

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
ХАРАКТЕРИСТИК МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В
УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 06.03.01 Биология
заочной формы обучения, группы 11001455
Босенко Никиты Сергеевича

Научный руководитель
к.б.н., доцент Зубарева Е.В.

БЕЛГОРОД 2019

Оглавление

Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	10
1.1. Классификация стволовых клеток.....	10
1.2. Мезенхимные стволовые клетки различного происхождения	17
1.2.1. Экспрессия маркеров на поверхности клеток	18
1.3. Способность к дифференцировке и пролиферации.....	20
1.3.1. Сравнение способности к пролиферации между МСК-ЖТ и МСК пуповины.....	20
1.3.2. Способность к дифференцировке и пластичность МСК-ЖТ и МСК пуповины.....	21
1.3.3. Адипогенная дифференцировка.....	22
1.3.4. Хондрогенная дифференцировка	22
1.3.5. Остеогенная дифференцировка	23
1.4. Влияние физико-химических характеристик различных субстратов на дифференцировку клеток	23
Глава 2. Материалы и методы исследования	25
2.1. Организация эксперимента	25
2.2. Методика изготовления волокон	25
2.3. Подготовка стекол.....	26
2.4. Подготовка чашек	26
2.5. Подготовка клеток.....	27
2.6. Окрашивание клеток.....	27
2.2. Методы статистической обработки экспериментальных	29
данных	29
Глава 3. Результаты исследования	30
3.1. Изменение активности митохондрий мезенхимных стволовых клеток в условиях культивирования на поверхностях, характеризующихся различными свойствами	30

3.2. Изменение площади контакта клеток с поверхностью в условиях культивирования на различных субстратах	33
Заключение	Ошибка! Закладка не определена.
Список использованных источников	37

Список сокращений

СК – стволовые клетки

ЦНС – центральная нервная система

СПК – стволовые прогениторные клетки

SP-клетки («Side Population» cells) – клетки побочной популяции

ADSCs (Adipose-Derived Stem Cells) – стволовые клетки, выделенные из жировой ткани

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

МАРС (Multipotent Adult Progenitor Cells) – мультипотентные взрослые прогениторные клетки

ЭСК – Эмбриональные стволовые клетки

МСК-КМ – МСК костного мозга

МСК-ЖТ – МСК жировой ткани

МСК-ПК – МСК периферической крови

SDF-1 (Stromal Cell-derived factor-1) – хемоаттрактант для В-лимфоцитов и гемопоэтических клеток-предшественников. В эмбриональном развитии управляет миграцией различных типов клеток. Выступает как ростовой фактор для В-клеток и стимулирует их пролиферацию

BMP (bone morphogenetic proteins) – костный морфогенетический белок, фактор роста. Одна из основных групп морфогенетических сигнальных белков, организующих построение тканей в теле

Ost-4 – транскрипционный фактор, содержащий гомеобокс. Данный белок участвует в самообновлении недифференцированных ЭСК. Является маркером недифференцированных клеток

SOX2 – транскрипционный фактор. Является маркером плюрипотентности недифференцированных ЭСК

SSEA-1 (CD15) – углеводная молекула, является маркером плюрипотентных СК, в которых играет роль в адгезии и миграции клеток в эмбрионе

NANOG – транскрипционный фактор. Участвует в самообновлении недифференцированных ЭСК

FGF2 (fibroblast growth factor 2) – фактор роста фибробластов, группа факторов роста, участвующих в ангиогенезе и эмбриональном развитии

COL2A1 – коллаген 2 типа альфа-1. Фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма

GDF5 (Growth and Differentiation Factor) – фактор роста и дифференцировки 5. Входит в подгруппу, участвующую в инициальных стадиях аппендикулярного скелетогенеза, включая индукцию образования хряща, детерминацию сустав-формирующей области, рост хрящевых зачатков длинных костей, инициацию оссификации и возникновение сухожилий

GAG – гликозаминогликан, мукополисахарид, компонент внеклеточного матрикса

ALP (Alkaline phosphatase) – фермент гидролаза, дефосфорилирующая нуклеотиды, белки и алкалоиды

PBS (Phosphate buffered saline) – натрий-фосфатный буфер

ДМСО – диметилсульфоксид (CH₃)₂SO

CD9 – гликопротеин из надсемейства тетраспанинов. Играет роль в клеточной миграции и адгезии

CD11b – гликопротеин из надсемейства интегринов. Играет роль в различных взаимодействиях моноцитов, макрофагов и гранулоцитов. Опосредует поглощение частиц, покрытых комплементом

CD13 – аланинаминопептидаза, фермент, относящийся к классу пептидаз или протеаз. Играет роль в ферментативной регуляции пептидов

CD14 – гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок, экспрессированный на поверхности клеток миелоидного ряда. Является маркером зрелых моноцитов/макрофагов

CD29 – Бета-1-интегрин, субъединица интегринового рецептора. Все образуемые в результате рецепторы способны связываться с белками внеклеточного матрикса

CD31 (PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1) – гликопротеин, мембранный белок из суперсемейства иммуноглобулинов. Относится к классу молекул клеточной адгезии. Один из основных белков межклеточных контактов эндотелиальных клеток

CD34 – молекула межклеточной адгезии, играющая роль на ранних этапах кроветворения. Опосредует связывание стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или напрямую со стромальными клетками

CD44 – интегральный клеточный гликопротеин, участвующий в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии

CD45 (PTPRC, Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C) – тирозиновая протеинфосфатаза С рецепторного типа. Член семейства тирозиновых протеинфосфатаз, которые являются компонентами сигнальных путей клетки, регулирующих рост, дифференцировку, митотический цикл и злокачественное перерождение клетки

CD54 (ICAM-1, inter-cellular adhesion molecule 1) – молекула клеточной адгезии, присутствующая в низкой концентрации на мембранах лейкоцитов и эндотелиальных клетках

CD70 (TNFSF7, Tumor necrosis factor ligand superfamily member 7) – цитокин семейства факторов некроза опухоли, локализующийся, в основном, на активированных Т- и В-лимфоцитах

CD73 (SH3) – Экто-5'нуклеотидаза – фермент нуклеотидаза. Расщепляет аденазинмонофосфат до аденозина

CD90 (Thy-1-антиген) – член суперсемейства иммуноглобулинов. Антиген клеточной поверхности.

CD105 (SH2) – эндоглин. Играет ключевую роль в ангиогенезе, является важным белком, участвующим в росте опухоли, в выживании и метастазировании опухолевых клеток

CD106 (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1) – васкулярная молекула клеточной адгезии. Белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов. Участвует в адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток, передаче сигналов

CD133 – промиелин-1. Гликопротеин, являющийся членом пентаспана транс-мембранных гликопротеинов, которые специфически локализируются в со-
вые выступы

CD144 – кадгерин 5 2-го типа, белок клеточной адгезии эндотелия сосудов из семейства кадгеринов. Контролирует и организует межклеточные соединения.

CD146 (MCAM, melanoma cell adhesion molecule)

CD166 (ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule) – молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов. Мембранный белок из суперсемейства иммуноглобулинов. Относится к классу молекул клеточной адгезии.

