

**Лекция 5**

# **Нанотехнологии в регенеративной медицине**

**Ярыгин Константин Никитич**

**д.б.н., член-корр. РАМН  
зав. лаб. клеточной биологии  
ФГБУ «ИБМХ» РАМН**

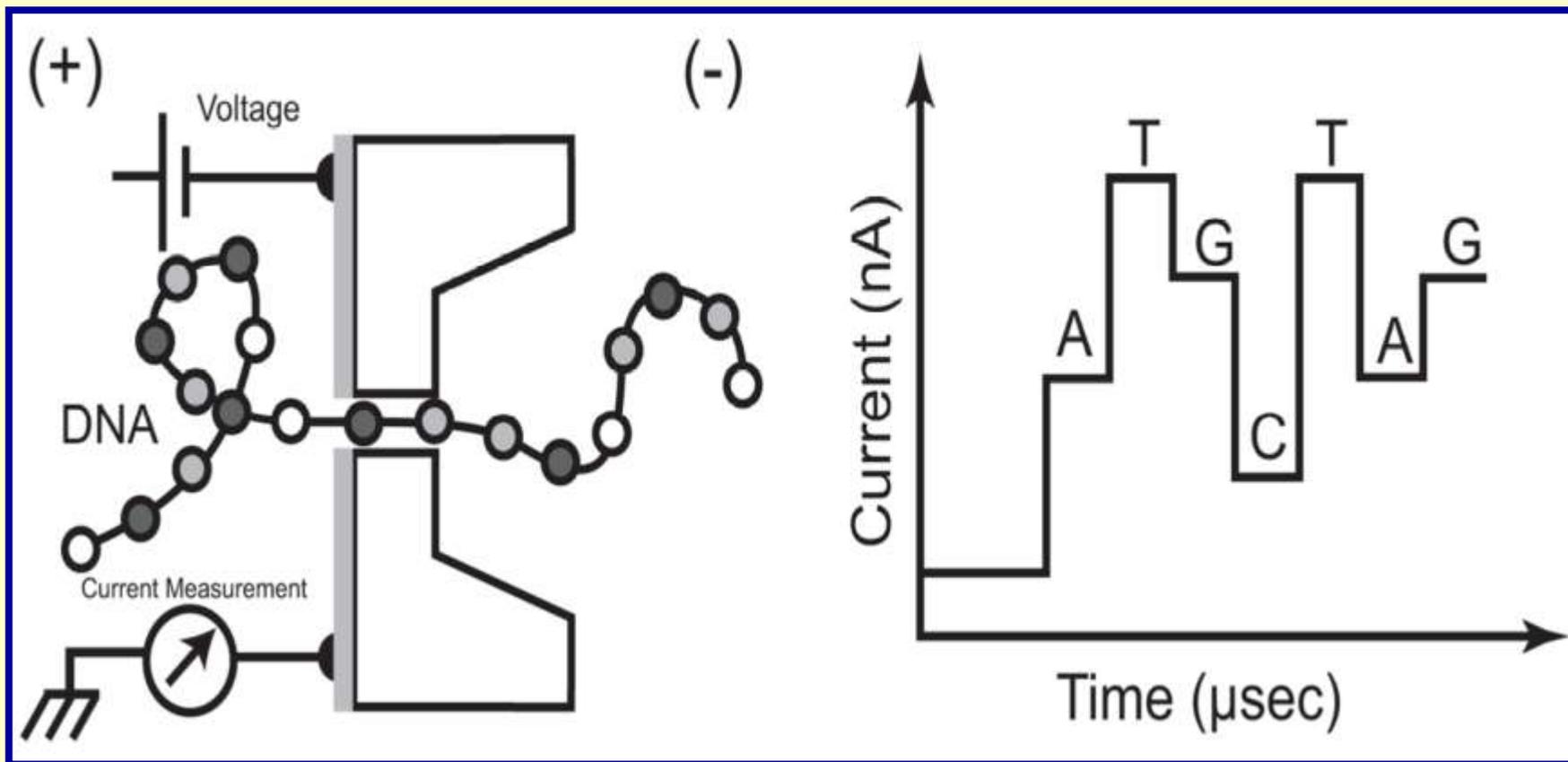
**В настоящее время среди всех направлений научно-технических разработок в области биомедицинских технологий наиболее перспективными представляются два - регенеративная медицина и наномедицина**

# Глоссарий

- ❖ **Регенеративная медицина – направление, призванное создавать технологии частичной или полной регенерации стареющих или поврежденных тканей и органов.**
- ❖ **Нанотехнологии имеют дело с объектами очень малых размеров – примерно от 1 до 100 нм.**
- ❖ **Наномедицина – научно-практическое направление, стремящееся использовать нанотехнологии в биомедицинских исследованиях и для создания новых подходов к диагностике и лечению болезней.**

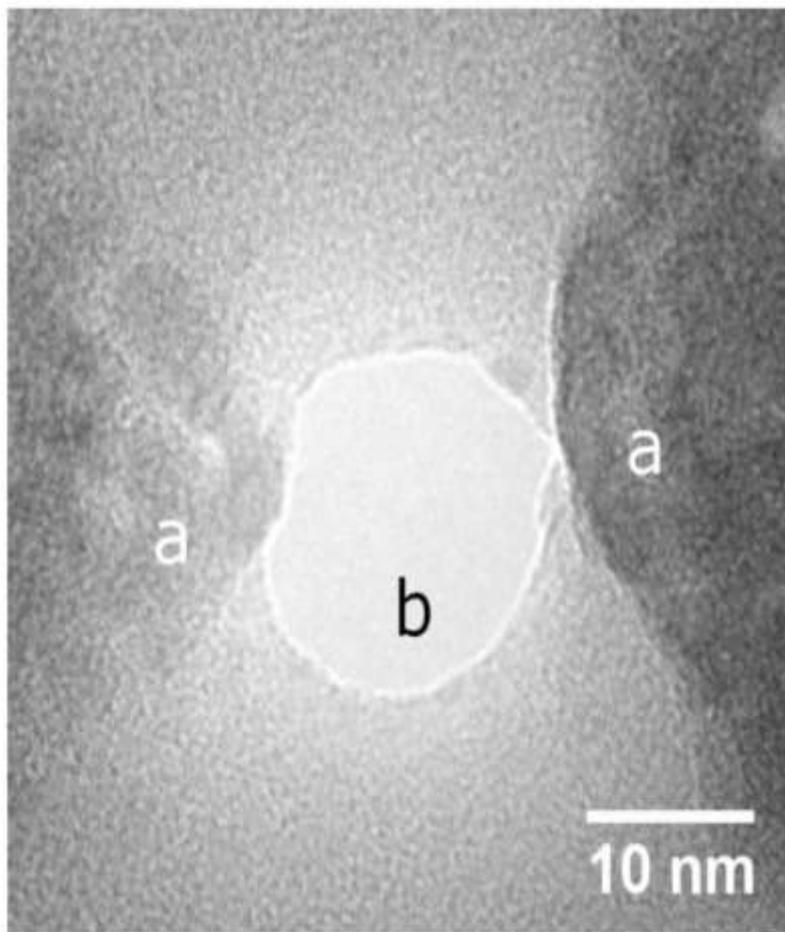
Методы, используемые при изучении СК, но созданные для решения более широкого спектра задач.

Применение нанопор и нанoeлектродов для секвенирования ДНК



Из: Gierhart et al.: *Sens Actuators B Chem.* 2008 June 16; 132(2): 593–600.  
doi:10.1016/j.snb.2007.11.054.  
NIH Public Access

# Нанопора (b) и наноэлектроды (a)



Из: Gierhart et al.:  
*Sens Actuators B*  
*Chem.* 2008 June 16;  
132(2): 593–600.  
doi:10.1016/j.snb.2007.  
11.054.

NIH Public Access

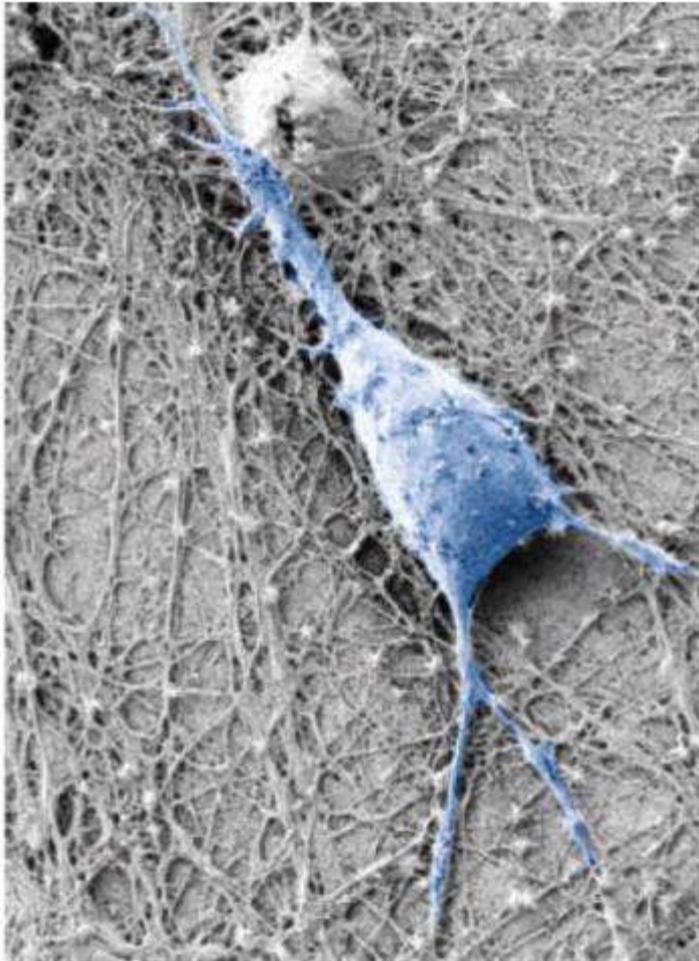
# Наноматериалы для регенеративной медицины

- Нановолокна
- Двумерные матриксы, построенные из нановолокон
  - Скэффолды из наноматериалов
    - Наночастицы

# Нановолокна

- **Используемые в биомедицинских исследованиях и в клинике нановолокна могут быть изготовлены из разных материалов. Очень популярны сейчас нановолокна из углерода с присоединенными функциональными группами, изменяющими адгезию к подложке и связывающими клетки, самособирающиеся пептидные волокна, а также волокна, выделенные из живых организмов – коллагеновые и другие.**
- **Нановолокна используются для изготовления подложек, покрытий, скэффолдов и в других целях.**
- **Преимуществом нановолокон перед более толстыми волокнами является большая поверхность контакта как с субстратом, так и с клетками.**

# Пример использования нановолокон в биомедицинских исследованиях

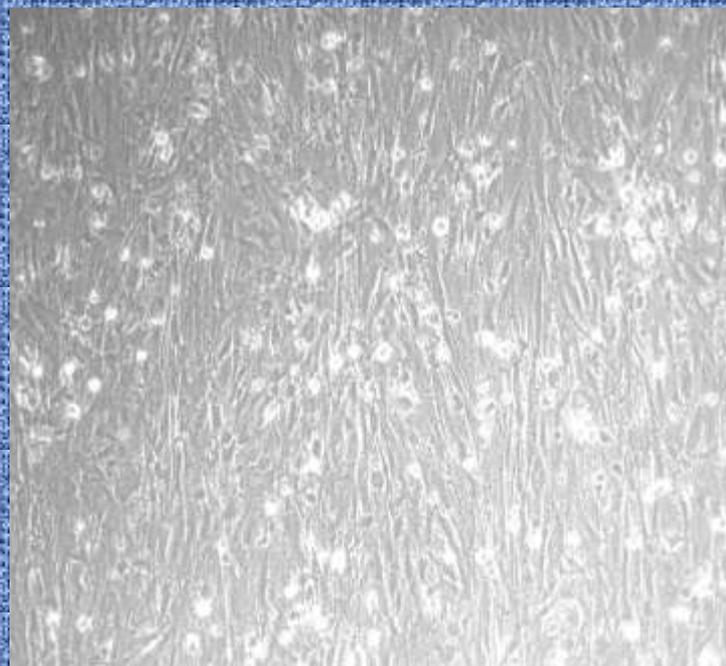
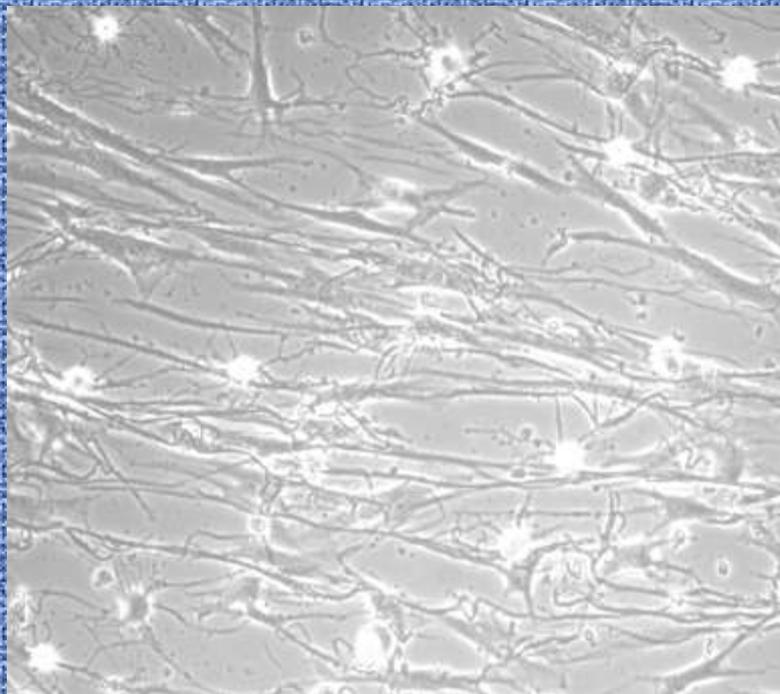


