

ния рецептора TLR4 показано, что местное стимулирование рецепторов врожденного иммунного ответа можно рассматривать как перспективную, клинически применимую стратегию ускорения процессов заживления ран, в том числе хронических ран, трудно поддающихся лечению.

Финансирование исследования: *Государственный контракт № 12411.1008799.13.112 от 4 июля 2012 г. Грант Президента РФ № МК-5205.2015.7.*

**Антонова Е.И., Ленгесова Н.А., Костина О.М., Федотова С.В., Кандрашина А.В., Соловьев А.В.**

ФГБОУ ВО «Ульяновский педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

НИЦ ФППББ

Kostinaom197@mail.ru

### **ЭПИДЕРМАЛЬНЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ПРОДУКТ НА РАЗЛИЧНЫХ НОСИТЕЛЯХ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ**

Значительные успехи в области экспериментальной эмбриологии, цитологии, молекулярной генетики и геномной инженерии привели к формированию новой области биомедицины — регенеративной медицины. Регенеративная медицина является ярким примером стирания граней между фундаментальными и прикладными исследованиями, взаимодействия различных научных дисциплин, определяющую роль данного медицинского направления играет биологическая база исследований. Трансплантируемые клеточные суспензии или агрегаты самостоятельно встраиваются в трехмерную структуру исходной ткани и интегрируются с окружающей тканью. В связи с этим крайне актуальным является: создание молекулярно-клеточных продуктов для развития технологий заместительной регенеративной терапии, токсикологических исследований и доклинических испытаний после воздействия на организм повреждающих факторов различного генеза (радиологического, химического, физического и т.д.), а также применение клеточных продуктов в практике медицинских учреждений. На базе Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии (НИЦ ФППББ) ФГБОУ ВПО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» началась работа по созданию молекулярно-клеточных продуктов для развития технологий заместительной регенеративной терапии. На сегодняшний день получен первый клеточный продукт, который в ближайшее время может быть использован в качестве клеточной терапии в образовании грануляционной ткани, которая является основой для эпителизации раны кожного покрова. Источником фибробластов являлись дермальные биоптаты кожи человека. После забора материал сразу помещали в транспортную среду, в которой биоптат находился сутки при температуре 24°C. В лаборатории Клеточных технологий НИЦ ФППББ УлГПУ дермальные биоптаты механически измельчались, инкубировались с раствором коллагеназы I типа. Далее клеточный материал пересаживали в полную среду инкубации, сбалансированную для культивирования фибробластов и кератиноцитов. Дальнейшее культивирование осуществлялось на трех типах носителей — коллагеновая матрица, для заживления поверхностных обширных ран; микроносители Cytodex 3; вставки мембранные с коллагеновым покрытием Corning Transwell-COL. Клеточный продукт на трех

носителях применяется для заживления ран на животных в рамках прохождения доклинических испытаний. Проведено HLA-генотипирование с использованием набора Micro SSPGeneric HLA Class I&II (ABDR) (OneLambda) на определение гистосовместимости тканей. ПЦР-анализ кондиционированной клетками среды — определение вирусных и микоплазменных контаминантов и простейших. Использовались праймеры к 25 возбудителям.

**Котлярова М.С.<sup>1</sup>, Архипова А.Ю.<sup>1</sup>, Мойсенович А.М.<sup>1</sup>, Куликов Д.А.<sup>2</sup>, Молочков А.В.<sup>2</sup>, Мойсенович М.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского  
kotlyarova.ms@gmail.com

### **ТРЕХМЕРНЫЕ ПОРИСТЫЕ СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ШЕЛКА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ**

Создание костных имплантатов для восстановления повреждений скелетных тканей представляет собой актуальную клиническую проблему. Использование тканеинженерных скаффолдов на основе биodeградируемых материалов является одним из возможных ее решений. Фиброин шелка — прочный и биорезорбируемый полимер с высокой биосовместимостью, что позволяет рассматривать его как основу для получения таких конструкций. На основе фиброина шелка тутового шелкопряда Bombyx mori были получены трехмерные пористые скаффолды в виде губок, сформированные методами выщелачивания (CB) и замораживания-оттаивания (C3O). Также образцы были модифицированы путем осаждения на их поверхности кристаллов фосфата кальция и, таким образом, были получены минерализованные производные скаффолдов, изготовленных методом выщелачивания (MCB) и замораживания-оттаивания (MC3O). Структуру образцов изучали методами сканирующей электронной и конфокальной микроскопии. Для оценки биосовместимости in vitro на скаффолдах культивировали мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ) и мезенхимальные стволовые клетки мыши (МСК). Проверку остеоиндуктивного и остеокондуктивного потенциалов полученных скаффолдов проводили в модели дефекта бедренной кости крысы линии Wistar с использованием гистологических методов анализа тканей, сформированных на месте повреждения. Полученные скаффолды всех четырех видов обладали равномерной пористой структурой. CB и MCB характеризовались большим диаметром пор и толщиной стенок, а также были жестче, чем C3O и MC3O. Поверхность минерализованных скаффолдов была покрыта кристаллами фосфата кальция. Скаффолды поддерживали адгезию и пролиферацию МЭФ и МСК, более 95% клеток сохраняли жизнеспособность на 7 день культивирования. В эксперименте in vivo все типы скаффолдов способствовали восстановлению ткани в области дефекта. Наилучший результат был достигнут при использовании MCB. Гистологическое исследование, проведенное через четыре недели после операции, показало присутствие взаимодействующих с материалом скаффолдов остеобластов, остеоцитов и остеокластов. Наличие внутри имплантата клеток,

участвующих в регенерации кости, свидетельствует об остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойствах использованных скаффолдов. Таким образом, полученные скаффолды на основе фиброина шелка могут быть использованы для восстановления костной ткани. Скаффолды, полученные методом выщелачивания, оптимальны для костной тканевой инженерии, а минерализация скаффолдов этого типа приводит к усилению остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств, что подтверждается наличием многочисленных очагов остеогенеза в месте дефекта.

