

*V Международная (75 Всероссийская) научно-практическая конференция
«Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения»*

УДК 616.5

**Перминова К.Е., Сичкар Д.А., Makeev O.G.
РАЗРАБОТКА 3D БИОЭКВИВАЛЕНТА КОЖИ**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий геной и клеточной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

**Perminova K.E., Sichkar D.A., Makeev O.G.
DEVELOPMENT OF 3D SKIN BIOEQUIVALENT**

Department of medical biology and genetics
Laboratory of gen- technology and cellular therapy
Institute of medical cell technologies
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты исследований по разработке биоэквивалента кожи на основе аутологичных клеток, осажденных на биоразлагаемые микросферы. Разрабатываемая 3D тканеинженерная конструкция предназначена для патогенетической терапии тяжёлых повреждений кожи путем восполнения дефицита клеточной массы органа в области поражения, а также стимуляции процессов регенерации ткани у пациентов с трофическими язвами при сахарном диабете, пролежнях и других заболеваниях кожных покровов.

Annotation. The paper presents the results of studies on the development of a bioequivalent skin(dermis) based on autologous cells deposited on biodegradable microspheres. The 3D tissue-engineering design under development is intended for the pathogenetic treatment of severe skin lesions by filling in the deficit of the organ cell mass in the affected area, as well as stimulating tissue regeneration processes in patients with trophic ulcers in diabetes mellitus, pressure sores and other skin diseases.

Ключевые слова: биоэквивалент кожи, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, фибробласты, заболевания кожных покровов, трофические язвы.

Key words: skin bioequivalent, mesenchymal multipotent stromal cells, fibroblasts, skin diseases, trophic ulcers.

Введение

Одним из наиболее тяжелых осложнений сахарного диабета является синдром диабетической стопы (СДС). По данным некоторых авторов, СДС является основной причиной ампутации нижних конечностей и достигает около 50-70%[1]. Ежегодно в России совершается около 13 тысяч операций по причине данного заболевания. Также не менее 1,5 млн. человек страдают от таких заболеваний кожи как трофические язвы, аутоиммунные (буллезный эпидермолиз, осложненные формы псориаза, коллагенозы), термические ожоги. Разрабатываемый эквивалент кожи позволит сократить количество ампутаций при сахарном диабете и других заболеваниях, сопровождаемых тяжелыми повреждениями кожи. Также использование кожного эквивалента позволит значительно ускорить процессы регенерации повреждений кожи, что сократит процент инвалидизации и, соответственно, потерю трудоспособности.

Цель исследования - разработать биоэквивалент кожи на основе аутологичных клеток пациента, осажденных на биоразлагаемые микросферы, и предназначенный для замещения поврежденных клеток, а также стимуляции процессов регенерации ткани кожных покровов.

Материалы и методы исследования

Использовали культуры ММСК и культуры фибробластов, выделенных у трех пациентов в возрасте от 24 до 42 лет после подписания ими добровольного информированного согласия. ММСК выделяли ферментативным способом из жировой ткани, полученной в результате липоаспирации в области нижней горизонтальной складки передней брюшной стенки. Выделение клеточной культуры фибробластов осуществлялось из кожного лоскута. Лоскут был получен от здорового донора. Эксплантация лоскута проводилась с ягодичной области. Далее кожный эксплантат помещался в транспортировочный раствор, содержащий специализированные антибиотики для использования *in vitro*. Полученную первичную культуру инкубировали в стандартных условиях (37°C, CO₂ 5%, влажность 95%). Для культивирования использовалась смесевая культуральная среда Ham's/DMEM F-12 (Sigma Aldrich), фетальная бычья сыворотка FBS (Sigma Aldrich) в концентрации 10% и фактор роста эндотелия сосудов VEGFA. Все культуры, задействованные в эксперименте, прошли испытания по исследованию генетической [2] и инфекционной безопасности [3, 4]. Количество ММСК в культурах оценивалось методом непрямой иммунофлуоресценции по наличию Stro-1 маркера [5], который является специфичным для клеток, обладающих свойствами плюрипотентности. Обычно культуры фибробластов содержат до 0,05% Stro-1 позитивных клеток [6].

Для разработки оптимального режима обогащения культур фибробластов мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками проводился ряд экспериментов:

Культуры фибробластов смешивали с культурами ММСК в соотношениях:

- 25% ММСК и 75% фибробластов;

- 50% ММСК и 50% фибробластов;

- 75% ММСК и 25% фибробластов.