LAURA BALLERINI

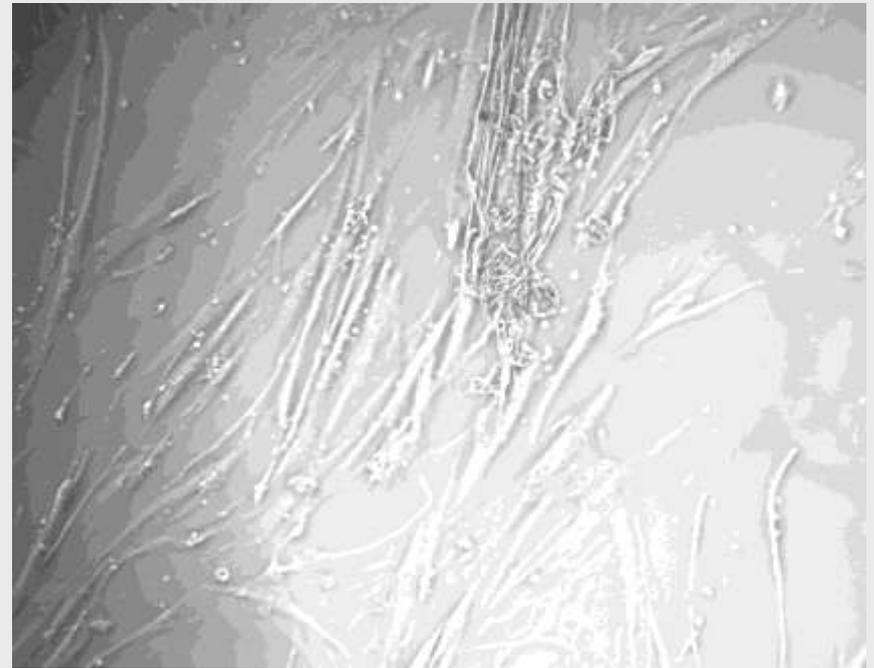
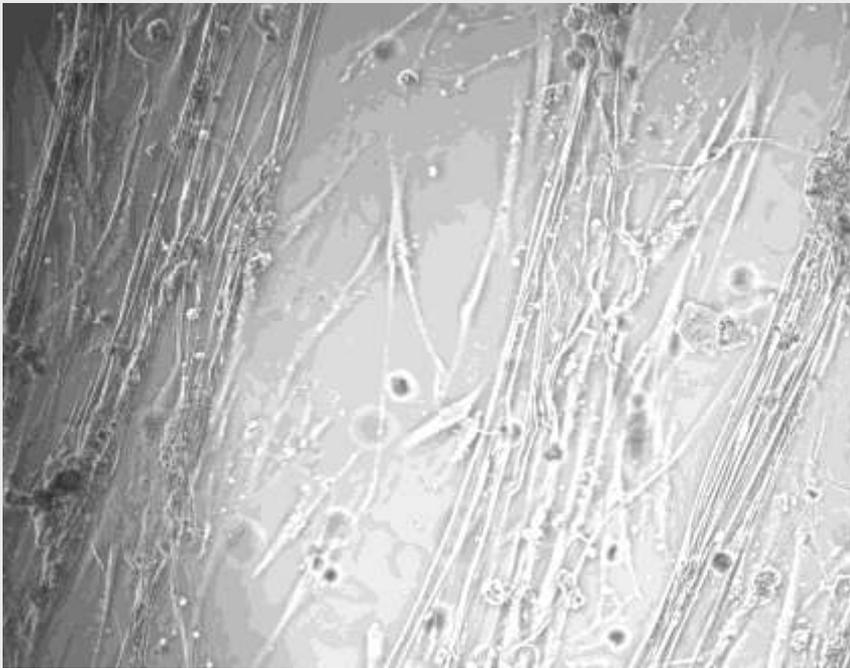
**Микрофотография изолированного нейрона на подложке (матриксе) из углеродных нановолокон, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Углеродные нановолокна повышают возбудимость нейронов, образуя тесные контакты с клеточной мембраной, через которые отводится избыточное электричество.**

From: NIH Public Access Manuscripts, *Nat Nanotechnol.* 2009 February; 4(2): 82–83. doi: 10.1038/nnano.2008.424.

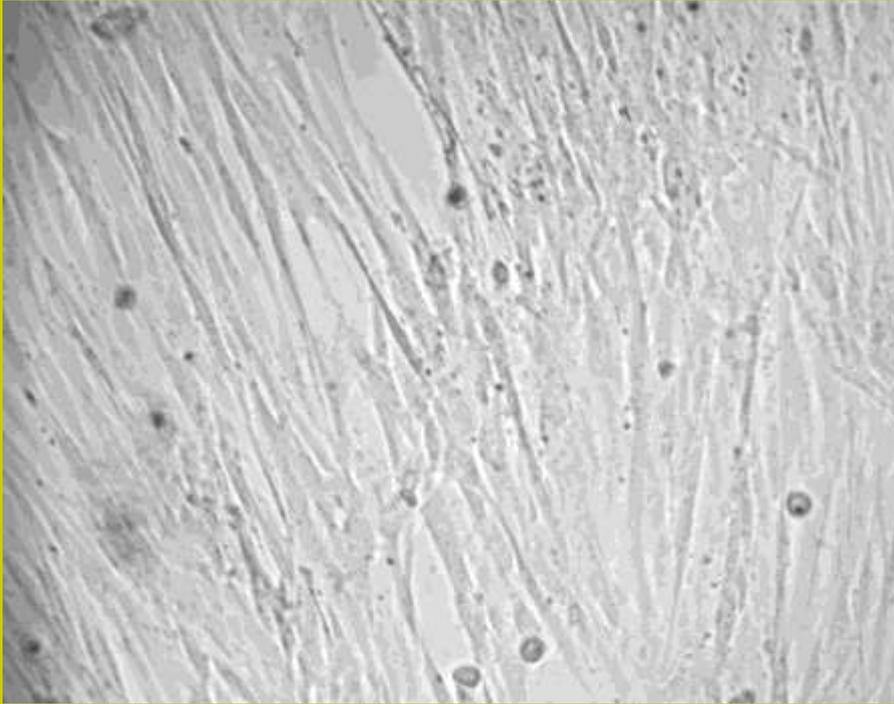
Клетки пульпы молочного зуба, коллаген (collagen Type 1 from rat tail) 3 день после посадки. Видна чёткая ориентация как отдельных отростков, так и всех посаженных клеток.



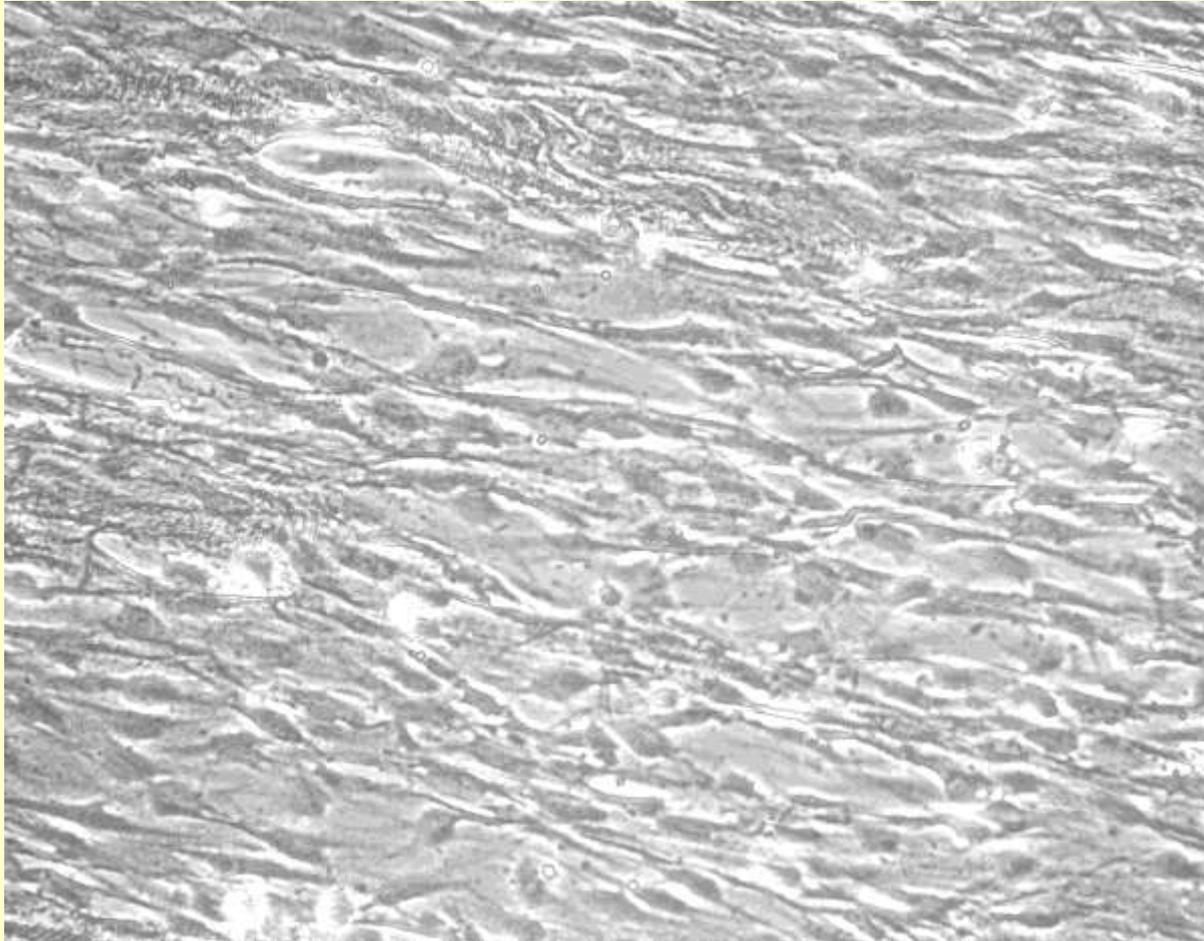
**Клетки плаценты, коллаген (collagen Type 1 from rat tail ) 3-й день после посадки. Клетки садятся ориентированно, но при этом расщепляют часть коллагена и как бы «подъедают» его, сохраняя ориентацию**



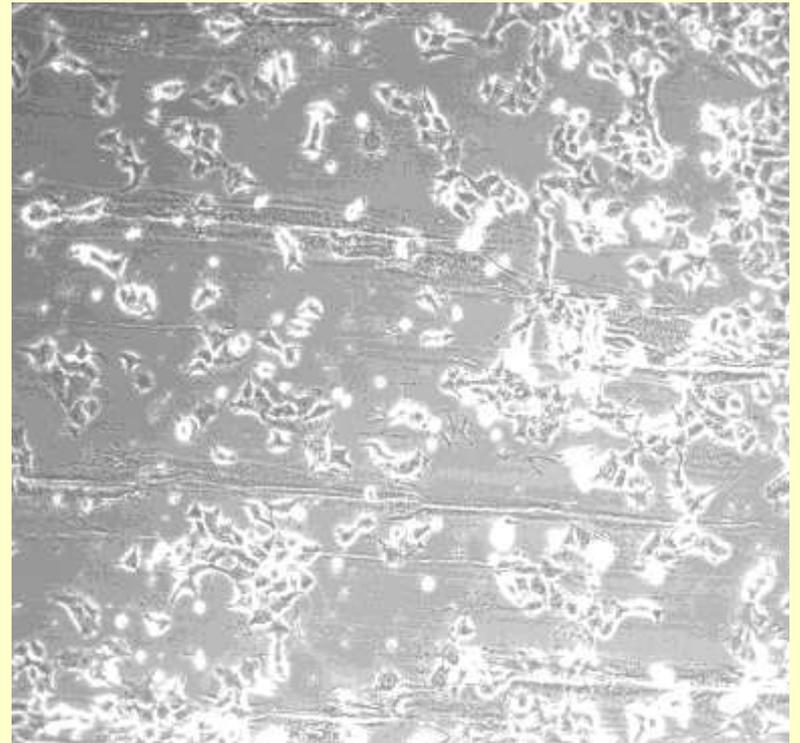
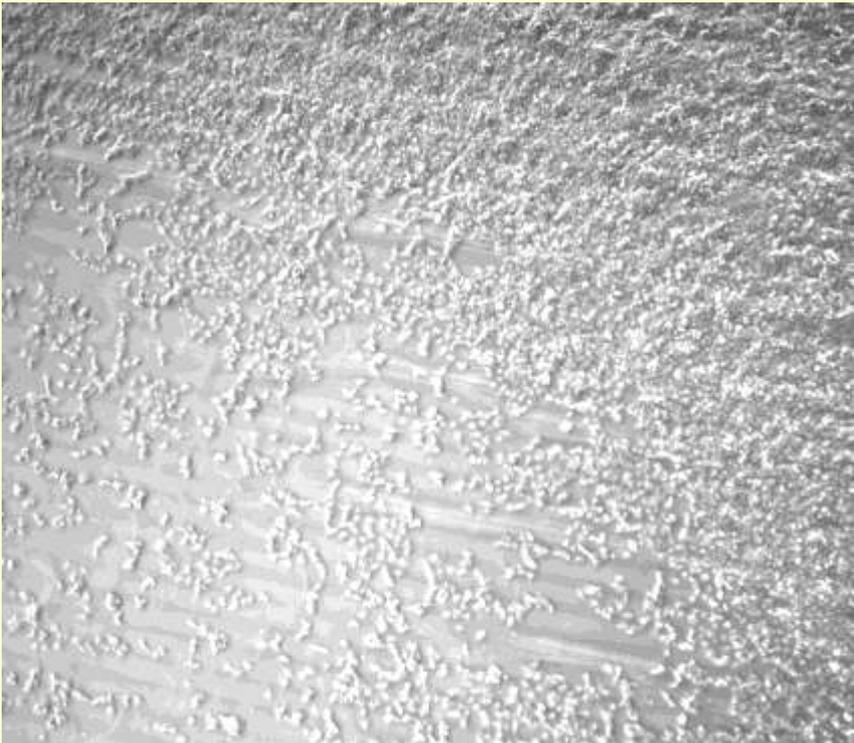
Клетки пуповины UC F-14, коллаген (collagen Type 1 from rat-tail ), 3-й день после посадки.  
Клетки садятся ориентированно, при меньшем увеличении ориентация видна лучше.