HLA-I (human leukocyte antigen). Молекулы главного комплекса гистосовместимости 1 класса. Представляют собой фрагменты белков, разрушенных в протеасомах

HLA-II (human leukocyte antigen). Молекулы главного комплекса гистосовместимости 2 класса. Представляют антигены из пространства вне клетки Т-лимфоцитам

STRO-1 – маркер мезенхимных стволовых клеток

Введение

Современный смысл в термин «стволовая клетка» вложил выдающийся профессор Императорской военно-медицинской академии Александр Александрович Максимов. В своем докладе на заседании Берлинского гематологического Общества 1 июня 1909 г он охарактеризовал стволовые клетки как недифференцированные элементы с круглым светлым ядром и узкой базофильной протоплазмой, не являющиеся ни красными, ни белыми кровяными тельцами. В то же время Максимов провел аналогию с белыми кровяными тельцами, «стволовые клетки иногда, в особенности у цыплят, имеют амебодную форму и очень похожи на большие лимфоциты» [11].

Клетки организма человека в основной массе являются специализированными. Всего в нашем организме более 200 типов специализированных клеток, которые соответствуют и определяют специфические функции органов и тканей.

Стволовая клетка, по своей сути, это недифференцированная клетка, способная к самовоспроизведению, т.е. делению, в результате которого образуются стволовые клетки, самообновлению, т.е. сохранению жизнеспособности в результате внутриклеточной регенерации, и дифференцировке, т.е. необратимому преобразованию в специализированные клетки, образующие различные ткани и органы [10].

В настоящее время существует множество проблем, связанных с медициной, к которым можно отнести такие болезни, как рак, СПИД, лечение после травм и др. Тем не менее, большинство из них могут решиться с помощью применения стволовых клеток. Данный факт объясняется тем, что стволовые клетки играют ведущую роль в организации многоклеточных организмов и являются центральным элементом структурно-функциональных единиц тканей и органов. В современной медицине стволовые клетки человека трансплантируют в лечебных целях, например, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток производится с целью восстановления гемопоэза при

лечении лейкозов и лимфом. По мнению Августа Вейсмана, немецкого зоолога и теоретика эволюционного учения, стволовые клетки – это не только единицы организации ткани, но и единицы эволюции. По этой причине, тема изучения стволовых клеток актуальна в данное время, и будет актуальна, возможно, еще несколько десятков лет.

Целью исследования является изучение морфофункциональных характеристик мезенхимных стволовых клеток в условиях культивирования на различных субстратах.

Объектом исследования являются недифференцированные мезенхимные стволовые клетки, полученные из жировой ткани человека.

Предмет исследования – морфофункциональные характеристики мезенхимных стволовых клеток человека.

Для решения поставленной цели были определены следующие задачи:

- 1) подобрать оптимальную методику изготовления волокон для культивирования мезенхимных стволовых клеток;
- 2) изучить площадь контакта клеток с поверхностью при культивировании на различных субстратах;
- 3) исследовать изменение активности митохондрий мезенхимных стволовых клеток в условиях культивирования на поверхностях, характеризующихся различными свойствами.

Выпускная квалификационная работа изложена на 40 страницах. Составляет из содержания, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований, выводов, заключения и списка использованных источников, который насчитывает 75 наименований. В работе используется 3 таблицы и 3 рисунка.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Классификация стволовых клеток

В основу классификации положена либо способность клеток к дифференцировке, либо происхождение [14]. По способности к дифференцировке различают:

1. Тотипотентные СК (стволовые клетки) (от лат. totus – полный, единый; potentia – сила, мощь, возможность) – способны дифференцироваться в полноценный организм. Являются эмбриональными клетками и клетками внезародышевых структур до имплантации (11-й день после оплодотворения).

2. Плюрипотентные СК (от лат. pluralis – множественный) – способны дифференцироваться во все типы клеток, кроме клеток внезародышевых органов, таких как, плацента и желточный мешок. К этому типу клеток относят эмбриональные СК с постимплантационного периода до 8-й недели включительно, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином [10]. Мультипотентные СК – способны образовывать специализированные клетки нескольких типов, например, нейроны, гепатоциты, гемоциты

3. Унипотентные СК – клетки, дифференцирующиеся при обычных условиях только в специализированные клетки определенного типа

По происхождению различают:

1. Эмбриональные СК (ЭСК) – клетки, выделяющиеся из внутренней клеточной массы на ранних стадиях развития эмбрионов (как правило, используются 4- и 5-суточные бластоцисты). Описаны методы получения ЭСК из морулы и из одиночного blastомера. Являются плюрипотентными, могут дифференцироваться во все три первичных зародышевых листка: эктодерму, энтодерму и мезодерму [12]. Фетальные СК – клетки, получаемые из абортивного материала со сроком гестации 9–12 недель. Являются смесью мультипотентных и унипотентных СК.

2. СК пуповинной и плацентарной крови – клетки, получаемые из плацентарно-пуповинной крови. СК, выделенные из пуповинной крови не экс-

прессорируют HLA-DR – антигены, характеризуются меньшей иммуногенностью при аллогенных трансплантациях, поэтому могут быть использованы при неполной совместимости по HLA-антигенам. Являются плюрипотентными СК [10].

Отдельной классификации подлежат постнатальные стволовые клетки. Это стволовые клетки зрелого организма, они обладают меньшей потенциальностью в сравнении с фетальными и эмбриональными стволовыми клетками.

Во взрослом организме человека в тех органах и тканях, которые нуждаются в постоянном обновлении, находятся собственные унипотентные стволовые клетки, которые называют региональными. Они могут дифференцироваться только в определенные типы клеток. К этому типу СК относят все СК костного мозга и тканеспецифичные клетки. Тканеспецифичные СК обнаруживаются в различных видах тканей и отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. Стволовые клетки находятся в большинстве органов и тканей во взрослом организме: в головном, спинном и костном мозге, крови, в эпителиальных тканях, роговице и сетчатке глаза, в эндотелии сосудов, в скелетных мышцах, печени [10].

У постнатальных стволовых клеток есть две качественные особенности. Первая заключается в том, что на протяжении всей жизни они производят подобные себе клетки. Эта особенность, способность к пролиферации, обеспечивает их постоянное самообновление и самоподдержание. Вторая особенность – способность к генерированию зрелых клеток с характерными морфологическими и функциональными свойствами.

В тканях взрослого организма доля стволовых клеток достаточно мала. Например, гемопоэтические стволовые клетки встречаются с частотой 1:10 – 15 тыс. клеток костного мозга или 1:100 тыс. клеток периферической крови. По мере взросления человека происходит значительное уменьшение количества СК. Для сравнения, у новорожденного ребенка доля стволовых клеток составляет примерно 1:10 тыс. соматических клеток, т.е. в организме ново-

рожденного присутствует около 50 млрд стволовых клеток. В возрасте старше 60 лет соотношение составляет 1:1 млн. соматических клеток [2, 49].

Рассмотрим классификацию постнатальных региональных стволовых клеток:

1. СК кожи. Эпидермис – сложно организованная клеточная система, нуждающаяся в быстром обновлении. Основным компонентом эпидермиса являются кератиноциты. Встречаются и другие клетки, выполняющие свои функции, такие как меланоциты, фибробласты и клетки Лангерганса. Базальный слой эпидермиса включает транзиторные и стволовые клетки, которые после перехода в шиповатый слой начинают активно дифференцироваться. Скоординированное взаимодействие между клетками различных тканей и органов осуществляется благодаря межклеточным взаимодействиям, с помощью которых возможна согласованная регуляция пролиферации, дифференцировки, метаболизма и проявления физиологических функций специализированных клеток. Важная роль отводится цитокинам и ростовым факторам, которые обеспечивают регуляцию межклеточного взаимодействия посредством взаимодействия со специфическими рецепторами [5].

