

**И.Р. ГИЛЬМУТДИНОВА**

Самарский государственный медицинский университет  
Институт экспериментальной медицины и биотехнологий

**ОЦЕНКА БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА  
ГИАМАТРИКС IN VITRO НА КУЛЬТУРЕ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА**

Научный руководитель – профессор Л.Т. Волова

**Исследование Гиаматрикса было проведено на культуре мезенхимальных стромальных клеток человека, которые были получены из костного мозга. В ходе эксперимента мы не обнаружили какого-либо негативного или токсического воздействия исследуемого материала на популяцию клеток, напротив, данные изучения пролиферативной активности свидетельствовали о его стимуляции. Полученные данные позволили сделать вывод, что исследуемый материал Гиаматрикс является биологически активным, повышает пролиферативный потенциал клеток, обладает биологической совместимостью, обеспечивает адгезию клеток на поверхности и не оказывает негативного влияния на морфологические характеристики клеток.**

*Ключевые слова: тестирование, культура клеток, Гиаматрикс.*

**I.R. GILMUTDINOVA  
EVALUATION OF BIOPLASTIC MATERIAL HYAMATRIX  
IN VITRO ON THE CULTURE OF MESENCHYMAL  
STROMAL CELLS OF HUMAN BONE MARROW**

**The experiment hasn't revealed any adverse or toxic effects of the material on a population of cells. On the contrary, the proliferative activity of the study data showed its stimulation. These data lead to the conclusion that the analyzed material Hyamatrix is biologically active, increases the proliferative capacity of cells, is biocompatible, provides cell adhesion to the surface, and shows no negative influence on the morphological characteristics of the cells.**

*Keywords: testing, cell culture, Hyamatrix.*

В последние годы регенеративные технологии становятся одной из наиболее наукоемких и динамично развивающихся областей современной медицины. Важнейшим разделом регенеративной медицины являет-

ся лечение термических поражений дермальных покровов и полноценное восстановление структуры кожи после ожога. Предложен ряд технологий, предполагающих использование как клеточных продуктов, так и бесклеточных биополимерных покрытий натурального происхождения (Островский Н.В. и др., 2007; 2010; Колсанов А.В. и др., 2011). Одним из таких покрытий является Гиаматрикс, содержащий наноструктурированную гиалуроновую кислоту (Рахматуллин Р.Р. и др., 2009).

Природа и свойства материала Гиаматрикс позволяют предположить успешность использования его в качестве биоматрицы для клеточных элементов с целью повышения эффективности лечения ожоговых ран.

Поэтому изучение влияния Гиаматрикса на культуру мезенхимальных стромальных клеток (МСК) – одного из участника регенераторного процесса – является весьма актуальным.

Цель исследования: провести *in vitro* на культуре МСК человека оценку на цитотоксичность и биосовместимость биоматериала Гиаматрикс.

Материалы и методы исследования. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки были получены из костного мозга взрослого человека после подписания информированного согласия на получение биологического материала. Донор был обследован на ВИЧ, RW, гепатит В, С; результаты анализов отрицательные.

Было проведено 2 серии эксперимента: опытная – культивирование клеток в присутствии материала Гиаматрикс и контроль – без материала. Длительность эксперимента – 26 суток.

Культивирование в обеих группах

проводили в одинаковых условиях на пластиковых флаконах (Orange Scientific, Бельгия) площадью 25 см<sup>2</sup> в питательной среде αMEM (Sigma) с добавлением 2 мМ аланил-глутамин (Invitrogen) и 10% отборной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Gibco) при температуре 37° С и концентрации CO<sub>2</sub> 5% в CO<sub>2</sub> инкубаторе (МСО-150, Sanyo, Япония).

Клетки в обеих группах вносили в чашки Петри с питательной средой в концентрации 1362 клетки на 1 см<sup>2</sup> культурального пластика.

Перед исследованием материал Гиаматрикс был регидратирован в стерильном фосфатно-солевом буфере. Перед внесением клеток на пластик в него помещали изучаемый материал размером 0,5x0,5 см.

Нативные культуры изучали, фотографировали и проводили морфометрию в динамике с первых суток до 26 дня эксперимента.

Оценка площади клеток была выполнена на аппаратно-программном комплексе Axio Observer. A1 (Carl Zeiss) с помощью программного обеспечения Axio Vision. Кластерный анализ – на программном комплексе Image J 1.43m и Image Pro Plus 6.0.

Подсчет клеток проводили в начале и в конце эксперимента с использованием аппаратного комплекса Vi-Cell XR, фирмы Becton Coulter.