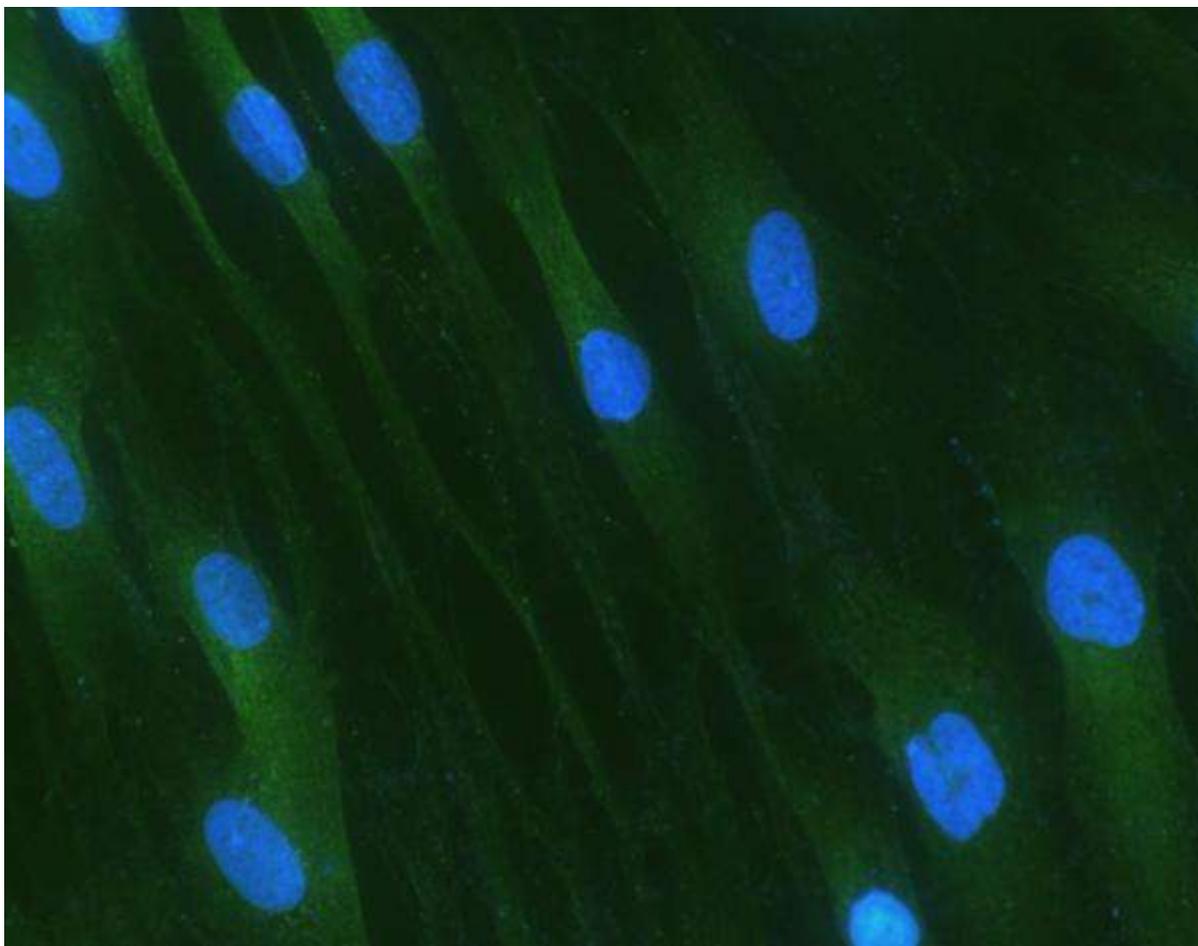
Фибробласты кожи, коллаген (collagen Type 1 from bovine) 1 день после посадки. Видна чёткая ориентация всех клеток



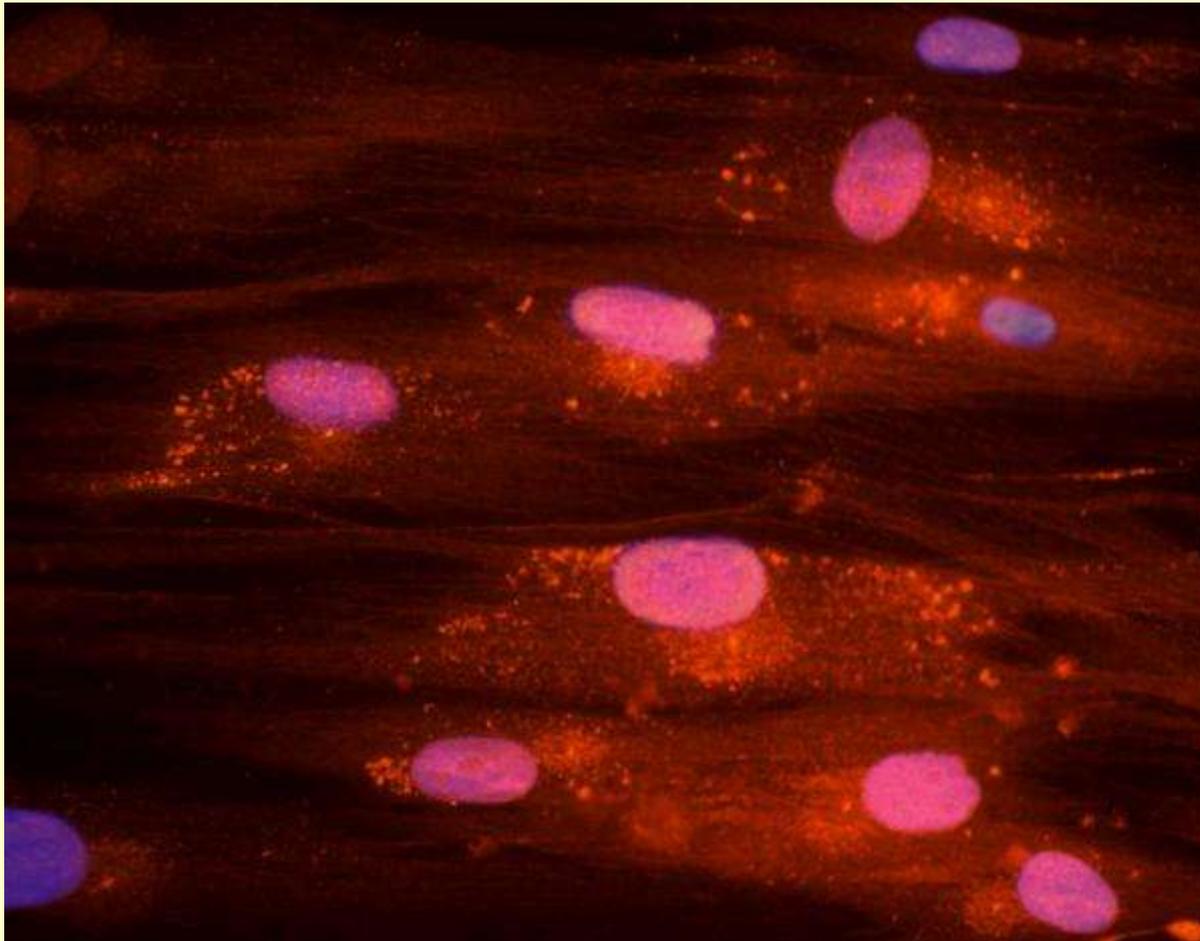
Клетки линии HeLa, (collagen Type 1 from bovine) 1 день после посадки. Ориентации клеток нет.



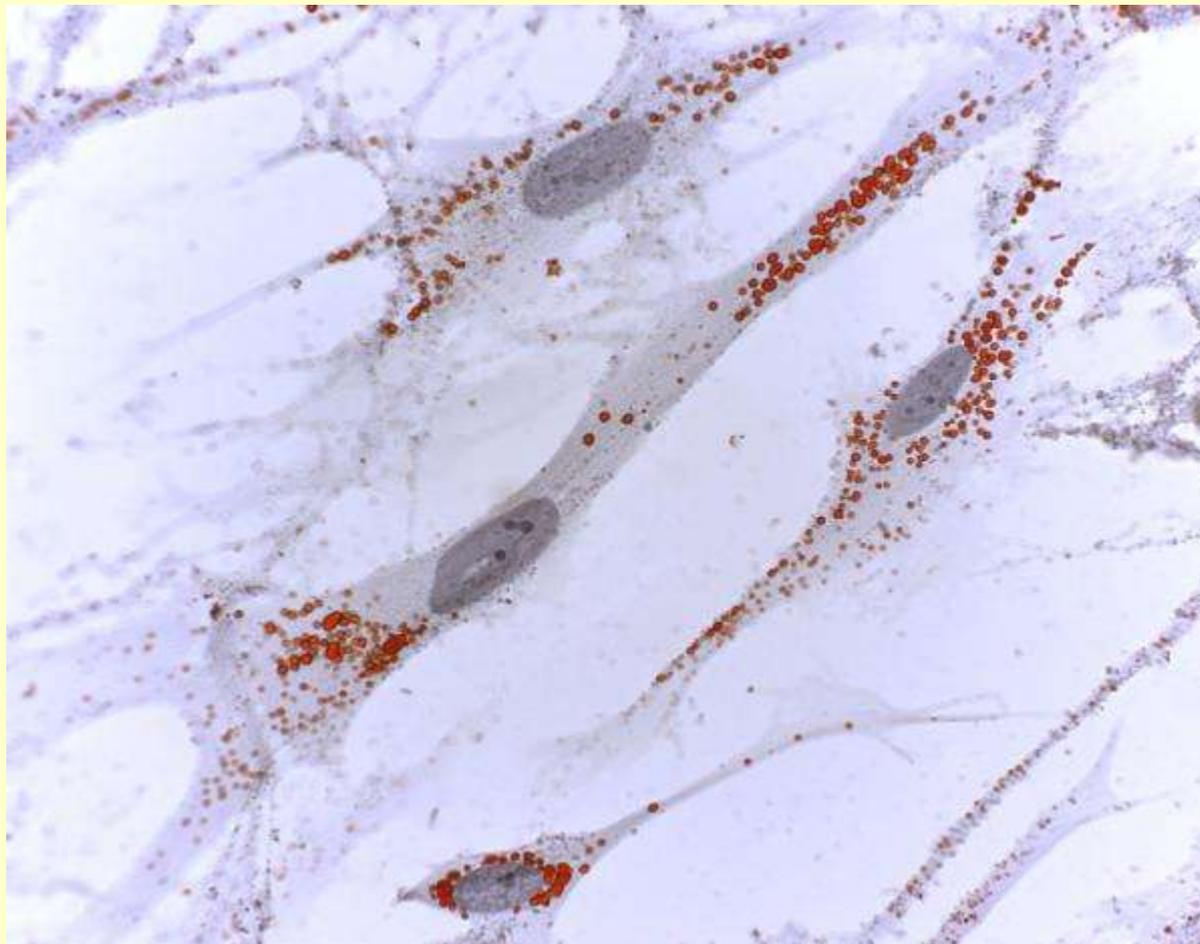
**Экпрессия дентинсиалофосфопротеина ориентированными  
клетками пульпы молочного зуба**



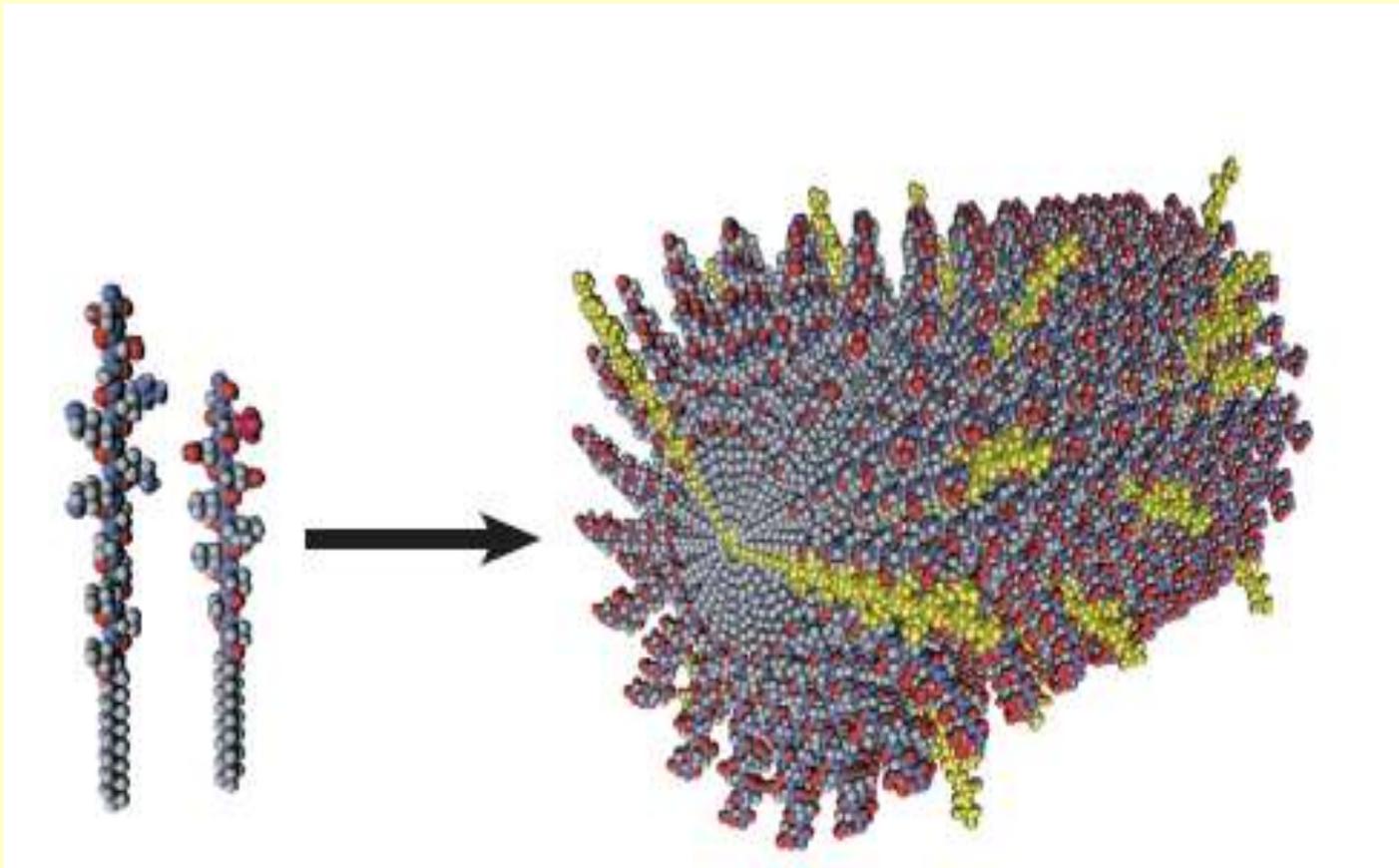
## Экпрессия остеонектина ориентированными клетками пульпы молочного зуба