2. Нейральные СК. Ранее считалось, что центральная нервная система (цнс) млекопитающих относится к тканям, в которых не происходит физиологическая репарация, однако, исходя из данных последних лет можно судить о существовании в ЦНС нейральных прогениторных клеток. Самообновление и нейрогенез нейральных СК обнаружен в строго локализованных областях мозга:

- субэпидемальный слой спинного мозга;
- субвентрикулярная зона боковых желудочков;
- зубчатая извилина гиппокампа;
- обонятельная луковица;
- обонятельный эпителий.

Нейральные стволовые прогениторные клетки (СПК) являются мультипотентными, и имеют возможность дифференцироваться в любую зрелую клетку нервной системы, например, в астроциты, олигодендроциты или нейроны. Маркером нейральных СПК является нестин – белок промежуточных филаментов [5].

3. СК мышечной ткани. В настоящее время идентифицировано 3 популяции стволовых клеток скелетных мышц:

- клетки-саттелиты – являются предшественниками миоцитов поперечнополосатой мускулатуры, которые располагаются под базальной мембраной мышечного волокна. Эти клетки в норме находятся в состоянии покоя, однако способны к пролиферации во время постнатального роста или при необходимости регенерации мышечных волокон. Во взрослом организме млекопитающих клетки-саттелиты являются медиаторами мышечного роста, но при повреждениях способны трансформироваться в миогенные клетки-предшественники, которые затем дифференцируются в миофибриллы скелетной мускулатуры;

- клетки в дорсальном участке аорты;

- клетки побочной популяции, т.н. SP-клетки (клетки побочной популяции), которые присутствуют в мышцах и костном мозге, и принимают участие в регенерации мышечных волокон. Клетки этой популяции экспрессируют маркеры CD45 и Sca-1, которые характерны для гемопоэтических клеток. Обладают миогенным и гемопоэтическим потенциалом [1, 8].

4. СК сердца. Ранее считалось, что клеточная регенерация миокарда невозможна, и, как следствие, сердце не в состоянии восстановить нормальную функцию после ишемического повреждения, исключалась возможность присутствия в сердце стволовых клеток. Однако, в настоящее время известно, что в миокарде содержится пул незрелых кардиомиоцитов, а значит сердце обладает некоторым регенеративным потенциалом [8, 9]. Существуют две гипотезы, которые объясняют появление делящихся кардиомиоцитов в мио-

карде после инфаркта. Согласно первой, в сердце существует постоянная популяция резидентных СК, которые могут участвовать в процессе регенерации миокарда при повреждении. Источником этих клеток являются клетки из кардиогенных пластин в эмбриогенезе, экспрессирующие транскрипционный фактор *islet*-которые остаются в сердце после рождения и могут вступать в клеточный цикл в постнатальный период. Согласно второй гипотезе, в крови находятся прогениторные клетки, которые покидают костный мозг в ответ на повреждение сердечной мышцы и мигрируют в зону ишемии [9, 13, 16, 17]. СК сердца находятся в анатомически защищенных зонах миокарда, которые в наименьшей степени подвержены гемодинамическим нагрузкам, таких как верхушка желудочка и предсердия. В этих нишах СК имеют тесную связь с коммитированными клетками-предшественниками и со стромальными клетками ниши, регулирующими процессы дифференцировки и поддержания СК сердца. Пролиферация стволовых клеток сердца находится под контролем цитокинов и факторов роста. В результате ассиметричного деления, при стимуляции пролиферации СК, образуется две клетки. Первая – первичная стволовая клетка, остается сцепленной со своим микроокружением в нише, а вторая сначала становится прогениторной клеткой, а затем коммитированным предшественником, экспрессирующим транскрипционные факторы и структурные белки. Далее эта клетка покидает нишу и принимает участие в регенерации миокарда, образуя новые сосуды и кардиомиоциты. В одной нише могут локализоваться клетки, которые дифференцируются в разных направлениях: фибробластном, кардиомиоцитарном, эндотелиальном или гладкомышечном.

5. СК жировой ткани. Жировая ткань в течение последних лет рассматривается как альтернатива костному мозгу при получении мезенхимных стволовых клеток. Это связано с некоторыми преимуществами жировой ткани перед костным мозгом: содержание стволовых клеток в жировой ткани превосходит таковое в костном мозге, жировую ткань технически проще получить. По данным из литературы, из 1 мл жира непосредственно после за-

бора можно получить около 1 млн. стволовых клеток, через 2 часа ~ 500 тыс. Через 18 часов хранения жировой ткани при температуре 4°C количество клеток уменьшается еще на 50%. Не имеет значения из какого участка забирала жировую ткань – количество, функциональная активность и жизнеспособность клеток будет одинаковой. Клетки, выделенные из жировой ткани принято называть ADSCs (стволовые клетки, выделенные из жировой ткани) или стромально-васкулярной фракцией, которая включает в себя:

- васкулярные клетки: перициты, гладкомышечные, эндотелиальные, циркулирующие клетки крови (эритроциты, лимфоциты, преадипоциты, макрофаги, Т-лимфоциты);

- фибробластоподобные клетки, располагающиеся вдоль капилляров. Их называют мультипотентными мезенхимными или стромальными СК (МСК или ММСК). Эти клетки обладают высокой пластичностью и способностью превращаться не только в хондро- или остеобласты, но и в адипоциты, миоциты, фибробласты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, гепатоциты, нейроны [7].

Отдельно можно классифицировать стволовые клетки костного мозга. Их количество максимально в костном мозге. Они представлены следующими видами клеток:

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – одни из наиболее ранних элементов в процессах клеточной дифференцировки, пролиферации и миграции, приводящих к образованию всех типов клеток крови. Имеются данные исследований, показывающих возможность ГСК трансдифференцироваться в нервные, скелетные, печеночные клетки, клетки сердечной мышцы и сосудистого эндотелия. Важная особенность ГСК – способность к миграции и рециркуляции в кровяном русле, что позволяет поддерживать их пул в различных регионах организма в том количестве, которое необходимо для регулирования процесса репарации. Источником данного типа клеток во взрослом организме является костный мозг и периферическая кровь [15].

1. Мезенхимные (стромальные) СК. МСК костного мозга – популяция плюрипотентных клеток, которые обладают способностью к дифференцировке в адипоциты, остеобласты, гепатоциты, альвеолярные и ряд других стромальных клеток. Эти стволовые клетки выделяют из костного мозга, содержащегося в плоских костях. В костном мозге количество МСК ~ 0,001 – 0,1%.

