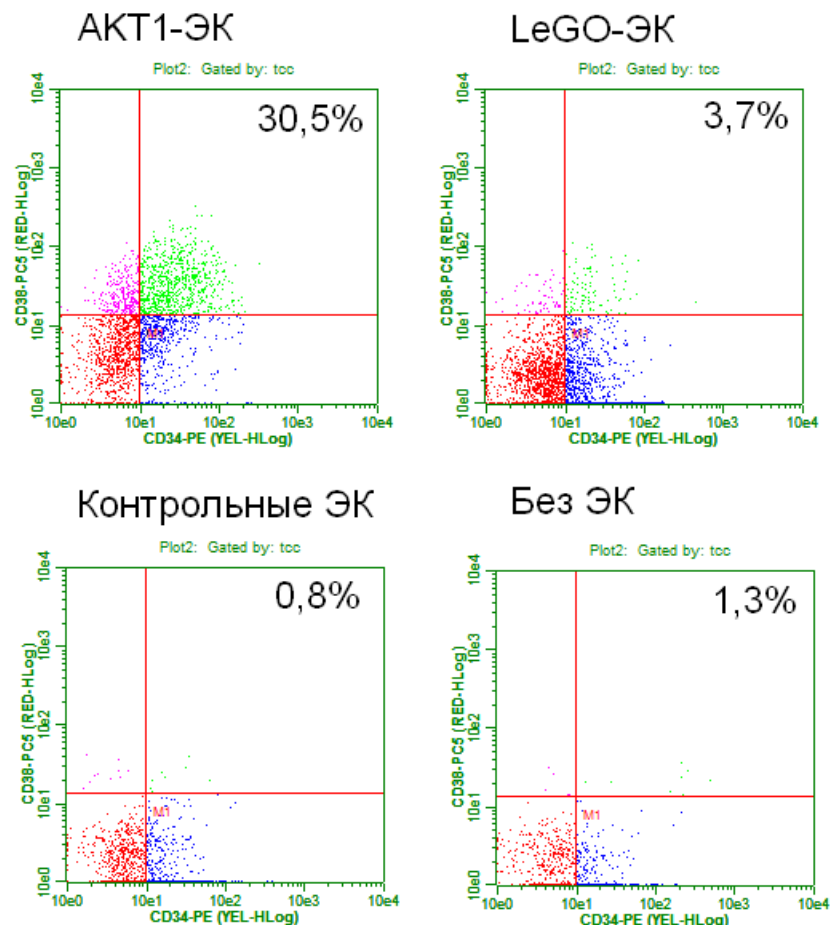
2X10⁴ CD34+ГСК (пуповинная кровь)
сажали на АКТ1-ЭК, LeGO-ЭК,
контрольные ЭК и без ЭК

↓
каждые 2-3 дня

FACS-анализ CD45/CD34/CD38

Результаты после 5 дней сокультивирования:

	CD34+ CD38-	CD34+ CD38+	CD34+ CD38+
АКТ1-ЭК	16,5%	30,5%	47%
LeGO-ЭК	34,2%	3,7%	37,7%
контрольные ЭК	32,1%	0,8%	32,9%
без ЭК	32,4%	1,3%	33,7%

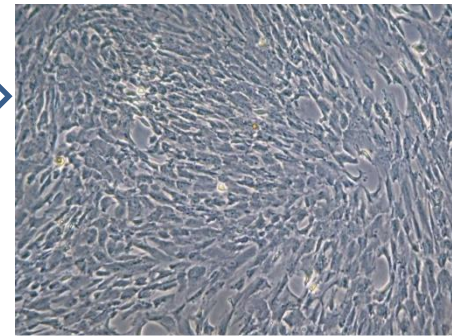
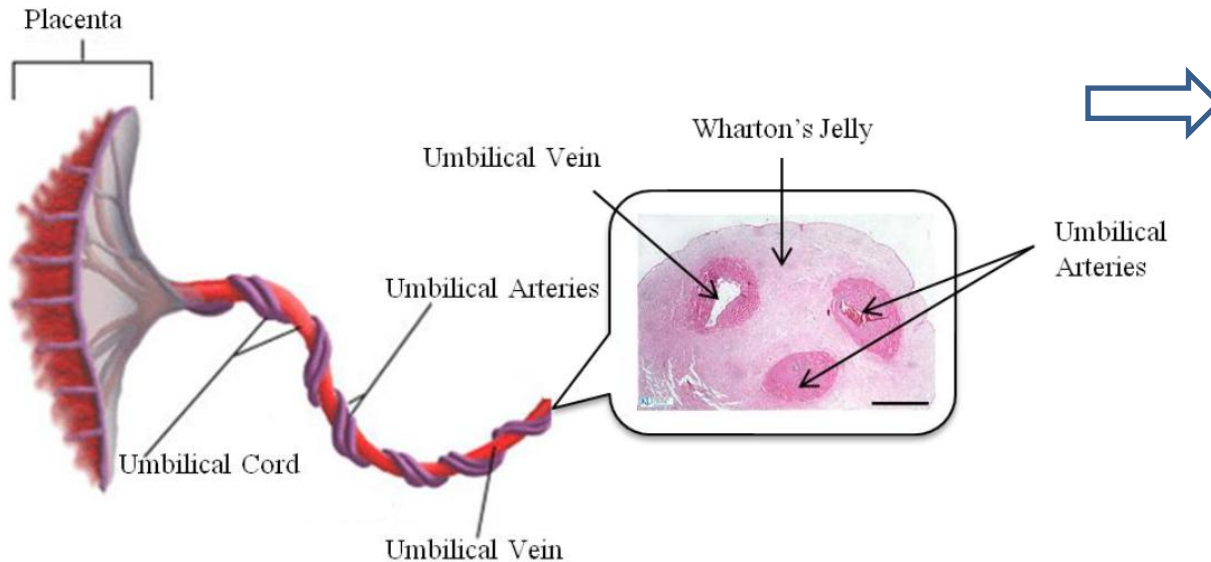


Суммарный процент популяция CD34+38+ возрастал в 1,4 раза после сокультивирования с АКТ1-ЭК в сравнение с культивированием ГСК на пластике без фидерного слоя.