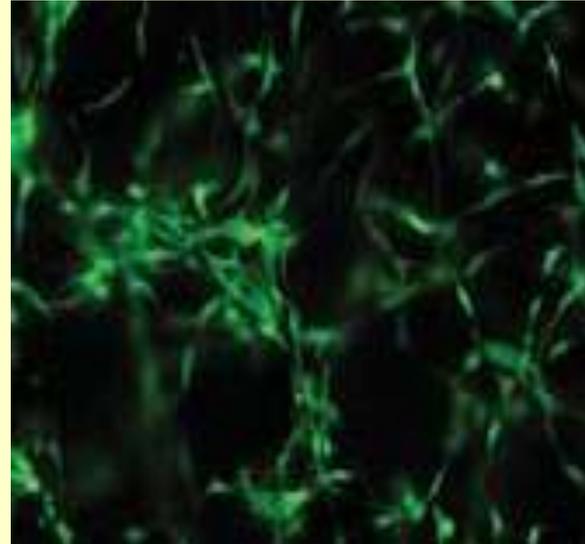
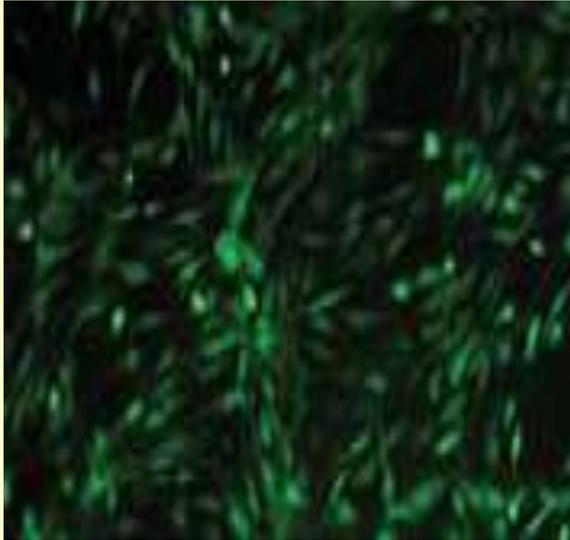
**Адипогенная дифференцировка ориентированных клеток из  
пульпы молочного зуба. Окраска oil red.**



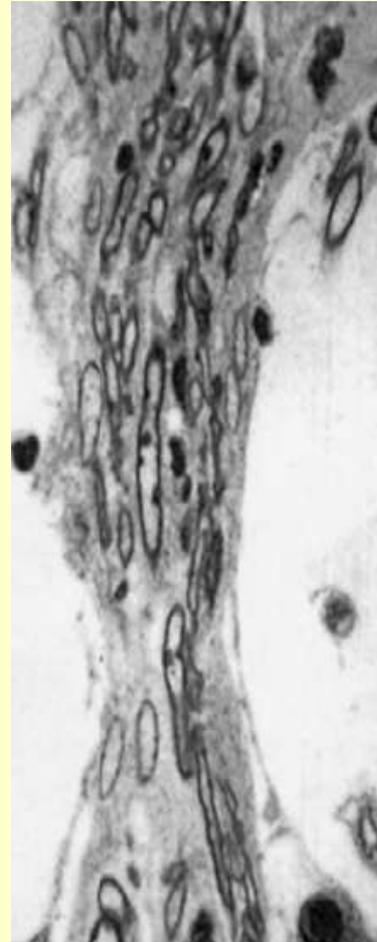
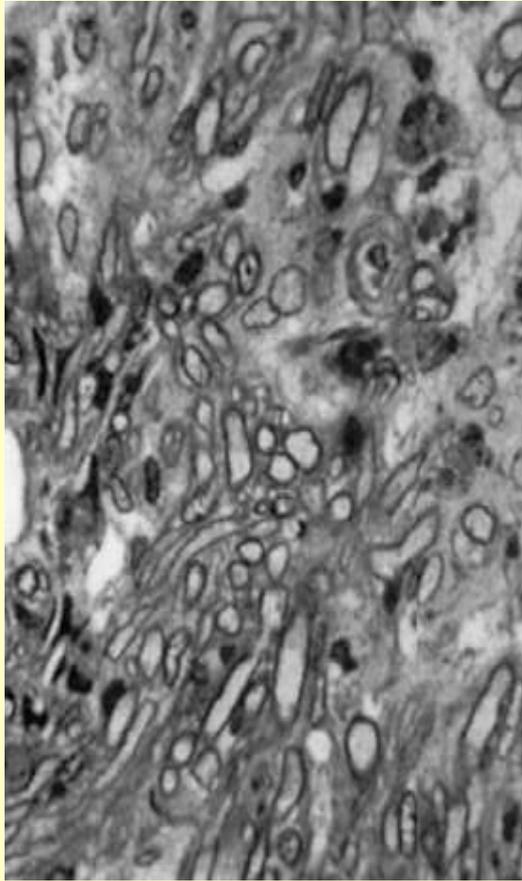
**Цилиндрическое нановолокно, спонтанно образующееся в результате самосборки из амфифильных пептидов, содержащих RGDS-эпитоп**  
**RGDS = Arg-Gly-Asp-Ser**



**Заселение скэффолда из самособирающихся пептидных нановолокон (RADA16 peptide) МСК из плаценты, стабильно трансфецированными GFP**



**Модель торакальной сегментэктомии у крысы. Введение заселенного клетками гидрогеля-скэффолда в зону травмы. 9,5 недель после операции.**



**Исследование механизмов  
трансплантации МСК на модели  
ишемического инсульта у крыс  
животных с использованием  
наноразмерных магнитных  
флюоресцирующих частиц**

# Данные МРТ

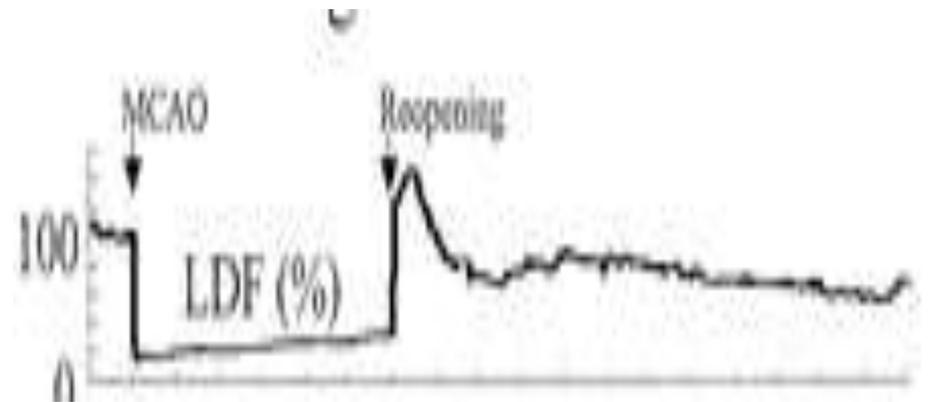
- У всех прооперированных животных развивалась типичная картина локальной ишемии головного мозга, подтверждаемая данными МРТ



Первые сутки после операции.  
Режим T2. Массивный корково-  
подкорковый очаг.

# Преимущества эндovasкулярной модели ОСМА в нашей модификации

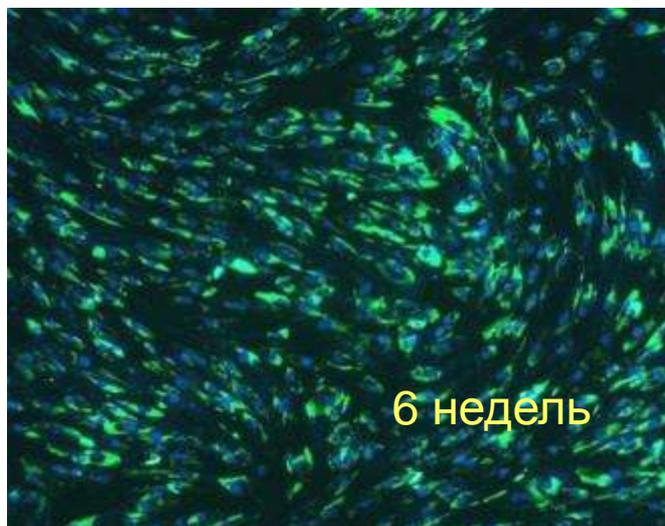
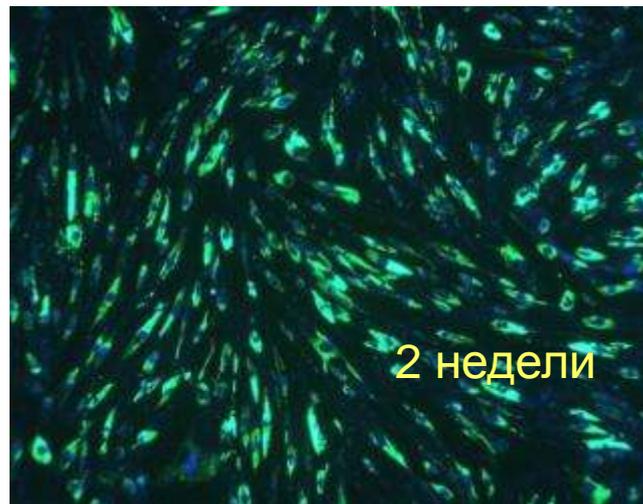
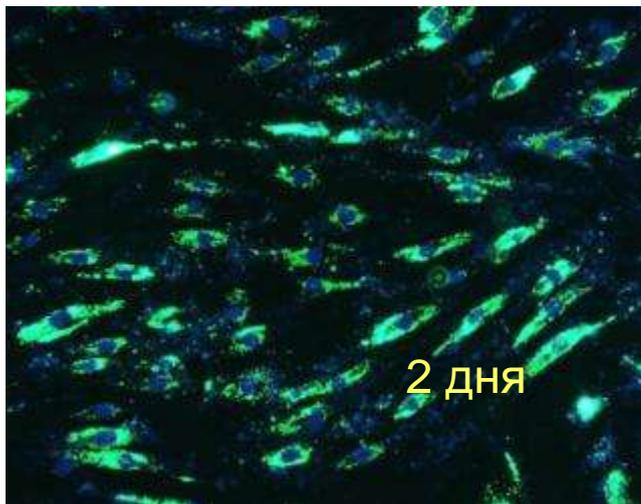
- Сравнительно небольшая травматичность вмешательства и хорошая переносимость операции крысами
- Высокая степень воспроизводимости характеристик очага ишемии от животного к животному
- Возможность контроля реперфузии (ЛДФ, определенный режим МРТ)



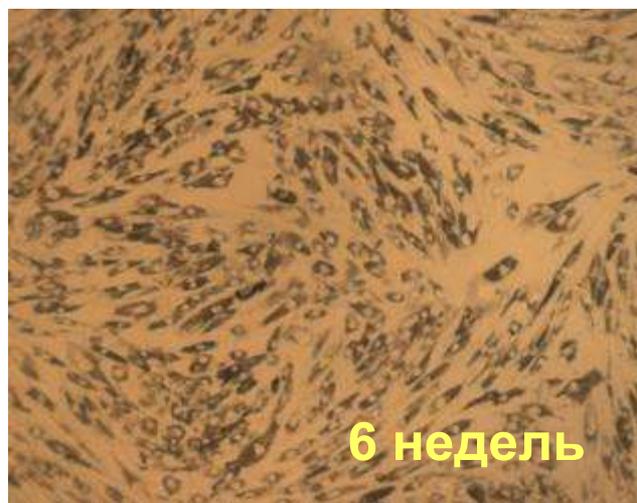
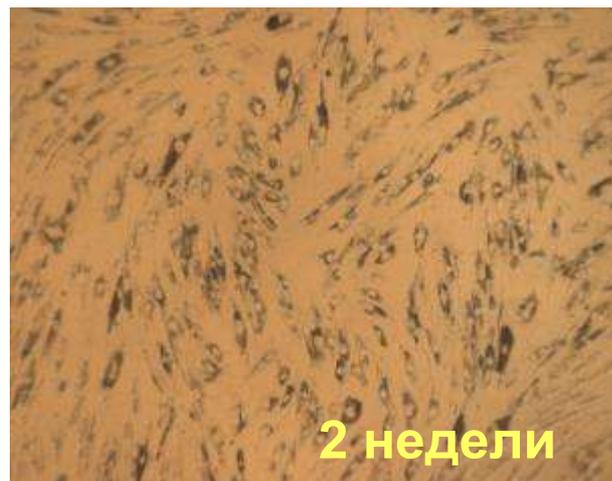
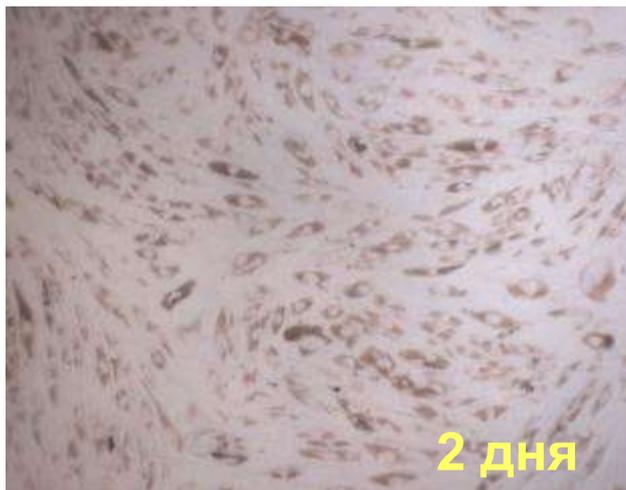
# Трансплантация клеток

После операции ОСМА животным позволяли восстановиться в течение суток, а затем в бедренную вену вводили мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из амниона и Вартонова студня пуповины человека после нормальных родов (2 млн клеток в 1 мл физиологического раствора). После выделения МСК подвергали экспансии в культуре и метили магнитными флуоресцирующими микрочастицами (Bangs Lab.). Непосредственно перед трансплантацией МСК трижды промывали физиологическим раствором. Контрольным животным внутривенно вводили 1 мл физиологического раствора.