Высокая адгезивная способность – одно из свойств МСК, на котором базируется способ их выделения. С возрастом пролиферативный потенциал и количество МСК костного мозга снижается. Данный вид клеток интенсивно размножается *in vitro*, однако после длительного культивирования потенциал пластичности МСК снижается [26,62]. Важнейшими функциями МСК костного мозга являются:

- формирование гепомезининдуцирующего микроокружения;
- формирование стромального микроокружения;
- самоподдержание и восстановление пула МСК;
- формирование стромального микроокружения;
- участие в процессах репарации, регенерации и адаптации системы МСК в норме и в патологии, участие в гомеостатических реакциях;
- способность взаимодействовать с иммунными клетками с помощью растворимых факторов и клеточно-контактным взаимодействием, способность в значительной степени модулировать иммунный ответ организма.

Восстановительные функции МСК обуславливаются их плюрипотентностью, возможностью миграции в область повреждения и высокие адгезионные свойства, т.е. способностью мигрировать и закрепляться в месте повреждения, дифференцироваться и осуществлять функцию замещенных клеток. Именно эти свойства позволяют использовать МСК для репарации и регенерации тканей. Достаточно большое количество исследователей считают, что терапевтический эффект при трансплантации МСК, показанный во мно-

гих клинических и доклинических исследованиях, обусловлен не только дифференцировкой, но и регуляторной функцией этих клеток. МСК не провоцируют иммунный ответ, однако способны подавлять иммунные реакции [7, 10].

2. Мультипотентные взрослые прогениторные клетки (MAPCs) – малочисленная популяция клеток, открытая в процессе работы над МСК костного мозга. Обладает высокой способностью к экспансии и дифференцировке в большинство других типов клеток. Особенностью этих клеток при восстановлении гепомоза является большой потенциал к экспансии *in vitro* без изменения фенотипа. MAPCs экспрессируют некоторые маркеры эмбриональных СК (Oct-4, SSEA-1). Другие маркеры ЭСК (NANOG и Sox-2) MAPCs не экспрессируют и не проявляют способности к образованию тератом [3].

1.2. Мезенхимные стволовые клетки различного происхождения

Мезенхимные стволовые клетки получают из жировой ткани [37], периферической крови [27], из легких [42] или из сердца [24], однако МСК обладают способностью к пролиферации и дифференцировке в совершенно различные типы клеток. Рассмотрим МСК, полученные из костного мозга, жировой ткани и периферической крови взрослого человека.

МСК костного мозга (МСК-КМ) выделяют из аспирата костного мозга. Данная процедура очень болезненна и при ее проведении существует риск инфекции. После извлечения МСК из костного мозга их центрифугируют в градиенте плотности [63]. Полученную фракцию, содержащую мононуклеарные клетки, промывают и помещают в пластиковую посуду для их дальнейшего культивирования. Вместо центрифугирования некоторые группы ученых используют адгезию к пластику для получения МСК из костного мозга.

МСК жировой ткани (МСК-ЖТ) выделяют из материала, полученного при липосакции, липопластике, липэктомии путем ферментативного расщепления коллагеназой с последующим центрифугированием и промыванием.

МСК периферической крови (МСК-ПК) могут быть получены из фракции мононуклеарных клеток после их центрифугирования в градиенте плотности [27]. Другой метод описан Kassis и др., в котором эти клетки выделяют из фракции мононуклеарных клеток путем загрузки МСК на фибриновые микрогранулы с последующим их разделением [52].

Количество МСК, которое может быть получено с помощью описанных способов сильно различается. Pittenger и др., выделяя МСК из костного мозга с помощью центрифугирования в градиенте концентрации, после избавления от нежелательных типов клеток получили лишь 0,001 – 0,1% МСК. Из 1 грамма жировой ткани можно получить до 5×10^3 стволовых клеток, что в 500 раз больше, чем можно получить из такого же количества костного мозга [39]. МСК-ПК проявляют колониобразующую эффективность в диапазоне от 1,2 до 13 клеток на 1 миллион мононуклеарных клеток [69].

Минимальные критерии для определения человеческих МСК были опубликованы в 2006 году Dominici и др. Они включают наличие экспрессии молекул CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD44 и CD90, и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a или CD19 и HLA-DR. Кроме того, МСК при помещении в пластиковую посуду со стандартной средой для культивирования должны проявлять способность к дифференцировке в остеобласты, хондроциты и адипоциты [34].

1.2.1. Экспрессия маркеров на поверхности клеток

Авторы некоторых публикаций в своих работах демонстрируют наличие на поверхности клеток маркеров стволовых клеток CD44, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2) и CD166 и отсутствие гепомезических маркеров CD14, CD34 или CD45 в МСК-КМ и в МСК Вартонова студня [18,63]. Schaffler и др. определили в МСК-ЖТ наличие маркеров CD9, CD29, CD44, CD54, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2), CD106, CD146, CD166 и HLA I и отсутствие CD14, CD31, CD34, CD45, CD133, CD144, HLA-DR, STRO-1 и HLA II [64].

De Ugarte и др. с помощью проточной цитометрии проанализировали МСК-КМ и МСК-ЖТ и обнаружили, что оба типа этих клеток экспрессируют CD13, CD29, CD44, CD90, CD105 (SH2), CD73 (SH3) и STRO-1. Однако, была обнаружена разница в экспрессии CD49d, CD54, CD34 и CD106 между этими двумя типами клеток [33]. Zuk и др. также сравнили маркеры у МСК-КМ и МСК-ЖТ и обнаружили сходную экспрессию CD29, CD44, CD71, CD90, CD105 (SH2) и различия в экспрессии CD49d и CD106. МСК-ЖТ, в отличие от МСК-КМ экспрессируют CD49d, однако МСК-КМ экспрессируют CD106, который не может быть обнаружен в МСК-ЖТ [72]. Расхождения информации об экспрессии STRO-1 и CD34 в разных исследованиях могут быть вызваны различиями в методах, применяемых для выделения клеток или в составах используемых сред.

МСК-ПК экспрессируют CD44, CD54, CD105 (SH2) и CD166, но не CD14, CD34, CD45 или CD31 [27]. Kassis и др. обнаружили на выделенных МСК-ПК экспрессию молекул CD90 и CD105 (SH2) и отсутствие CD45 и CD34 [46]. Tondreau и др. при помощи проточной цитометрии проанализировали МСК-КМ и МСК-ПК и выявили наличие на поверхности клеток CD44, CD105 (SH2) и CD73 (SH3) и отсутствие CD14, CD34, CD45 и HLA-II [66].

Таблица 1

Экспрессия молекул на поверхности МСК различного происхождения

	МСК-КМ	МСК-ЖТ	МСК-ПК
Наличие	CD13, CD44, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2), CD166, STRO-1	CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2), CD106, CD146, CD166, HLA-I, STRO-1	CD44, CD54, CD90, CD105 (SH2), CD166
Отсутствие	CD14, CD34, CD45, HLA-II	CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD70a, CD133, CD144, HLA-DR	CD14, CD34, CD45, CD31

1.2.2. МСК, полученные из неонатальных тканей

МСК также получают из неонатальных тканей, таких как плацента, пуповинная кровь, пуповина и амниотическая жидкость. Существенным преимуществом неонатальных тканей является их доступность, что позволяет избежать инвазивных процедур и различных этических проблем. Кроме того, эти ткани содержат большое количество эмбриональных клеток, включающих МСК, эндотелиальные клетки-предшественники и гемопоэтические стволовые клетки (CD34⁺, CD133⁺). В некоторых исследованиях сообщалось о том, что клетки, полученные из неонатальных тканей, обладают более высоким пролиферативным потенциалом и лучшей способностью к дифференцировке, в сравнении с МСК-КМ. Например, МСК, полученные из плаценты человека, имеют более высокую приживаемость и способность к экспансии [23, 26, 47].