Расчет пролиферативной активности проводили по формуле:

Скорость удвоения культуры (удвоения/ч) рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{[\log_{10}(NH) - \log_{10}(NH_1)]}{\log_{10}(2)},$$

где NH<sub>1</sub> – количество клеток при посеве культуры; NH – количество наращенных клеток.

$$x = \frac{Dt}{Ct}$$

где  $Ct$  – продолжительность культивирования;  
 $Dt$  – количество удвоений культуры.

Для выявления клеток на биоматериале Гиаматрикс проводили окраску ядерным флуоресцентным красителем DAPI и красителем Гимза.

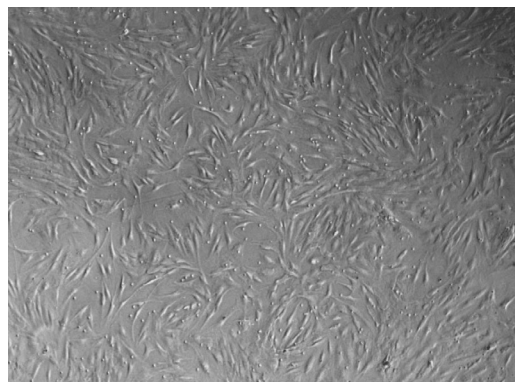
Иммунофенотипирование проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto (Becton Dickinson) непосредственно перед посевом и после снятия клеток на 19 и 26 сутки культивирования.

Определяли антигены на поверхности клеток с помощью моноклональных антител (Becton Dickinson): анти CD 90, CD 44, CD 45, CD73, HLA – DR, HLA – ABC, антитела против антигенов CD 34, CD 105, CD 14, меченные фикоэретрином (PE) или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC).

Для анализа использовали суспензию с содержанием не менее  $3 \times 10^5$  клеток, контролем служили клетки, не обработанные антителами. Учитывая однотипность красителей на различных антителах и отсутствие возможности установки компенсации флуоресценции, проводили одноцветный анализ для каждого антитела. Показатели флуоресценции интерпретировали в программе FACS Diva 5.0.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе эксперимента мы не обнаружили какого-либо негативного или токсического воздействия исследуемого материала на популяцию клеток, напротив, данные изучения пролиферативной активности свидетельствуют о ее стимуляции. При изучении пролиферативной активности на протяжении всего срока культивирования нам не удалось най-

ти каких-либо значимых различий в исследуемой и испытываемой группе. Морфология клеток оставалась классической фибробластоподобной, то есть клетки имели веретенообразный вид, ровные края и отростки, ядра четкие (рис. 1).



**Рис. 1.** Культура клеток при совместном культивировании с биоматериалом, 19 сутки культивирования, плотность около 80%. Опыт. Фазовый контраст, об-в 5х, ок 10х

Клетки в контрольных образцах достигли монослоя на 19 сутки культивирования, в образцах с добавлением биоматериала Гиаматрикс – на 26 сутки. Это связано с тем, что при посеве клеток в присутствии исследуемого биоматериала часть клеток адгезировалась к Гиаматриксу, тем самым снижая плотность посева на пластике, что способствовало увеличению времени получения монослоя. Отдельно следует отметить, что исследуемый материал не был прикреплен и при перемещении культуральной посуды от инкубатора к микроскопу свободно смещался, повреждая культуру клеток.

Согласно данным кластерного анализа, мы выделили две группы клеток – пролиферативно активные, вклю-

Таблица 1

*Доли различных типов клеток при культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с использованием различных материалов (%)*

Характеристики клеток	Контроль	Гиаматрикс
Гигантские клетки	4,6	2,8
Взрослые клетки	20,9	29,5
Незрелые клетки	74,4	67,6

чающие в себя незрелые и взрослые клетки и пролиферативно не активные, включающие в себя гигантские кластерного анализа (таблица 2). Для выявления клеток на исследуемом материале была выполнена окраска

Таблица 2

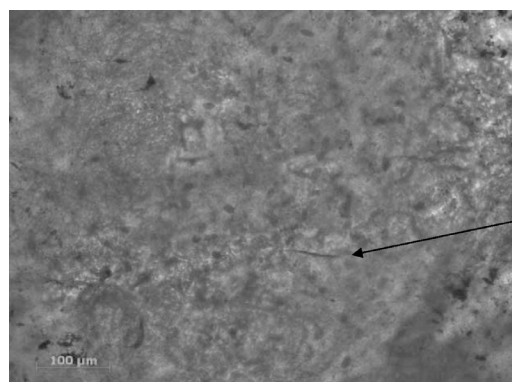
*Пролиферативная активность клеток при культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с использованием различных материалов*

Показатели	Контроль	Гиаматрикс
Удвоений в час	0,01	0,01
Количество удвоений	4,57	5,73

клетки (Волчков С.Е., 2010). В ходе постоянного изучения кластерного анализа мы обнаружили, что в опытных образцах процент пролиферативно активных клеток был несколько выше, чем в контрольном образце, а группа пролиферативно неактивных клеток ниже (таблица 1). Полученные данные свидетельствуют о более высокой пролиферативной активности культуры клеток в присутствии изучаемого материала Гиаматрикс.