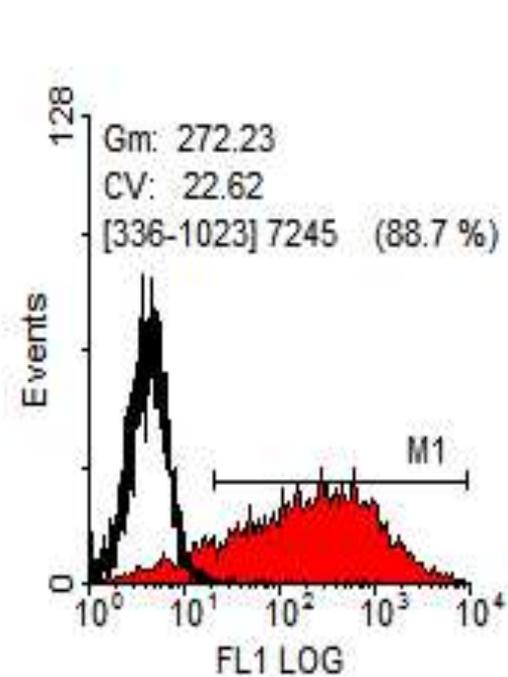
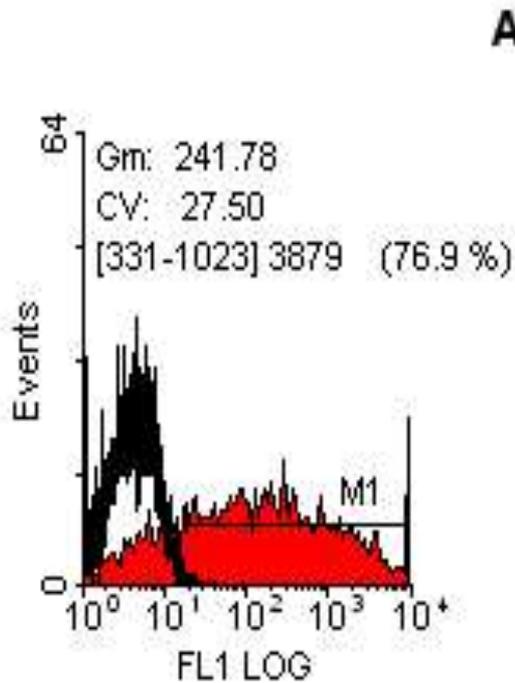
# Магнитное мечение культуры МСК плаценты человека частицами SF green



# Магнитное мечение культуры МСК плаценты человека частицами SF light

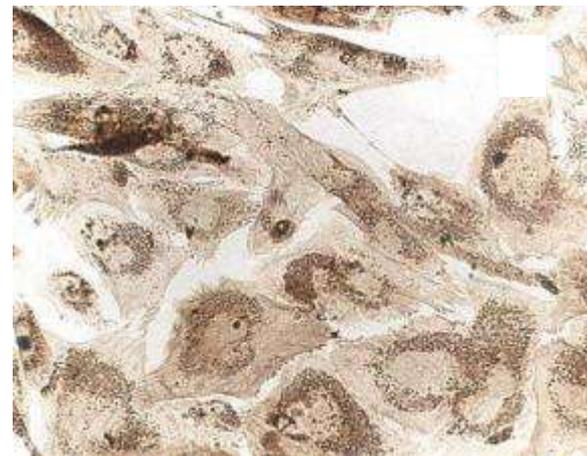
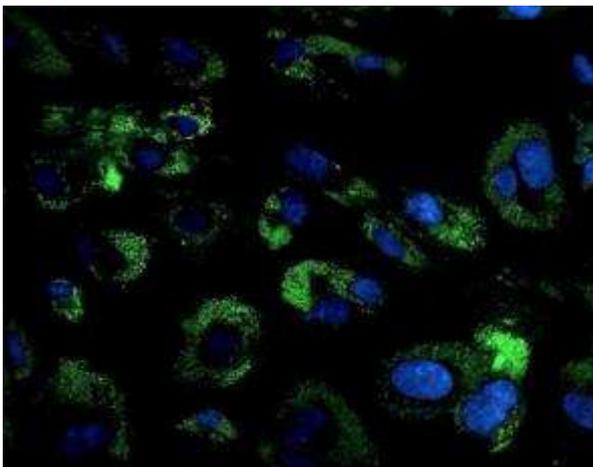
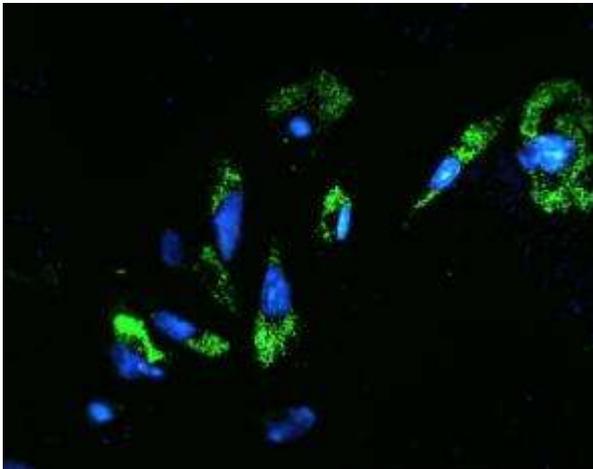


# Мечение МСК микрочастицами.

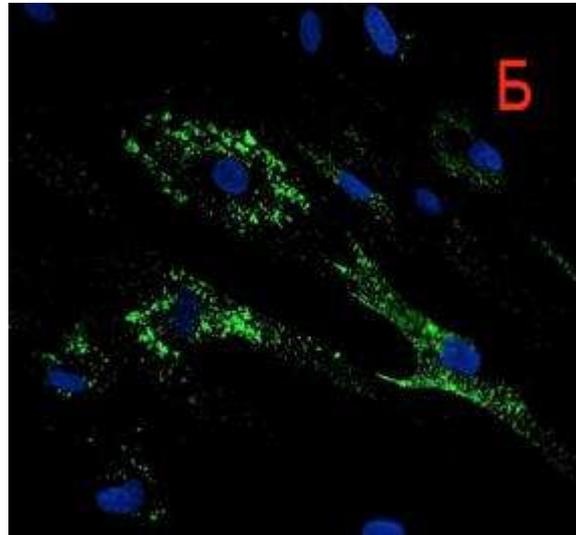


Цитофлуориметрический анализ эффективности загрузки МСК флуоресцентными (А) и магнитными (Б) микрочастицами.

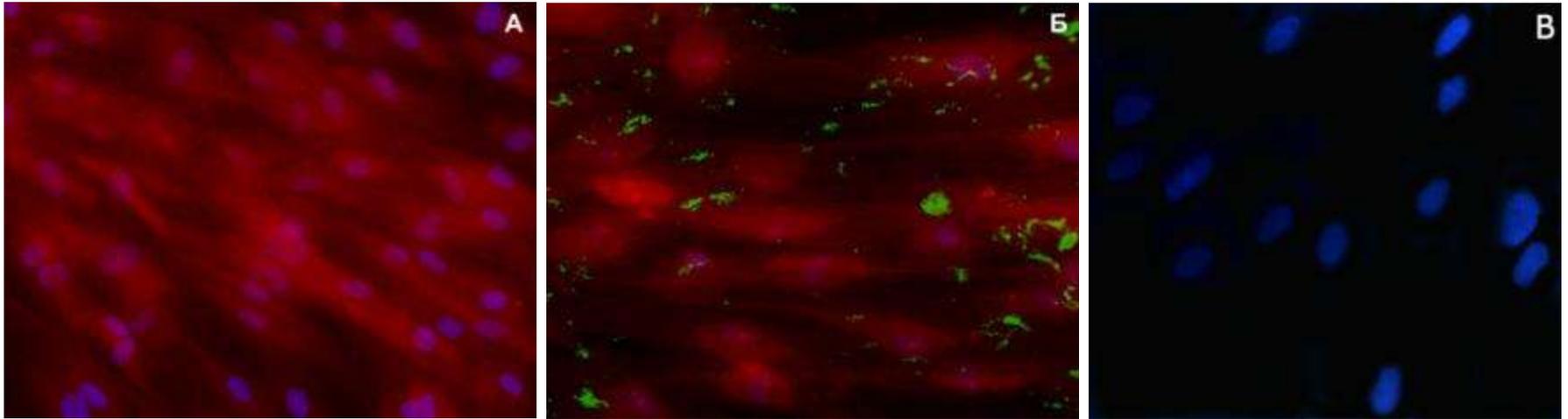
Экспрессия CD90 (верхние панели) и CD54 (нижние панели)  
в клетках, содержащих микрочастицы магнитные частицы.  
Слева представлены поля флуоресцентного микроскопа,  
справа – светового.



Документированная экспрессией остеоонектина остеогенная дифференцировка клеток, меченых магнитными микрочастицами FC03 (0.51мкм). А – окраска пероксидазой; Б – флуоресценция; В – контроль, клетки, не подвергшиеся воздействию дифференцировочной среды.

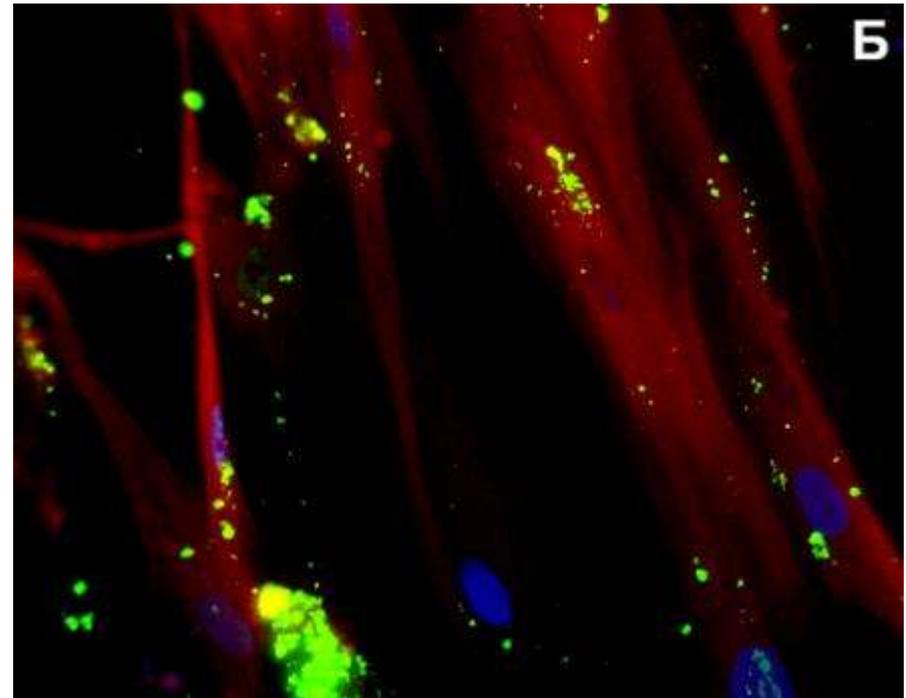
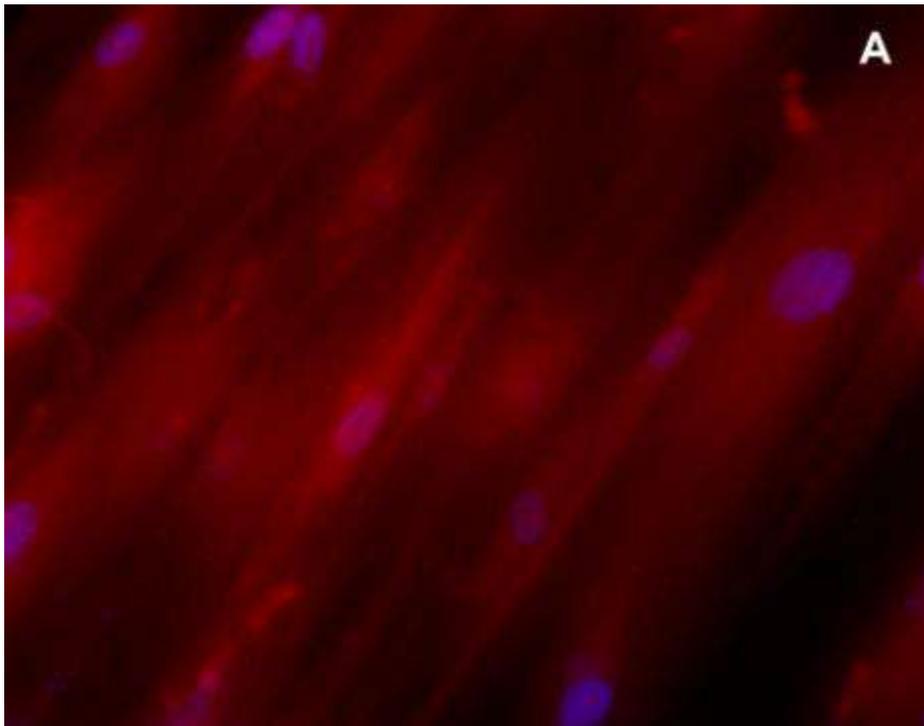


## Экспрессия нейрон-специфичной энолазы (NSE) в МСК через 4 недели после индукции дифференцировки



А – дифференцировка МСК в отсутствие частиц, Б – дифференцировка МСК, загруженных частицами, В – контрольные клетки, не индуцированные к дифференцировке.

**Экспрессия глиального  
фибрилярного кислого белка (GFAP)  
в МСК через 4 недели после индукции  
дифференцировки.**



А – дифференцировка незагруженных  
МСК, Б – дифференцировка МСК,  
загруженных магнитными  
флюоресцирующими частицами.