1.3. Способность к дифференцировке и пролиферации

1.3.1. Сравнение способности к пролиферации между МСК-ЖТ и МСК пуповины

Способность к пролиферации и физиологическое старение этих клеток анализировалась многими учеными последние несколько лет. Baksh и др., сравнивая периваскулярные клетки пуповины с МСК-КМ обнаружили, что первые имеют более высокий пролиферативный потенциал [22]. Lu и др. провели исследования, доказывающие более медленный рост популяции МСК-КМ. Среднее время удвоения популяции МСК пуповины в первом пассаже (П1) составляло около 24 часов и оставалось практически неизменным вплоть до П10, а среднее время удвоения популяции МСК-КМ составляло 40 часов и значительно увеличилось после П6 [56]. МСК-ЖТ показали большую пролиферативную способность в сравнении с МСК-КМ [53]. Peng и др. в своей работе описывали, что время удвоения популяции МСК-ЖТ составляет

45,2 часа, в то время как у МСК-КМ оно составляло 61,2 часа. Кроме того, было обнаружено, что МСК-КМ морфологически крупнее, чем МСК-ЖТ [61]. Следует отметить, что существуют работы, в которых сообщалось о различиях во времени удвоения популяции МСК-ЖТ, выделенных из различных областей тела [65,66]. Van Harmelen и др. в своей работе отметил, что скорость пролиферации МСК-ЖТ, выделенной из подкожно-жировой клетчатки выше (время удвоения популяции 4 ± 1 день), чем у МСК-ЖТ выделенные из сальника (5 ± 1 день) [69]. Условия культивирования и различные добавки в среду также могут влиять на время пролиферации МСК-ЖТ. Эксперименты Ralf Nass и др. показали более короткое время удвоения популяции для МСК-ЖТ, культивируемых в сыворотке человека, вместо фетальной сыворотки теленка. Помимо более высокой пролиферативной активности, МСК пуповины не проявляли признаков старения в течение нескольких пассажей [55,73]. Consoni и др. культивировали МСК пуповины в течение 16 серийных пассажей и не обнаружили изменений в морфологии или каких-либо признаков физиологического старения клеток [31]. Kern и др. сравнивали коэффициент старения между МСК-ЖТ и МСК-КМ. Первые не проявляли признаков старения до 8 пассажа, тогда как вторые проявили их уже в 7 пассаже [53].

1.3.2. Способность к дифференцировке и пластичность МСК-ЖТ и МСК пуповины

Дифференцировка МСК-ЖТ и МСК пуповины по адипогенным, хондрогенным и остеогенным линиям исследовалась многими группами ученых. Кроме того, сообщалось о дифференцировке *in vitro* в кардиомиоциты [59, 72], эндотелиальные клетки [28, 38] и нейральные клетки [40, 41].

1.3.3. Адипогенная дифференцировка

Определяется появлением клеток, содержащих внутриклеточные липидные капли. Как МСК-ЖТ, так и МСК пуповины были успешно дифференцированы в адипоциты [50, 57]. Для преадипоцитарной дифференцировки МСК-ЖТ важна высокая клеточная плотность с последующей остановкой роста на границе G0/G1 [58, 60]. Кроме того, было показано, что FGF2 (фактор роста фибробластов), тиазолидиндионы, такие как троглитазон, пиоглитазон, росиглитазон и 17- β эстрадиол индуцируют адипогенную дифференцировку МСК-ЖТ [44, 51]. Ну и др. успешно дифференцировали МСК пуповины в адипоциты путем добавления в среду дексаметазона и инсулина [45]. Для проверки адипогенной дифференцировки обычно применяют окрашивание масляным красным.

1.3.4. Хондрогенная дифференцировка

О хондрогенной дифференцировке МСК свидетельствует образование блестящих клеточных сфер в клеточной массе, экспрессирующих COL2A1 (коллаген II типа). Хондрогенная дифференцировка МСК-ЖТ и МСК пуповины была описана многими группами ученых, использовавшими различные добавки в среду, такие как трансформирующий ростовой фактор бета 1, аскорбат-2-фосфат и дексаметазон [21, 45]. Feng и др. описывали, что добавление фактора роста и дифференцировки GDF5 [37] и стимуляция с помощью FGF-2 или BMP-6 (костный морфогенетический белок) [29, 35] также способствует хондрогенной дифференцировке. Индикатором успешной дифференцировки в хондроциты служит либо наличие гликозаминогликана (GAG) – компонента внеклеточного матрикса, который обнаруживается с помощью иммуногистологического окрашивания COL2A1 или агрекана, либо с помощью ПЦР проверки экспрессии типичных генов хондрогенной линии.

1.3.5. Остеогенная дифференцировка

При культивировании МСК в остеогенной среде, клетки экспрессируют те же маркеры, что экспрессируются остеобластами. Остеогенную дифференцировку *in vitro* делят на 3 этапа [46]. Первый, 1–4 дни, продолжается до момента пика числа клеток. Затем следует второй этап – ранняя дифференцировка клеток, которая продолжается с 5 по 14 дни. Вторым этапом характеризуется транскрипцией и экспрессией белка щелочной фосфатазы (ALP) [20]. По достижении пика щелочной фосфатазы ее уровень начинает снижаться. На ранней стадии также была обнаружена экспрессия коллагена 1 типа. Третий этап, 14–28 дни, характеризуется высокой экспрессией остеокальцина и остеопонтинина с последующим отложением солей кальция и фосфатов [43, 46].

Остеогенная дифференцировка МСК *in vitro* индуцируется присутствием дексаметазона, аскорбиновой кислоты и β -глицеролфосфата [48]. Известно, что дексаметазон в концентрации 10нМ усиливает транскрипцию генов, ответственных за проявление клеткой «остеогенного фенотипа». Глицерофосфат, гидролизуемый щелочной фосфатазой, служит основным компонентом источника фосфата, необходимого для минерализации матрикса. Аскорбиновая кислота играет важную роль в аккумуляции кальция и синтезе компонентов внеклеточного матрикса [5]. В то время как важность каждого из компонентов, добавляемых в среду, становится все более очевидной [71], биохимия процесса остеогенной дифференцировки *in vivo* пока изучена недостаточно.

1.4. Влияние физико-химических характеристик различных субстратов на дифференцировку клеток

Для успешного применения стволовых клеток в тканевой инженерии и медицине необходимо использование специальных материалов для культивирования и адресной доставки клеток. Материалы должны обладать комплексом свойств, обеспечивающих биосовместимость матрицы. Среди этих

свойств отсутствие цитотоксичности *in vitro* и *in vivo*, минимизация возможных провоспалительных свойств в ткани. Матрица должна поддерживать адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, для чего предусматривается возможность моделирования геометрии поверхности.

Использование матриц повышает выживаемость клеток и ограничивает их миграцию в трансплантате, способствует более активной пролиферации, синтезу межклеточного вещества и сигнальных молекул, что обеспечивает прорастание матрицы соединительной тканью и капиллярами. Эти обстоятельства обеспечивают высокую эффективность их применения не только в реконструктивной и восстановительной хирургии [30, 33], но и в других отраслях медицины.