Финансирование исследования: *Работа осуществляется при поддержке Минобрнауки РФ по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 октября 2015 г. № 14.607.21.0119 «Создание набора прототипов изделий из биоискусственной костной ткани и модуляторов остеогенеза для регенеративной медицины», уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60715X0119.*

**Котова А.В.<sup>1,2</sup>, Шумеев А.Н.<sup>2,3</sup>, Золина Т.Л.<sup>2</sup>, Левчук К.А.<sup>2</sup>, Александрова Л.В.<sup>2</sup>, Иволгин Д.А.<sup>2,4</sup>, Енукашвили Н.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> ООО «Покровский банк стволовых клеток»

<sup>3</sup> ФГБУН «Зоологический институт» РАН

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России

anastkotova@gmail.com

#### **ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПЧОНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) пупочного канатика (ПК) являются перспективным источником для клинического применения, поскольку обладают рядом преимуществ по сравнению с МСК костного мозга (Kern et al., 2006; Arutyunyan et al., 2016). Обычно клетки культивируют с использованием сред, содержащих фетальную бычью сыворотку, что в клиническом применении создаёт многочисленные угрозы безопасности пациента, включая инфекции и аллергические реакции. Однако компаниями-производителями были разработаны бессывороточные среды и среды с заменителем сыворотки с пониженным содержанием животных компонентов. Целью работы являлось сопоставление морфологических и иммунофенотипических характеристик МСК ПК, а также их пролиферативного и дифференцировочного потенциалов при культивировании в разных средах: 1) StemPro® MSCSFMTS™ (LifeTechnologies)-бессывороточной среде с пониженным содержанием животных компонентов; 2) StemPro® MSCSFMXenoFree (LifeTechnologies) — бессывороточной среде без компонентов животного происхождения, в обоих случаях использовали флаконы, покрытые CTS™ CELLstart™ Substrate (LifeTechnologies); 3) MesenPRORS™ (LifeTechnologies) — среде с пониженным (2%) содержанием сыворотки; 4) DMEMLowGlucose (HyClone), содержащей 10% ASCMMesenchymalStemCellGrowthSupplement (HyClone). МСК ПК культивировали в течение 14–16 сут. (4 пассажа), на каждом пассаже проводили морфологическую характеристику клеток с помощью анализа фотографий случай-

но выбранных полей зрения ( $n = 15$ ), полученных с использованием светового инвертированного микроскопа Axiovert 40C (Zeiss). Методом проточной цитометрии определили иммунофенотип МСК ПК и его соответствие минимальным критериям МСК (CD90+/CD105+/CD73+/CD44+/CD34-/CD45-/CD14-/CD117- на 1-м и 4-м пассажах. В каждой из использованных сред на 1-ом пассаже морфология и иммунофенотип основной части популяции соответствовали МСК. Однако, в средах 1, 3, 4 наблюдались небольшие (до 1.5%) субпопуляции клеток, не являющихся МСК. При использовании среды 2 популяция МСК была однородной и не содержала субпопуляций. Однако на 4 пассаже в среде 2 произошло открепление клеток от субстрата. В среде 1 к 4-му пассажу в клетках резко (на 40%) снизился уровень экспрессии основных маркеров МСК—CD90, CD105. В средах 3 и 4 клетки сохранили иммунофенотип МСК, активно пролиферировали, однако сохранялась одна из минорных (не более 1%) субпопуляций со сниженным содержанием CD44. Наиболее высокая активность пролиферации показана для клеток, культивируемых на средах 3 и 4, также наблюдалась тенденция к меньшему числу прироста МСК при культивировании на средах 1 и 2. Анализ способности к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях проводили на 4 пассаже. Таким образом, среда 2 является оптимальным выбором для короткого (1-2 пассажа) культивирования, поскольку не содержит животных компонентов и обладает максимальными селективными свойствами в отношении МСК, для длительного культивирования возможно использование среды с пониженным содержанием сыворотки 3.

Финансирование исследования: *РФФИ 16-34-01163; НИР гос. задания Минздрава России «Исследование морфо-функциональных свойств мезенхимных стволовых клеток при длительном культивировании in vitro», реализуемые в СЗГМУ им. И.И. Мечникова; образцы культуральных сред предоставлены компанией Хеликон.*

**Котова П.Д., Тарасов М.В., Быстрова М.Ф.**

ФГБУН «Институт биофизики клетки» РАН  
polinakotova88@gmail.com

#### **СИГНАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ИНИЦИИРУЕМЫЕ АГОНИСТАМИ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

Во многих работах показано, что присутствие агонистов пуринаргических рецепторов в среде культивирования мезенхимных стволовых клетках (МСК) стимулирует их дифференцировку в адипогенном направлении. Также ранее нами было показано, что АТФ стимулирует  $Ca^{2+}$ -сигнализацию в МСК. Однако рецепторные и сигнальные механизмы этого явления оставались не исследованными. В настоящей работе нами проводился функциональный, фармакологический и экспрессионный анализ пуринаргической системы МСК с целью охарактеризовать рецепторные и сигнальные системы, вовлеченные в генерацию  $Ca^{2+}$ -сигналов в МСК в ответ на пуринаргические агонисты. Исследования проводились на первичной культуре МСК человека, выделенных из жировой ткани взрослых доноров, полученной при плановых операциях. Анализ экспрессии МСК пуринаргических рецепторов проводился методом ОТ-ПЦР.