**Оценка неврологического статуса –  
модифицированная шкала mNSS** (*modified Neurological Severity  
Score, J.Chen с соавт., 2001*)

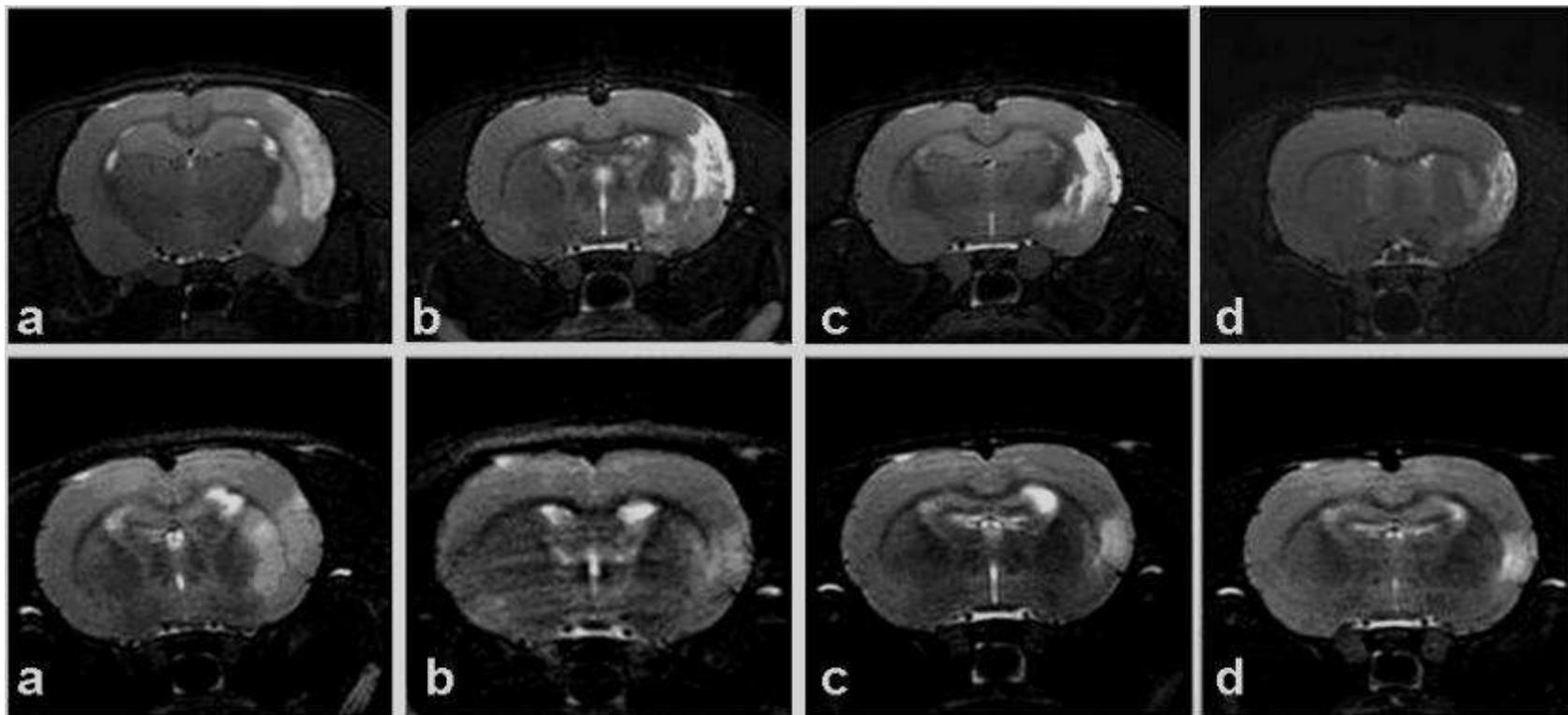
**Поведенческие тесты** для оценки интегративной  
деятельности мозга

**Тест «Открытое  
поле»**



**Тест «Крестообразный  
лабиринт»**





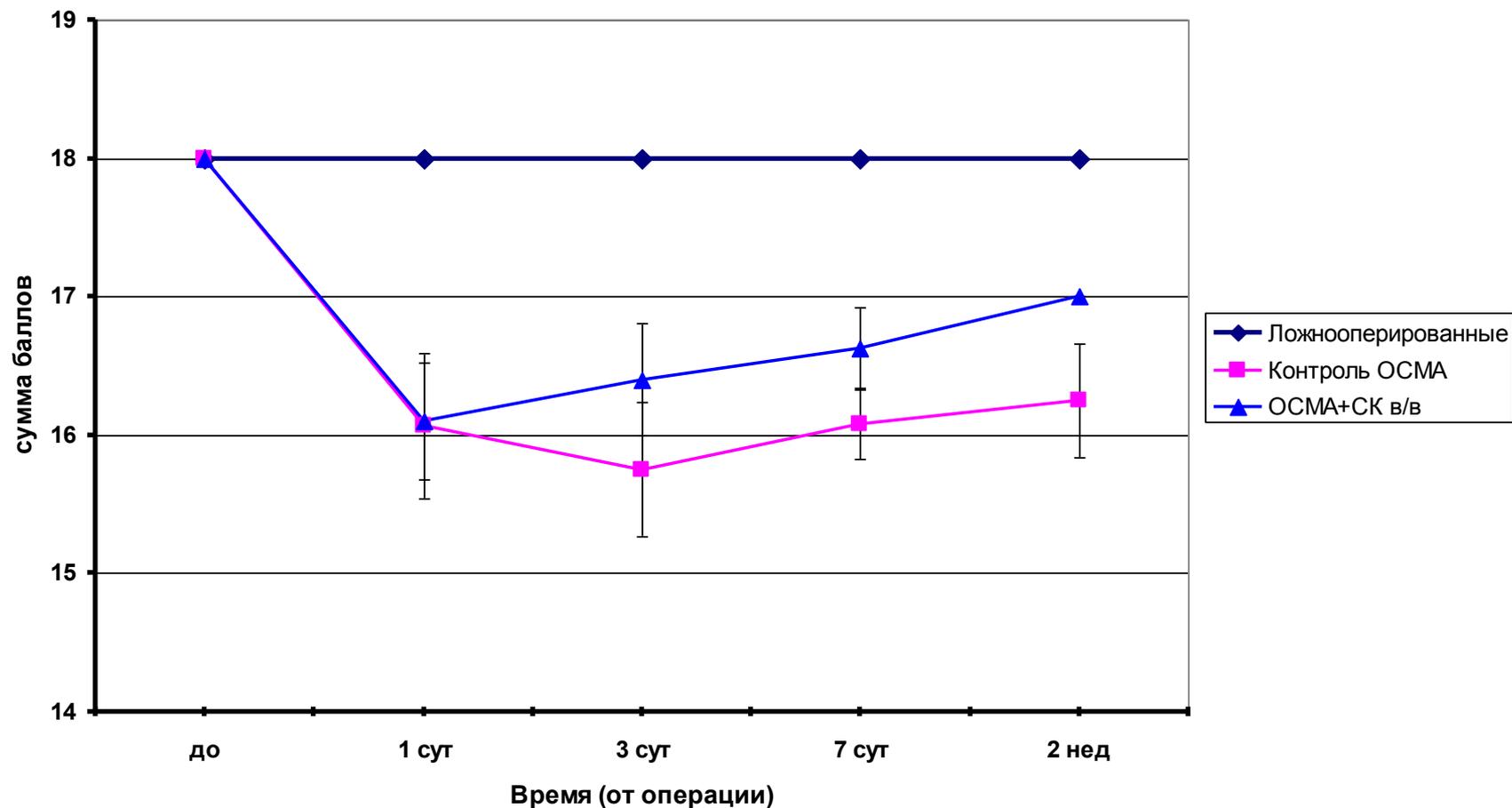
**МР T2-взвешенные изображения зон ишемии в мозге 2 крыс после ОСМА. Верхние панели – ОСМА без трансплантации МСК. Нижние панели – ОСМА плюс трансплантация МСК. Изображения получены через 1 (а), 7 (в), 14 (с) и 30 (d) дней после операции**

# Трансплантация МСК приводит к более быстрому уменьшению объема зоны поражения после ОСМА

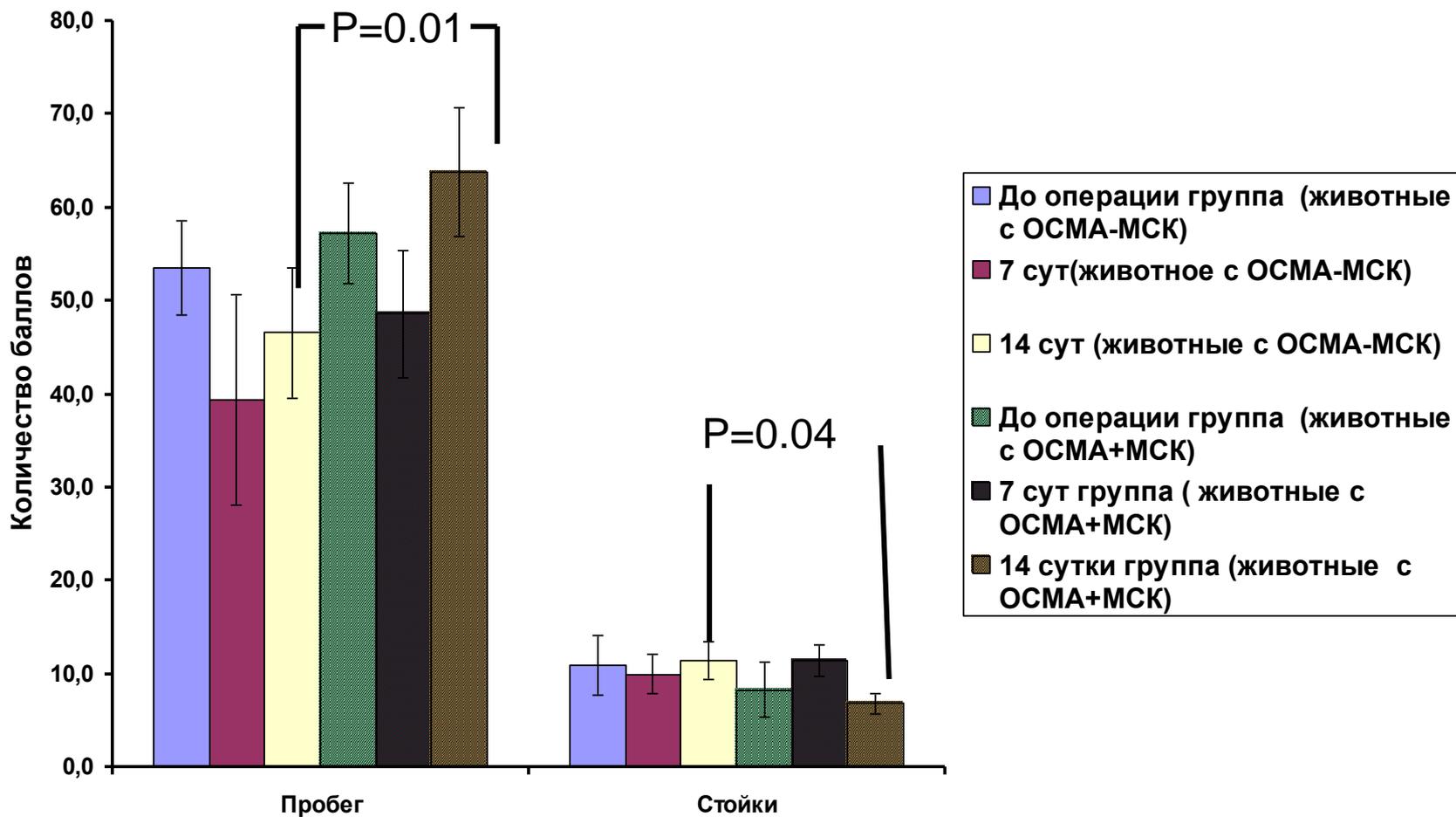
Группа	Режим МРТ	Объем зоны ишемии (мм <sup>3</sup> ) спустя разные сроки после окклюзии средней мозговой артерии			
		1 день	7 дней	14 дней	30 дней
ОСМА	T2-WI (RARE)	190 $\pm$ 33	124 $\pm$ 19	75 $\pm$ 11*	64 $\pm$ 12*
ОСМА + МСК из плаценты человека	T2-WI (RARE)	172 $\pm$ 36	112 $\pm$ 24	38 $\pm$ 7*	23 $\pm$ 3*

# Влияние в/в введения МСК на Neurological Severity Score крыс с ишемическим инсультом (окклюзия СМА)

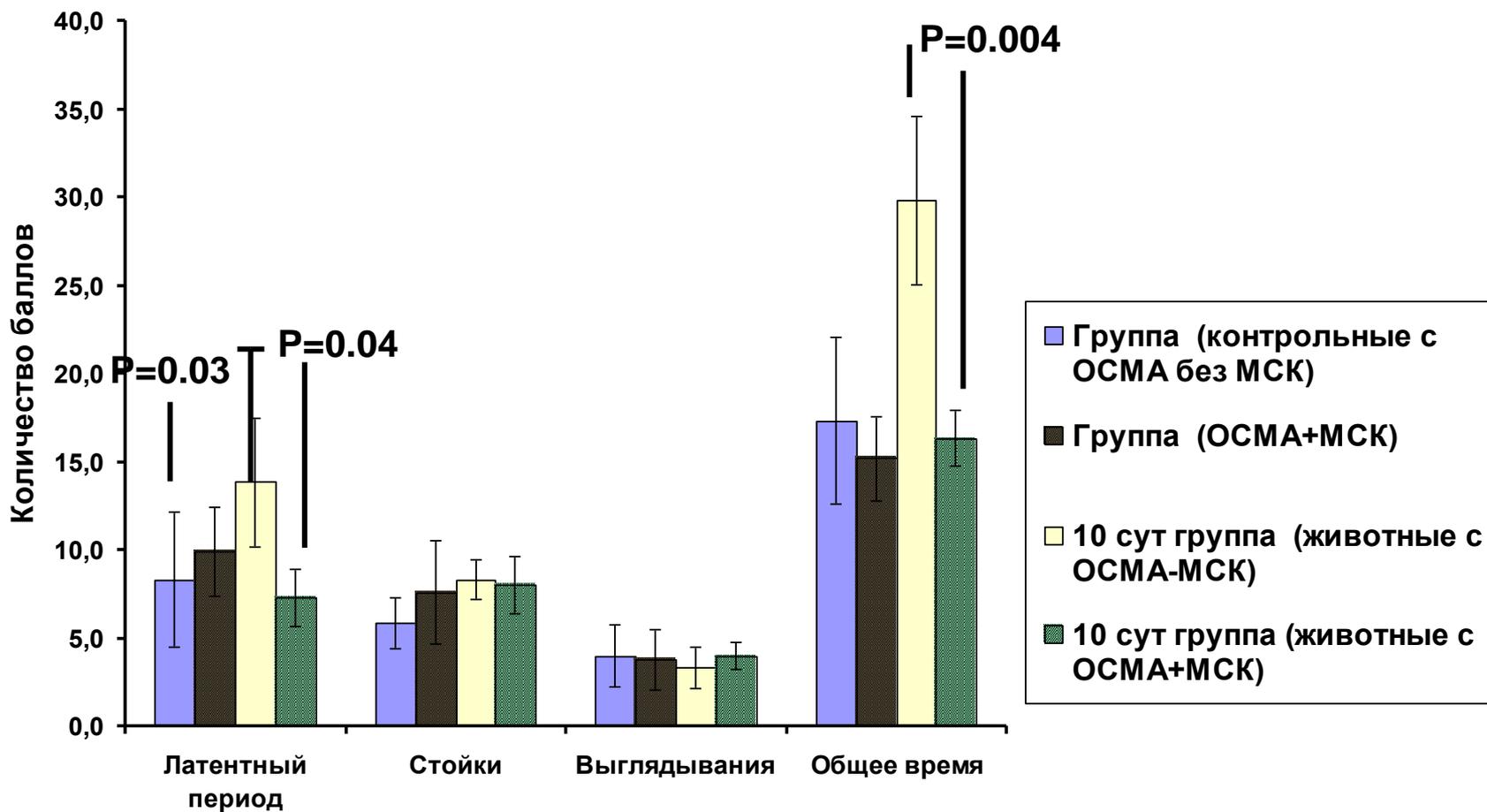
Неврологический статус



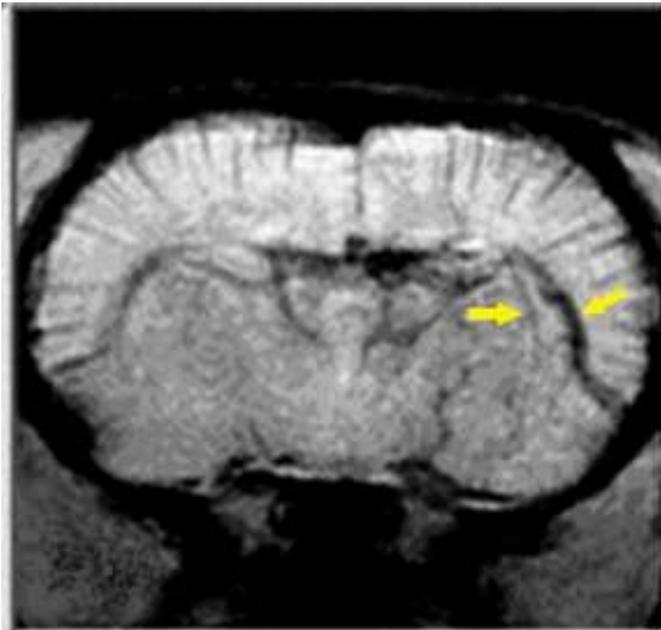
# Тест "Открытое поле"