Для создания скаффолдов используют природные и синтетические полимеры (альгиновые кислоты, хитин, гиалуроновая кислота, целлюлоза и др.), на основе которых получают гидрогели, формирующие инъекционные средства для адресной доставки клеток.

Одним из наиболее перспективных материалов, соответствующий описанным выше свойствам, является хитозан. Отдельно стоит рассмотреть хитозан – природный полисахарид, из которого изготавливают пленки, волокна и пористые структуры. Большой интерес к хитозану обусловлен стабильностью его физико-химических свойств, а также удобством переноса тканеинженерной конструкции в организм и при необходимости ее легкое удаление.

Исследования показывают, что промышленные образцы хитозана непригодны для культивирования клеток, в связи с чем их необходимо очищать от примесей белковых, липидных и минеральных пород. Очищенный хитозан не проявляет цитотоксичных свойств [4].

Согласно литературным данным, чем выше степень деацетилирования хитозана, тем большее число клеток способно прикрепиться к матрице, однако высокая степень деацетилирования неблагоприятно влияет на их пролиферацию [4, 29]. Также указано, что большое значение для адгезии клеток имеет пористость матрицы и геометрия ее поверхности.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Организация эксперимента

Экспериментальные исследования выполнены на базе лаборатории «Клеточные и вспомогательные репродуктивные технологии» НИУ «БелГУ». В экспериментальной части работы использовали мезенхимные стволовые клетки человека, предоставленные ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иосафа».

2.2. Методика изготовления волокон

Для получения волокон на основе хитозана использовался метод мокрого прядения. Подготовили уксусную кислоту с рН 2.8–3.0 и добавляли воду до достижения концентрации кислоты 1%. Необходимое количество уксусной кислоты налили в чистую стеклянную бутылку. Далее, в количестве 20 мг/мл, в бутылку добавили хитозан с низкой массой. Полученный раствор перемешивали на магнитной мешалке (Biosan) в течение часа. После перемешивания шприц (1 мл) заполнили раствором хитозана и постепенно выдавливали его через иглу для выдавливания волокон (30G) в емкость, заполненную коагулирующим раствором (этанол при концентрации 95%).

Для получения волокон на основе хитозана с наночастицами также использовался метод мокрого прядения. Уксусную кислоту в концентрации 1% налили в чистую стеклянную бутылку. Далее взвесили наночастицы – нанопорошок оксида железа (III) с размером частиц 50–100 нм. Концентрация наночастиц составила 10 мг/мл. Наночастицы добавили к кислоте и обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне (Elma – Hans Schmidbauer GmbH & Co, Singen, Germany) в течение 10 мин. Затем к раствору добавили хитозан в количестве 20 мг/мл и перемешивали на магнитной мешалке в течение часа. После перемешивания шприц (1 мл) заполнили раствором хитозана и постепенно выдавливали его через иглу для выдавливания волокон (30G) в ем-

кость, заполненную коагулирующим раствором (этанол при концентрации 95%).

2.3. Подготовка стекол

Для культивирования клеток использовались покровные стекла (Menzel Gläser, Thermo Scientific, 18 мм). Перед культивированием клеток стекла подвергались последовательной очистке. Стекла помещались в стакан с бидистиллированной водой и обрабатывались ультразвуком в ультразвуковой ванне (Elma – Hans Schmidbauer GmbH & Co, Шенген, Германия) в течение 15 минут. Далее стекла переносили в стакан с ацетоном и снова обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут. Затем покровные стекла помещались в стакан, наполненный абсолютным этиловым спиртом и выдерживались в нем в течение 20 минут. После последовательной очистки стекла помещались в пластиковую посуду и выдерживались под ультрафиолетом в течение одного часа. Непосредственно перед культивированием стекла промывались натрий-фосфатным буфером.

2.4. Подготовка чашек

Стекла с хитозановыми покрытиями и без покрытий инкубировали в этаноле при концентрации 95% в течение 30 минут. По окончании инкубации стекла подвергали воздействию ультрафиолета под ламинарным шкафом в течение часа. Затем, стерильным пинцетом стекла перенесли в стерильные чашки Петри (nunc, 3.5 см) и промыли средой ДМЕМ (полная, PanEco, Россия, Москва)

2.5. Подготовка клеток

Мезенхимные стволовые клетки человека, полученные из жировой ткани после размораживания и введения в культуру, культивировали в условиях CO₂ инкубатора (6% CO₂, 37°C, влажность 95%). Для исследования был взят второй пассаж. С помощью счетчика клеток (Scepter 2.0, EMD Milipore, Дармштадт, Германия) дважды определили число клеток, во флаконе 25 см² и при 70–80% конfluenceности оно составило $1.791 \cdot 10^5$ и $1.410 \cdot 10^5$. Далее, с целью получения общего числа клеток около 480 000, клетки снимали с трех флаконов. В каждую чашку Петри помещали 30 000 клеток в 1 мл питательной среды ДМЕМ (полная, PanEco, Россия, Москва) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (biosera), 1% стрептомицина и пенициллина (PanEco, Россия, Москва). После непродолжительного периода культивирования клеток на субстратах в каждую чашку добавили по 2 мл среды ДМЕМ (полной). Клетки культивировали в стандартных условиях CO₂ инкубатора при концентрации CO₂ 5%, температуре 37°C, влажности 95%.

2.6. Окрашивание клеток

Для определения активности клеток применяли витальное окрашивание митохондрий флуоресцентным красителем MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, Molecular Probes, США). Данный показатель является наиболее эффективным в отношении определения активности клеток, т.к. краситель связывается только с митохондриями с высоким мембранным потенциалом, т.е. с функционально активными митохондриями. При нарушении структуры митохондрий или снижения их функциональной активности флуоресценция исчезает.

Для приготовления стокового раствора MitoTracker Red CMXRos (1 мМ) пробирку с красителем перед открытием подогрели до комнатной температуры. Подготовили 1 мМ стокового раствора в безводном ДМСО

(диметилсульфоксид) (Sigma-Aldrich). 94,1 мкл ДМСО добавили в пробирку к 50 мкг MitoTracker Red CMXRos и ресуспендировали. При приготовлении раствор необходимо защищать от воздействия света. После приготовления раствор поместили в морозильную камеру при температуре -25°C .

Для приготовления рабочего раствора (200 нМ) растворили стоковый раствор в ДМЕМ с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и 1% антибиотика (пенициллин и стрептомицин) в центрифужной пробирке. Пробирку обернули алюминиевой фольгой для защиты от воздействия света. Затем раствор подогрели до 37°C .

Перед окрашиванием клеток с помощью дозатора удалили из чашек Петри среду, затем добавили подогретый рабочий раствор. Далее клетки поместили в CO_2 инкубатор и инкубировали в течение 15 минут при 5% CO_2 , температуре 37°C и влажности 95%. По окончании инкубации окрашивающий раствор удалили из чашек Петри и добавили свежую среду ДМЕМ с 10% фетальной телячьей сыворотки и 1% антибиотика (пенициллин и стрептомицин).

Микроскопирование проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (Nikon, Япония).