Во всех трех вариантах применяли 2 режима смешивания:

1) клетки снимали с культуральной поверхности трипсином-ЭДТА (Sigma), фермент нейтрализовали фетальной телячьей сывороткой (Sigma), отмывали в растворе PBS 2 раза. Затем отмывые культуры смешивали пипетированием и центрифугировали при 150 G 5 минут;

2) клетки снимали с культуральной поверхности трипсином-ЭДТА (Sigma), фермент нейтрализовали фетальной телячьей сывороткой (Sigma), отмывали в растворе PBS 2 раза. Затем отмывые культуры смешивали пипетированием и центрифугировали в растворе DMEM (Sigma), при 100 G 15 минут.

Полученные в осадке клетки высевали на культуральную поверхность в средах DMEM и DMEM/ HamF-12, с добавлением 5% FBS (Sigma), при 37°C, концентрации CO₂ 5% и 95% влажности.

Для нанесения клеточных культур был выбран скаффолд, имеющий в своем составе поли-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-Д-глюко)-Д-глюкуроногликан, структурированный при помощи электромагнитного излучения с длиной волны от 400 нм до 200нм.

Были исследованы 5 продуктов:

- Продукт № 1 микросферы из структурированного поли-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-Д-глюко)-Д-глюкуроногликана и смешанная культура клеток фибробластов и ММСК № 12МК 3204681

- Продукт № 2 микросферы из структурированного поли-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-Д-глюко)-Д-глюкуроногликана и смешанная культура клеток фибробластов и ММСК № 12МК 3204682

- Продукт № 3 микросферы из структурированного поли-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-Д-глюко)-Д-глюкуроногликана и смешанная культура клеток фибробластов и ММСК № 12МК 3204683

- Продукт № 4 микросферы из структурированного поли-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-Д-глюко)-Д-глюкуроногликана и смешанная культура клеток фибробластов и ММСК № 12МК 3204684

- Продукт № 5 микросферы из структурированного поли-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-Д-глюко)-Д-глюкуроногликана и смешанная культура клеток фибробластов и ММСК № 12МК 3204685

Нанесение клеточной культуры на скаффолд (микросферы) производилось следующими методами:

1) нанесение клеточной культуры на скаффолд непосредственно перед применением – клеточную суспензию смешивали с заранее подготовленными микросферами в соотношении 1:1 и наносили на раневую поверхность;

2) нанесение клеточной культуры на скаффолд с последующим культивированием тканеинженерной конструкции в течении суток - клеточную

культуру адгезировали на заранее подготовленные микросферы и помещали в CO₂ инкубатор на 24 часа (37⁰C, 5% CO₂, 95% влажность);

3) отдельное культивирование клеточной культуры и скаффолда с последующим нанесением клеток на микросферы – микросферы помещались во флакон с культуральной средой, флакон на 24 часа помещался в CO₂ инкубатор, клеточная культура культивировалась в отдельном флаконе. Адгезия клеток на микросферы происходила непосредственно перед нанесением на раневую поверхность.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам эксперимента было выявлено, что более мягкий режим центрифугирования и последующее культивирование в полной среде (DMEM) способствует наибольшей сохранности клеточных элементов, обладающих свойствами мультипотентности (таблица 1)

Таблица 1

Доля Stro-1 позитивных клеток (%) в культуре в зависимости от режима смешивания и исходного количества ММСК на 7 сутки культивирования

Режим смешивания и состав среды для культивирования	25% ММСК и 75% фибробластов	50% ММСК и 50% фибробластов	75% ММСК и 25% фибробластов
Режим смешивания 1 DMEM/ Ham F-12	0,35	0,4	0,4
Режим смешивания 1 DMEM	0,37	0,4	0,4
Режим смешивания 2 DMEM/ Ham F-12	0,45	0,5	0,5
Режим смешивания 2 DMEM	0,55	0,55	0,57

Наименьшее время достижения монослоя наблюдается у культур, изначально смешанной в пропорции 50% ММСК и 50% фибробластов, а также 75% ММСК и 25% фибробластов, при культивировании в среде DMEM и 2-ом режиме смешивания. У культуры, изначально содержащей 25 % ММСК, время достижения 90% монослоя на одни сутки больше. При этом доля Stro-1 позитивных клеток во всех трех случаях отличается незначительно.

В связи с тем, что на выделение и культивирование ММСК затрачивается значительно больше времени, чем на выделение и культивирование фибробластов, а также с учетом специфики сахарного диабета (СД1), ограничивающего объем эксплантата жировой ткани пациента, оптимальным режимом получения и культивирования смешанной культуры ММСК и фибробластов можно считать следующий:

Культуры смешивают в соотношении 25% ММСК и 75% фибробластов при центрифугировании в 100 G в среде DMEM, с плотностью посева культуры после смешивания не более 20% конфлюенции.