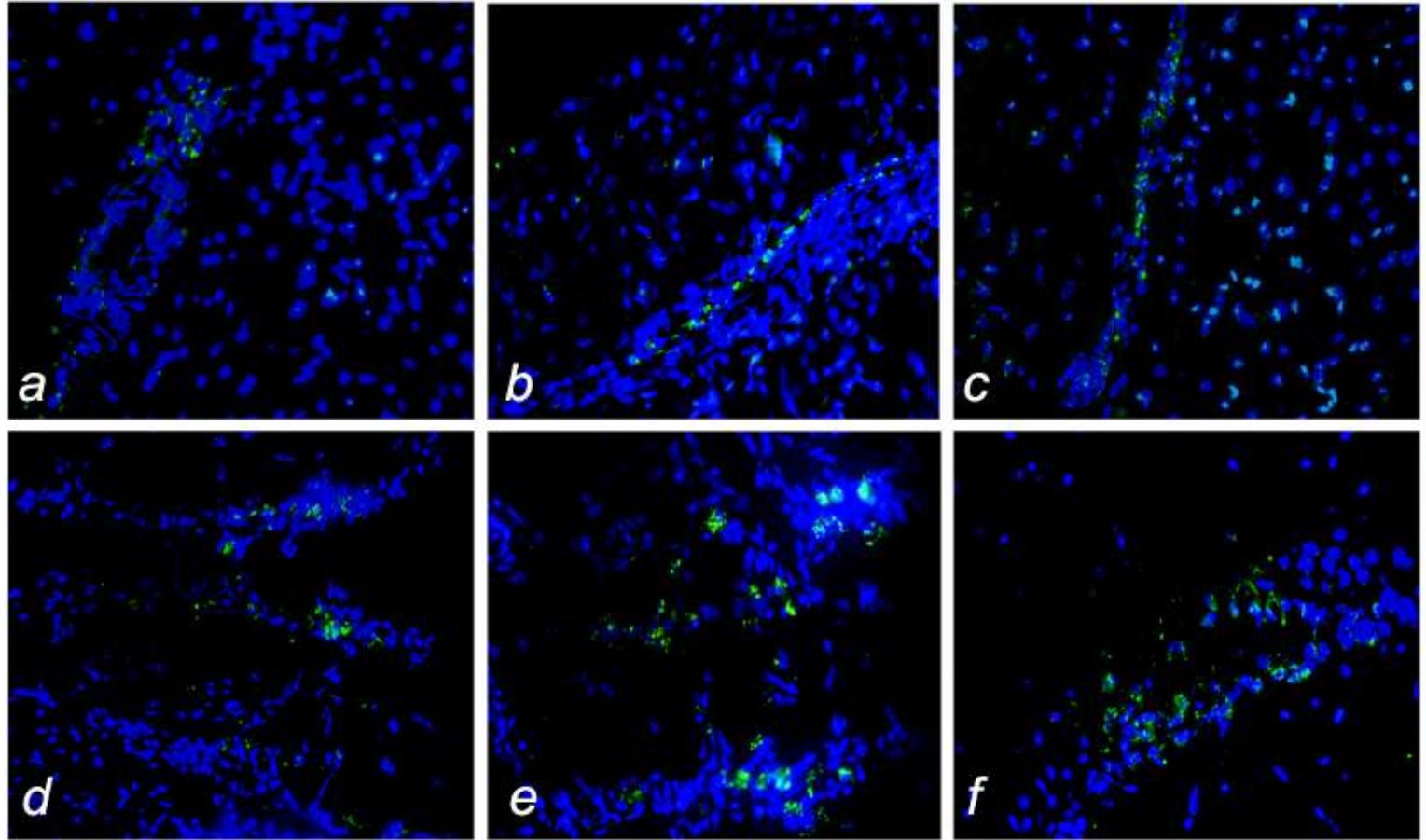
### Тест "Крестообразный лабиринт"



**Меченые МСК клетки визуализируются *in vivo* вокруг зоны ишемии.  
2 недели после операции**



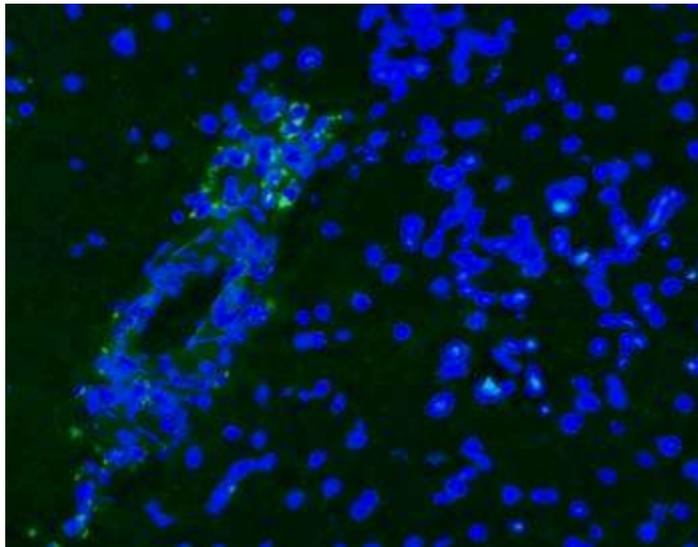
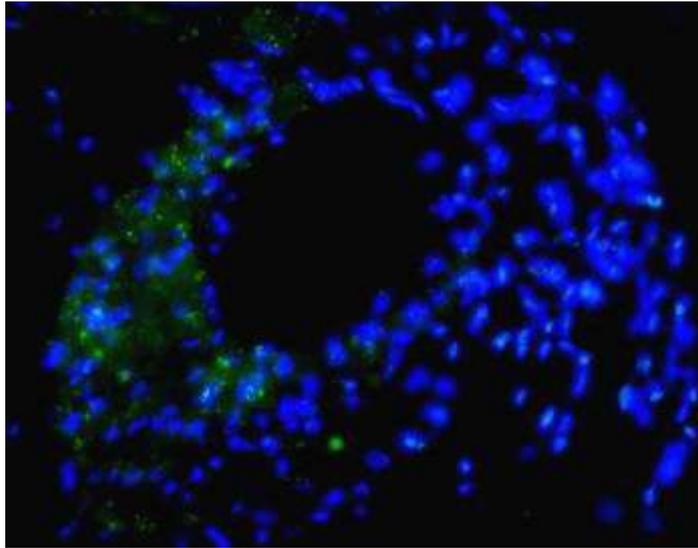
Tracks of MSC labeled with magnetic microparticles in the ischemic hemisphere (arrows). T2\*-weighted images were obtained using a gradient echo pulse sequence (SNAP) with the following parameters: TR = 113 ms, TE = 13 ms, cross-sectional thickness 1 mm, field of view 4.0 x 4.0 cm, matrix size 256 x 256, resolution 0.156 x 0.156 mm/pixel.



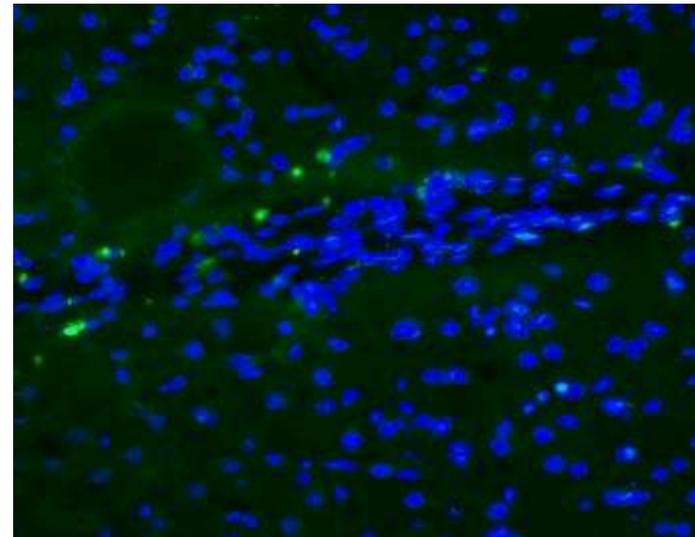
**Накопление введенных внутривенно меченых МСК в ткани мозга крыс, перенесших операцию ОСМА. а – 7 дней после ОСМА, меченые МСК рядом с сосудом; «треки» из меченых МСК в ишемизированном (b) и контралатеральном полушарии (c), 2 недели после ОСМА; d, e - накопление трансплантированных клеток в зоне ишемии, 3 недели после ОСМА; f- накопление трансплантированных клеток в гиппокампе, 3 недели после ОСМА.**

**Модель ОСМА. 7 дней после  
внутривенного введения МСК,  
меченых магнитными  
частицами.**

**Часть метки сосредоточена вокруг  
сосудов**

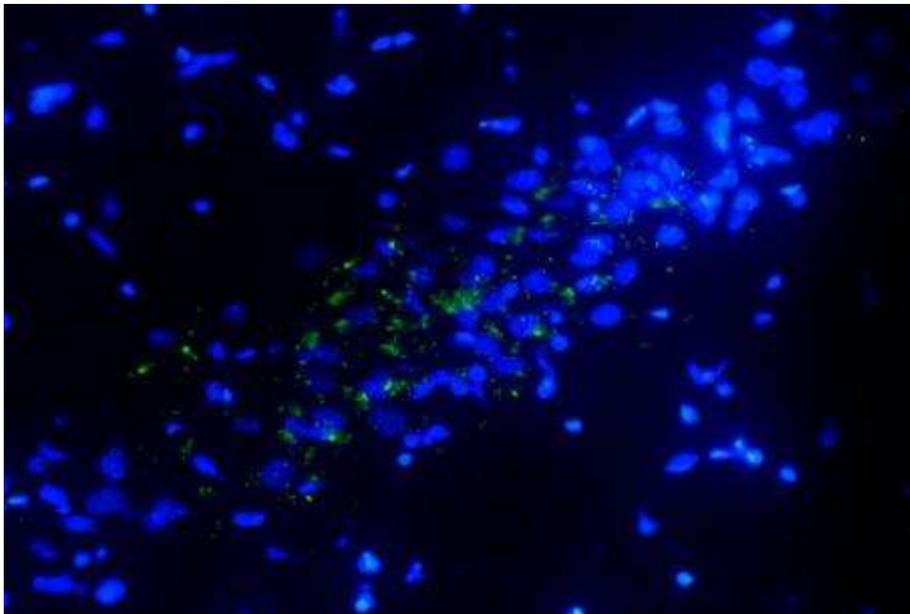
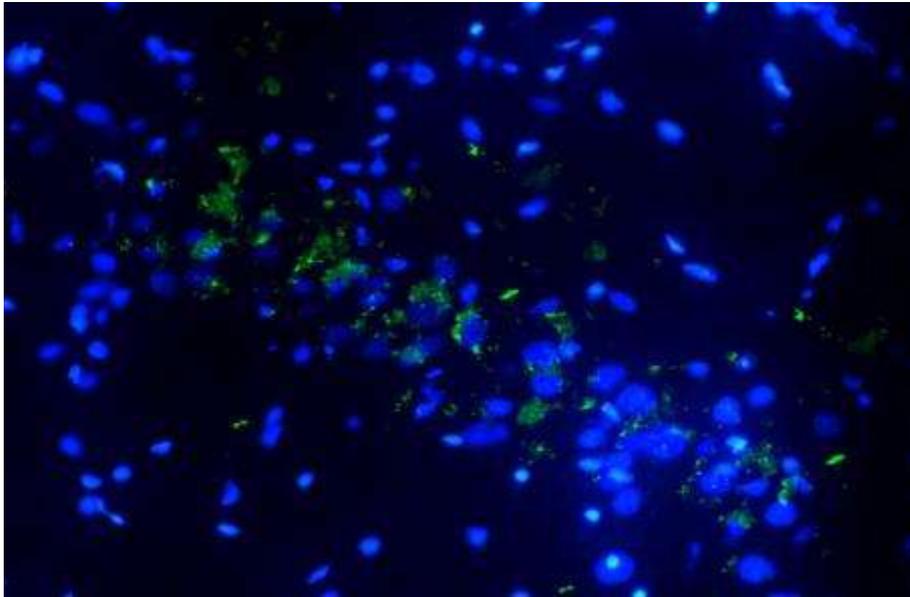