МСК пупочного канатика новорожденного

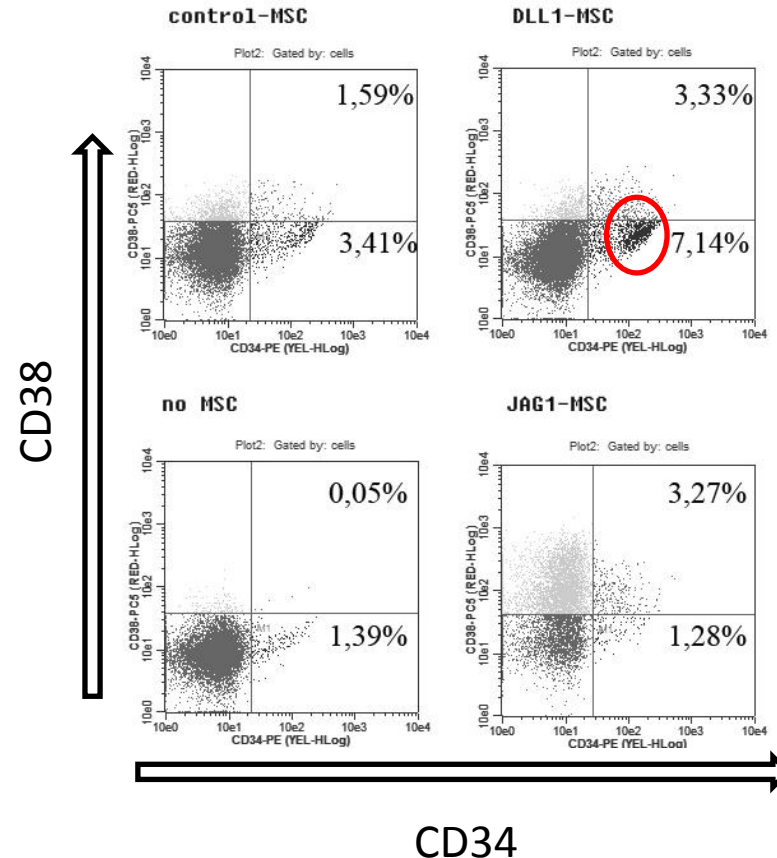
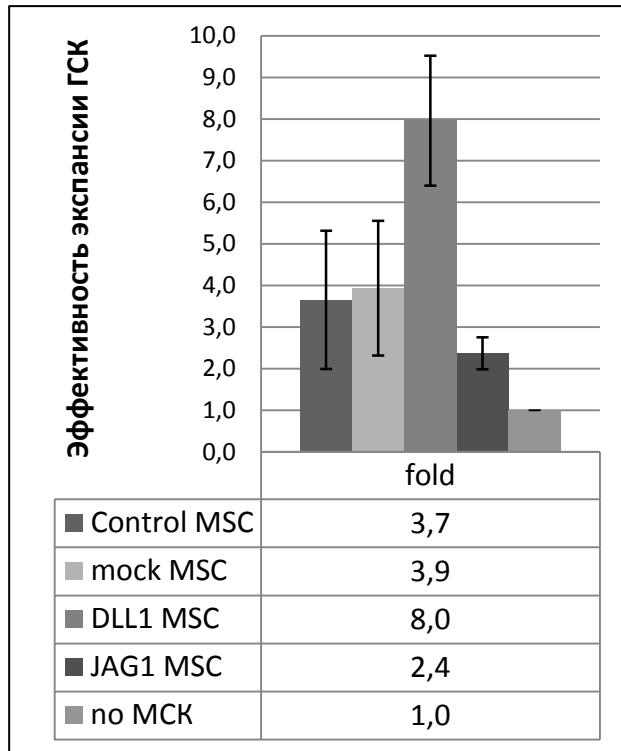
Экстракция путем энзиматического
расщепления ткани Вартоновского студня



Markers	%
IgG	0,58
CD90	99,91
CD144	0,24
CD45	1,48
CD105	60,45
CD19	0,37
CD73	96,89
CD34	0,07



Лентивирусная модификация МСК-ПК с экспрессией лигандов NOTCH: Jag1 и Dll-1



Экспрессия DLL1 МСК-КМ приводит к накоплению CD34+CD38- ГСК и увеличению экспансии в 2 раза по сравнению с контрольными клетками.

Заключение

- Созданные в процессе работы эндотелиальные клетки, экспрессирующие конститутивно-активную киназу Akt1 могут быть использованы в опытах по сокультивированию с ГСК для изучения процессов в сосудистой нише в норме и при патологии.
- МСК Вартоновского студня, модифицированные лигандами NOTCH, в особенности DLL1, способны к поддержанию пролиферации незрелых гемопоэтических клеток-предшественников.
- В результате работы были разработаны системы позволяющие модулировать основные компоненты микроокружения ГСК *in vitro*, что позволяет исследовать различные стороны физиологии ГСК, в том числе при патологиях, и может быть использовано при создании и тестировании новых схем терапии, направленных на взаимодействие между ГСК и клетками микроокружения.