Клетки культивируют в среде DMEM с добавлением 5 % FBS, при 95 % влажности и 5% CO₂.

По результатам проведенных исследований, был выделен оптимальный состав микросфер - микросферы из структурированного поли-(2-ацетида-2-дезоксид-Д-глюко)-Д-глюкуроногликана № 12МК 3204684. Микросферы данного состава обеспечивают наибольшую адгезию клеток на своей поверхности.

В качестве оптимального метода нанесения культуры клеток на скаффолд был выбран метод № 3 - с предкультивированием скаффолда и клеточной культуры, так как именно этот метод позволяет достичь нужной консистенции тканеинженерной конструкции (консистенция густой мази позволяет заполнить неровности раневого дефекта, вязкость продукта обеспечивает фиксацию в ране и предохраняет продукт от вытекания).

Выводы:

1. В результате проведенных экспериментов был подобран наиболее приемлемый состав скаффолда, на который адгезировались клеточные культуры, а также создан оптимальный режим культивирования ММСКи фибробластов.

2. Для терапии тяжелых повреждений кожи с осложненным рельефом раневой поверхности был разработан 3D биоэквивалент кожи, имеющий форму геля, что позволяет раневой дефект любой сложности.

Список литературы:

1. Тупикин Р.С. Современная классификация синдрома диабетической стопы SVSWIFI/ Р.С. Тупикин, С.К. Чибиров, А.А. Зебелян, А.Н. Федорченко, В.А. Порханов//Иновационная медицина Кубани. – 2018 - №2(10) – с. 73-74

2. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. Патент № 2345781 «Способ получения культуры клеток кожи». // Бюллетень изобретений № 4, 10.02.2009

3. Макеев О.Г., Буханцев В.А., Куликов Е.С., Измайлов И.Х., Костюкова С.В., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Тарасевич А.А. Мониторинг мутаций генов-супрессоров и протоонкогенов в структуре обеспечения безопасности применения клеточных технологий// Вестник уральской медицинской академической науки. Екатеринбург. 2006. №2(12). С. 15-22

4. Макеев О.Г., Буханцев В.А., Куликов Е.С., Костюкова С.В., Тарасевич А.А., Измайлов И.Х. Критерии безопасности применения аутологичных клеточных культур при проведении клинических испытаний// материалы всероссийской научно-практической конференции «Клеточные и нанотехнологии в биологии и медицине». Курган. 2007.с.65-66

5. Макеев О.Г., Куликов Е.С., Буханцев В.А., Измайлов И.Х., Костюкова С.В., Тарасевич А.А. Основные принципы мониторинга безопасности применения аутологичных клеточных культур// Материалы III всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». Москва. 2007. с 81-82

6.Simmons P.J. Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood 1991; 78: 55-62

УДК: 616.12-02:613.863

**Плотникова П.А., Павлова В.Н., Тетерлева И.А., Соцков А.Ю.,
Пономарев Д.Н., Ганеева Е.Р.
ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПСИХИЧЕСКОЙ НАПРЯЖЁННОСТИ И
ФАКТОРОВ РИСКА РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Кафедра патологической физиологии
Пермский государственный медицинский университет
имени академика Е.А. Вагнера
Пермь, Российская Федерация

**Plotnikova P.A., Pavlova V.N., Tetereva I.A., Sotskov A.Yu.,
Ponomarev D.N., Ganeeva E.R.
STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN MENTAL TENSION AND
RISK FACTORS FOR DEVELOPING CARDIOVASCULAR DISEASES**

Department of pathological physiology
Perm State Medical University named after academic E. A. Vagner
Perm, Russian Federation

E-mail: polina.plotnikova.99@list.ru

Аннотация: провели исследование влияния психической напряжённости на факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, которое выявило статистически достоверную тенденцию к ухудшению показателей артериального давления, частоты сердечных сокращений и уровня глюкозы в крови после 3-часового голодания при увеличении уровня психической напряженности у студентов 3 курса. Наибольшая часть обследуемых с высоким уровнем стресса имели вредную привычку – курение.

Annotation: conducted a study of the influence of mental stress on risk factors for developing cardiovascular diseases, which revealed a statistically significant tendency to worsen blood pressure, heart rate and blood glucose levels after 3-hour fasting with an increase in the level of mental stress in 3rd-year students. The largest part of the subjects with high levels of stress had a bad habit – Smoking.

Ключевые слова: психологическая адаптированность, сердечно-сосудистые заболевания.

Key words: psychological adaptation, cardiovascular diseases.

Введение