**Ишемизированное полушарие**

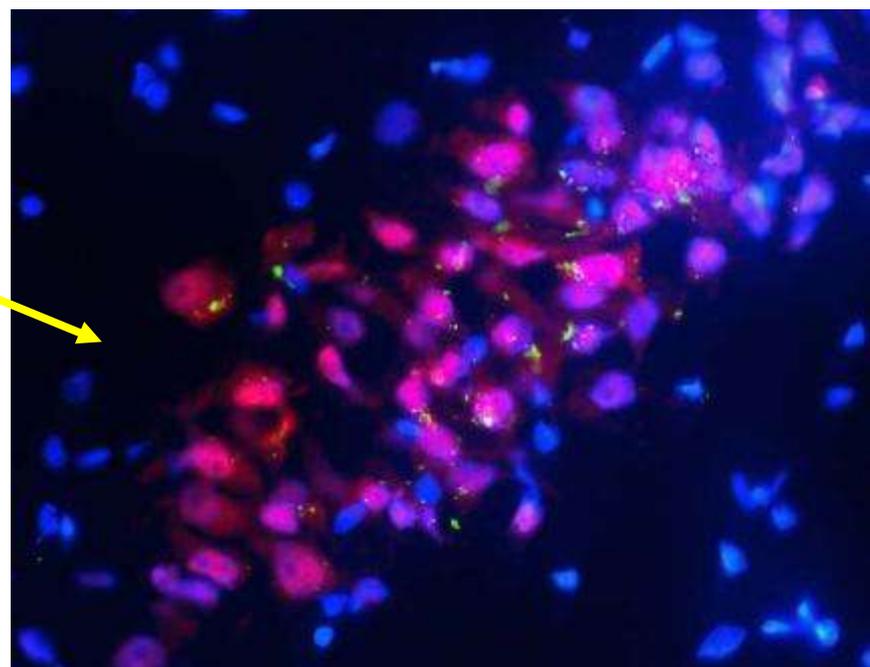
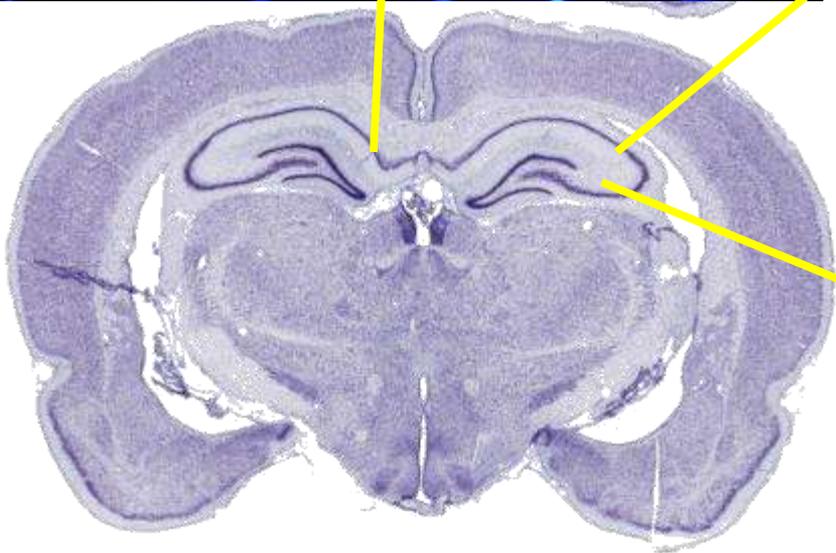
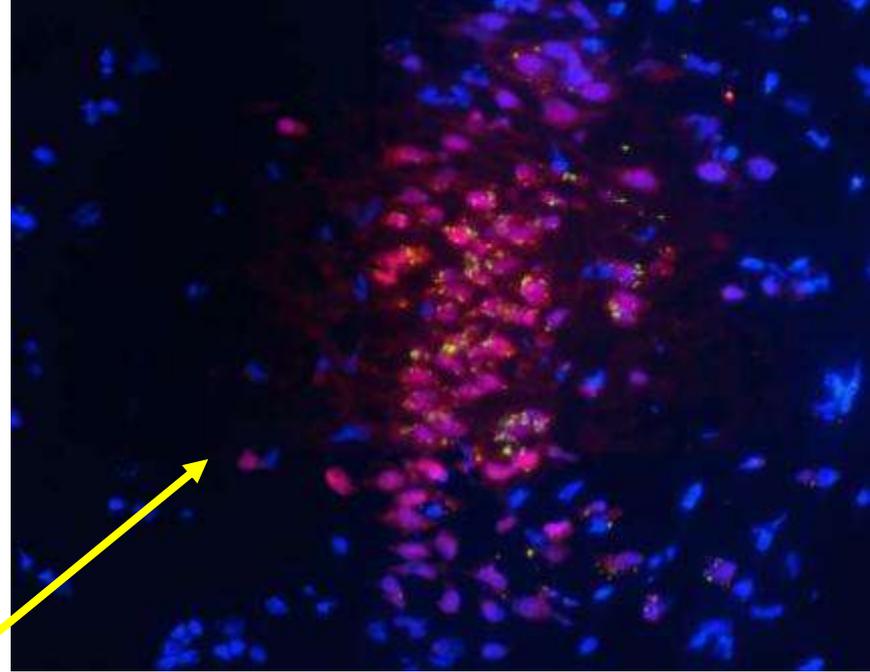
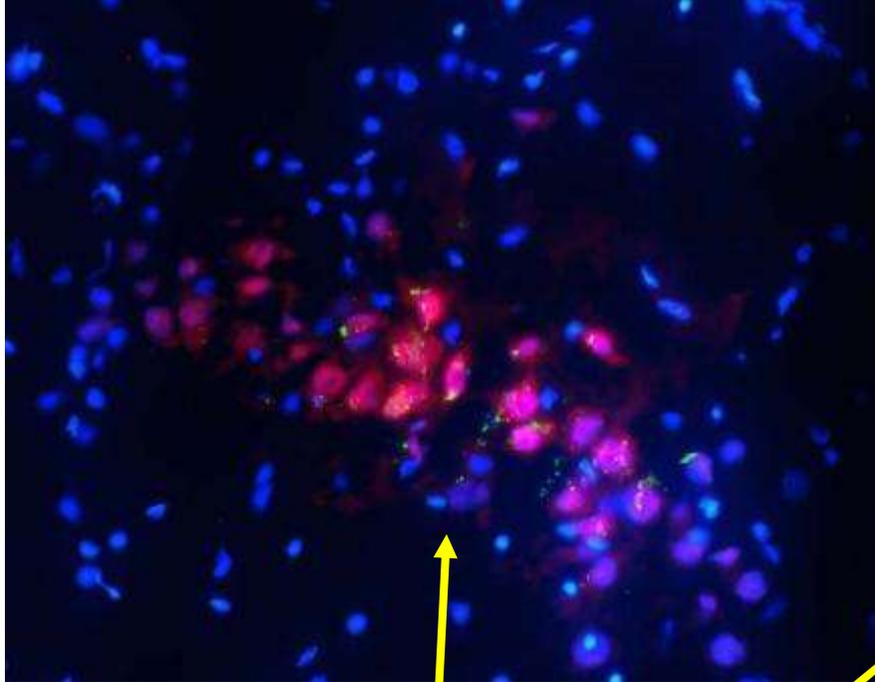


**Контралатеральное полушарие**

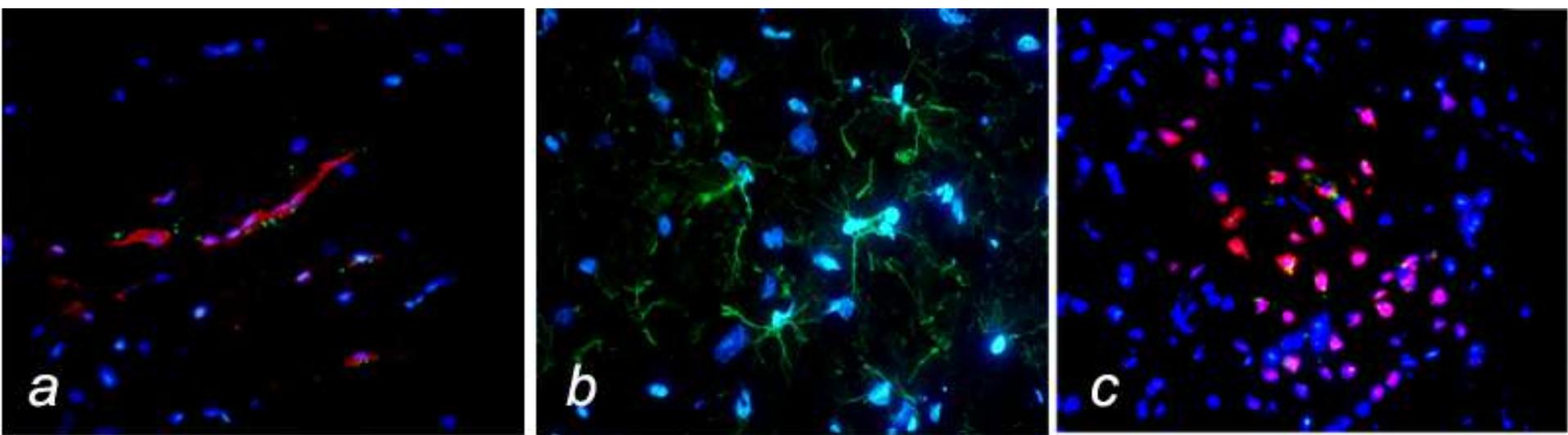
Эндоваскулярная модель  
инсульта  
внутривенное введение  
меченых магнитными  
микрочастицами МСК  
14 суток



меченые клетки в  
субвентрикулярном  
пространстве

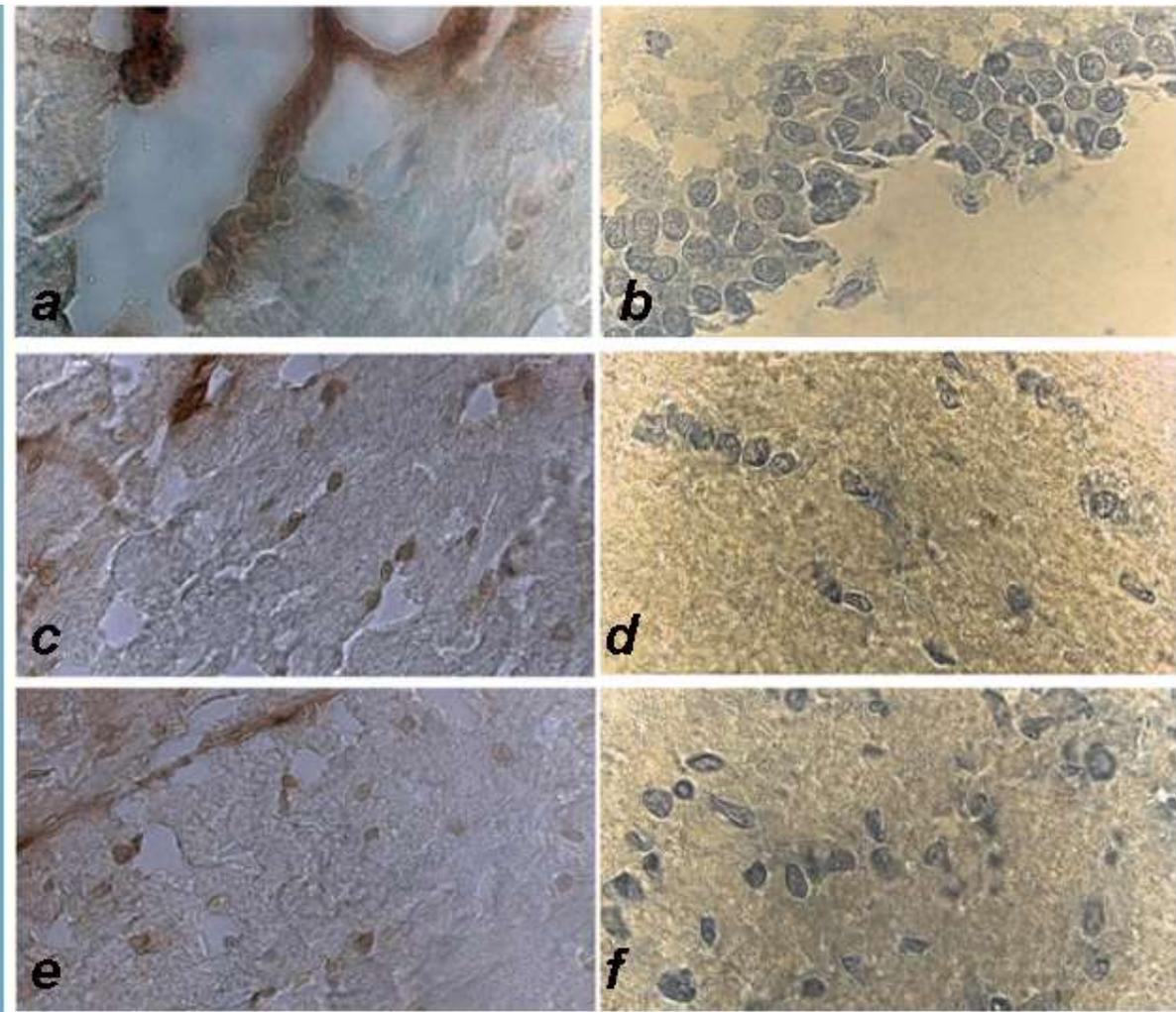


**Накопление клеток в зоне гиппокампа**



**Переживание и дифференцировка трансплантированных МСК в зоне инфаркта мозга. Левая панель – экспрессия человеческого глиального фибриллярного кислого белка трансплантированными клетками через 45 дней после трансплантации. Средняя панель – окрашивание астроцитов того же локуса антителом против крысиного фибриллярного кислого белка. Правая панель – экспрессия NeuN в зоне ишемии, выявляемая антителом против человеческого NeuN. 64 дня после ОСМА.**

**Влияние трансплантированных МСК на пролиферацию, миграцию и хоуминг нейральных СК субвентрикулярной зоны пораженного полушария крысы, перенесшей ОСМА. Левые панели – крыса, которой не вводили клетки через 3 недели после операции. Правые панели – крыса, которой трансплантировали МСК через 3 недели после операции. Окраска антителами против маркера пролиферации Ki67.**



**Субвентрикулярная зона – a, b.**

**Пространство между субвентрикулярной зоной и зоной инфаркта – c, d.  
«Треки».**

**Зона инфаркта – e, f.**

# Выводы

- Трансплантация МСК, выделенных из плаценты и пуповины человека крысам с экспериментальным ишемическим инсультом облегчала неврологическую симптоматику и нормализовала поведенческие реакции животных.
  - Эффекты МСК определенно не могут быть объяснены непосредственным замещением погибших нервных и глиальных клеток.
  - Благоприятное влияние трансплантированных МСК на неврологическую симптоматику и поведенческие реакции крыс с экспериментальным инсультом опосредованы их хоумингом в перивентрикулярном пространстве боковых желудочков и в зубчатой извилине гиппокампа и активацией находящихся там собственных стволовых и прогениторных клеток мозга и миграцией последних к очагу ишемии.