Для фиксирования клеток среду из чашек Петри удалили и промыли клетки 1 мл 0,01 М натрий-фосфатным буфером (PBS). Затем буферный раствор удалили, добавили в чашки Петри по 2 мл 10% раствора формалина и фиксировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Раствор формалина готовили путем растворения 4 мл 100% раствора формалина в 36 мл ультрачистой воды. По окончании времени фиксации раствор формалина удалили из чашек и промыли буферным раствором PBS, по 1 мл в каждую чашку. Далее раствор заменили свежим PBS, по 2 мл в каждую чашку и вернули чашки в фольгу. Хранили в холодильнике при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

2.2. Методы статистической обработки экспериментальных данных

Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием программного обеспечения IBM SPSS и электронных таблиц MS Excel. Рассчитывали средние арифметические, стандартное отклонение. Данные представлены в виде среднеарифметических величин с их стандартными ошибками. Проверку гипотезы о нормальности распределения данных проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. В связи с тем, что гипотеза о нормальном распределении не была подтверждена, для определения достоверности различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Глава 3. Результаты исследования

3.1. Характеристики хитозановых волокон

Были получены изображения структуры волокон, расположенного на стеклянной поверхности. Изображения получены с помощью стереомикроскопа (Leica, Германия) (рис. ,) и светового инвертированного микроскопа (рис.) (Nikon, Япония).

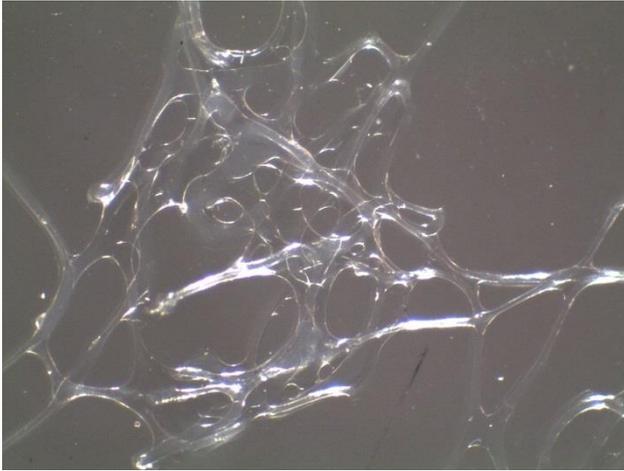


Рис. Хитозановые волокна без наночастиц.
Стереомикроскоп



Рис. Хитозановые волокна с наночастицами
оксида железа (III). Стереомикроскоп

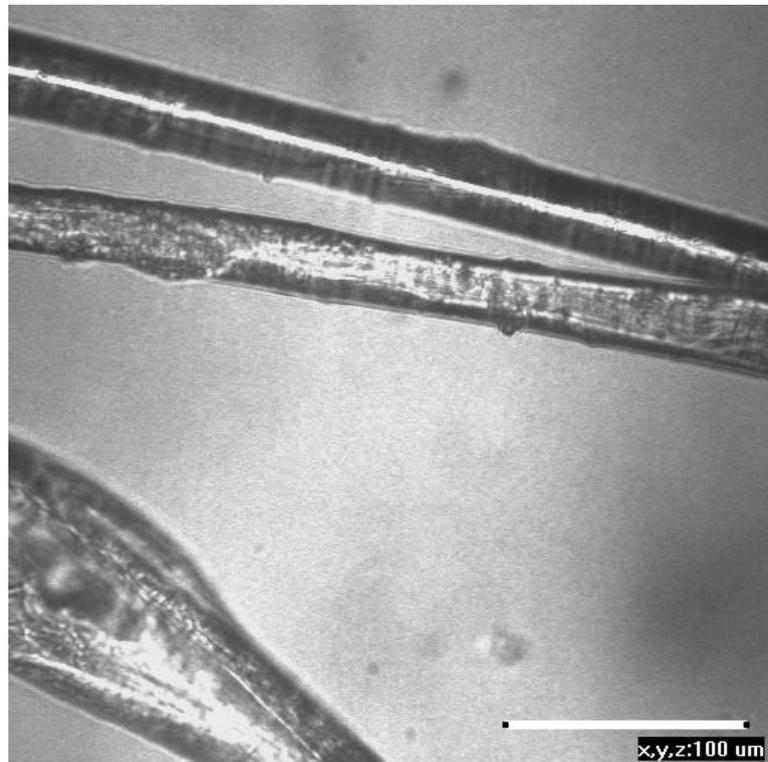


Рис. . Структура хитозанового волокна, световая инвертированная
микроскопия.

Для определения шероховатости поверхности хитозанового волокна использовались методы атомно-силовой микроскопии (рис.). С помощью программного обеспечения Nova была рассчитана средняя шероховатость поверхности. На отдельно взятых участках, размерами $2,328 \times 1,376$ мкм, шероховатость составила $24,88 \pm 3,37$ нм.