В группе с применением биоматериала скорость удвоения составила 0,01 удвоения/ч при общем количестве удвоений 5,73. В то же время в контрольных образцах скорость удвоения составила 0,01 удвоения/ч, при общем количестве удвоений 4,57, то есть ниже, чем в группе с добавлением материала Гиаматрикс, что коррелирует с данными о пролиферативной активности на основе

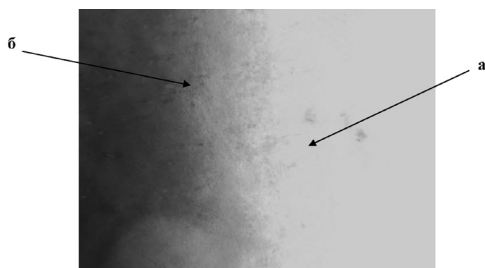
красителем Гимза на 26 сутки культивирования. После окраски на участках истончения материала достаточно четко визуализировались ядра клеток (рис. 2).



**Рис. 2. Клетки на материале Гиаматрикс. Опыт. Краситель Гимза, об-в 5х, ок 10х**

Также была произведена окраска клеток ядерным красителем DAPI на 26 сутки культивирования. В результате окрашивания в местах истончения

биоматериала на его поверхности четко визуализировались ядра клеток (рис. 3).



**Рис. 3. Ядра клеток на Гиаматриксе, краситель DAPI. Опыт.**

*а – биоматериал Гиаматрикс, б – ядра клеток, об-в 10х, ок 10х*

На 19 и 26 сутки культивирования проводили оценку экспрессии поверхностных антигенов (CD90,44,45,HLA-A BC, HLA-DR, 73,34, 105,14), характерных для мультипотентных мезенхимальных клеток в контрольной группе и всех сериях с материалами. Установлено, что исследуемые клетки в начале и по окончании эксперимента экспрессировали следующие антигены: CD90, CD44, HLA-ABC, CD73, CD105, наличие которых представляет собой характерный признак стромальных клеток (рисунок 4).

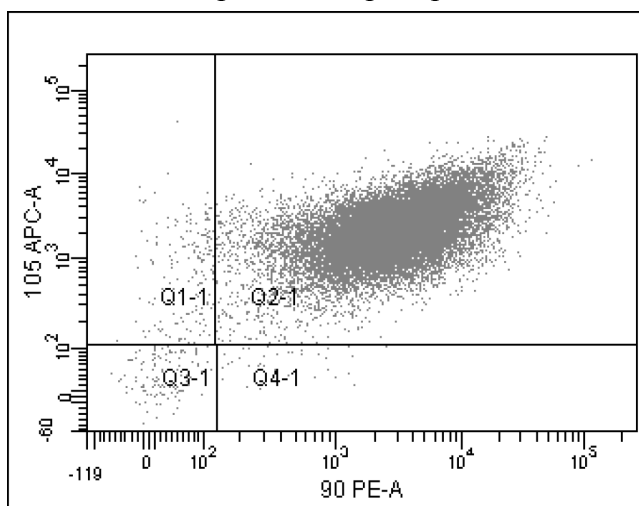
Наблюдалось отсутствие экспрессии следующих антигенов: CD 45, CD 34, HLA-DR, CD 14, что также подтверждает

принадлежность к стромальным клеткам

Результаты иммунофенотипического исследования свидетельствовали о стабильной принадлежности исследуемых клеток к группе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, что подтверждало отсутствие признаков гемопоэтической трансформации и изменений линейного происхождения.

Таким образом, применение красителя Гимза с высокой концентрацией красителя в ядрах позволило визуализировать клетки на исследуемом материале. Окраска с помощью DAPI также показала наличие ядер клеток на материале. Максимально большие скопления клеток были выявлены на периферии материала, в центре отмечено менее плотное и более упорядоченное расположение клеток (по ориентации ядер).

**Вывод.** Полученные данные позволили сделать вывод, что исследуемый материал Гиаматрикс является биологически активным, повышая пролиферативный потенциал клеток, обладает биологической совместимостью, обеспечивая адгезию клеток на поверхности, и не оказывает какого-либо влияния на морфологические характеристики клеток.



**Рис. 4. Распределение клеток по уровню экспрессии CD105 и CD90 по данным проточной цитофлуориметрии. Опыт. Участок Q2-1 соответствует клеткам, экспрессирующим данные CD**