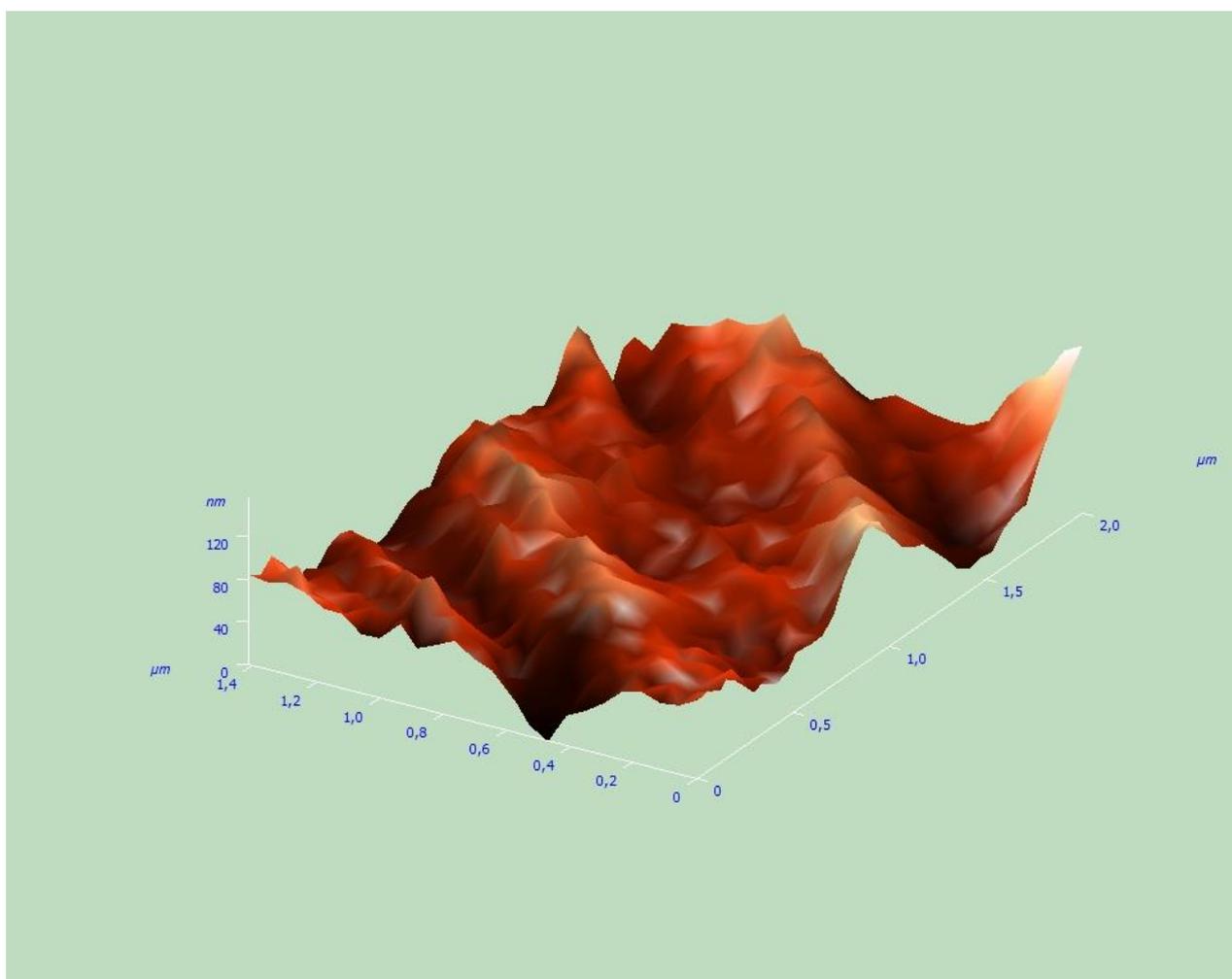


Рис. . Поверхность хитозанового волокна, атомно-силовая микроскопия

3.2. Изменение активности митохондрий мезенхимных стволовых клеток в условиях культивирования на поверхностях, характеризующихся различными свойствами

В результате проведенных исследований, наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции при культивировании клеток как на хитозано-

вых волокнах без наночастиц, так и с наночастицами, в сравнении со стеклянной поверхностью.

Таблица

Интенсивность флуоресценции

Поверхность	Показатель интенсивности флуоресценции, у.е.
Хитозановые волокна с наночастицами	1285,474 ± 37,683 ⁺
Хитозановые волокна без наночастиц	1449,048 ± 52,338*
Стекло	1212,136 ± 61,828

*Примечание: * - различия достоверны по сравнению со значениями, зарегистрированными на клетках, культивируемых на стеклянных поверхностях (по U критерию Манна-Уитни, при $p < 0,05$);*

⁺ - различия достоверны по сравнению со значениями, зарегистрированными на клетках, культивируемых хитозановых волокнах без наночастиц (по U критерию Манна-Уитни, при $p < 0,05$)

Согласно данным таблицы, активность митохондрий в клетках, культивируемых на хитозановых поверхностях с наночастицами выше, о чем свидетельствует повышение интенсивности флуоресценции, на 6,02%. Интенсивность флуоресценции клеток, культивируемых на хитозановых поверхностях без наночастиц выше, чем на стеклянных поверхностях на 19,5% ($p < 0,05$).

Ниже представлены фотографии, сделанные во время наблюдений с помощью программного обеспечения EZ-C1 viewer v.3.90 (Nikon, Япония).

На рис. видно, что клетки интенсивно флуоресцируют на хитозановых волокнах с наночастицами. Клетки вытянуты вдоль поверхностей и хорошо на них закреплены.

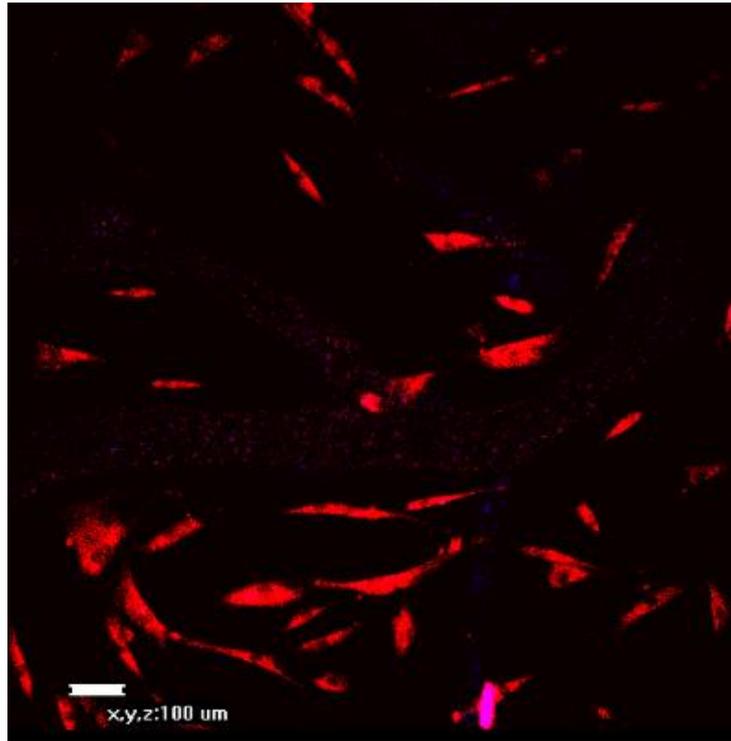


Рис. . Клетки, культивируемые на хитозановых волокнах с наночастицами

На клетках, культивируемых на хитозановых волокнах без наночастиц (рис.) интенсивность флуоресценции выражена сильнее, чем на волокнах с наночастицами, однако площадь контакта несколько ниже.

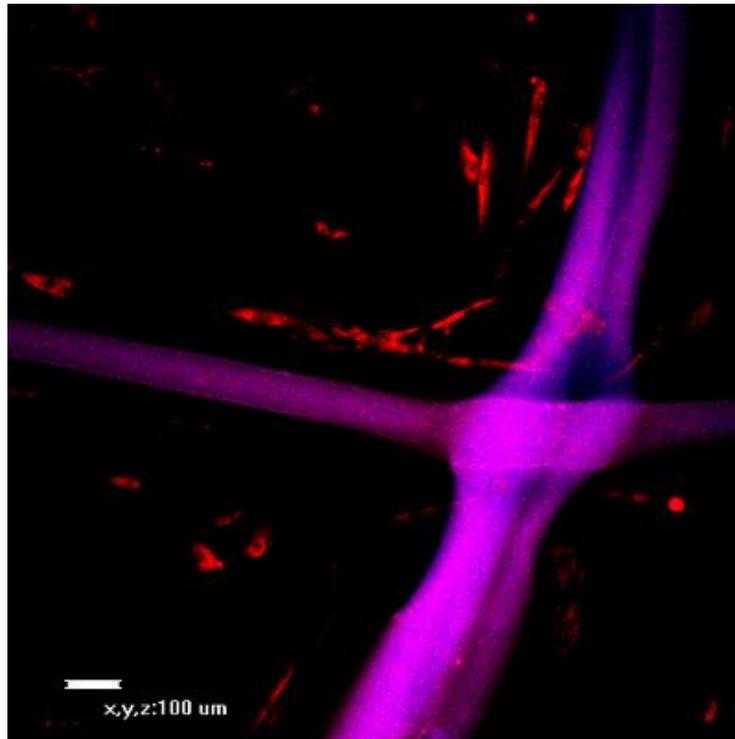


Рис. . Клетки, культивируемые на хитозановых волокнах без наночастиц

Наименьшей интенсивностью флуоресценции и площадью контакта с поверхностью обладали клетки, культивированные на стеклянной поверхности без использования волокон (рис.)

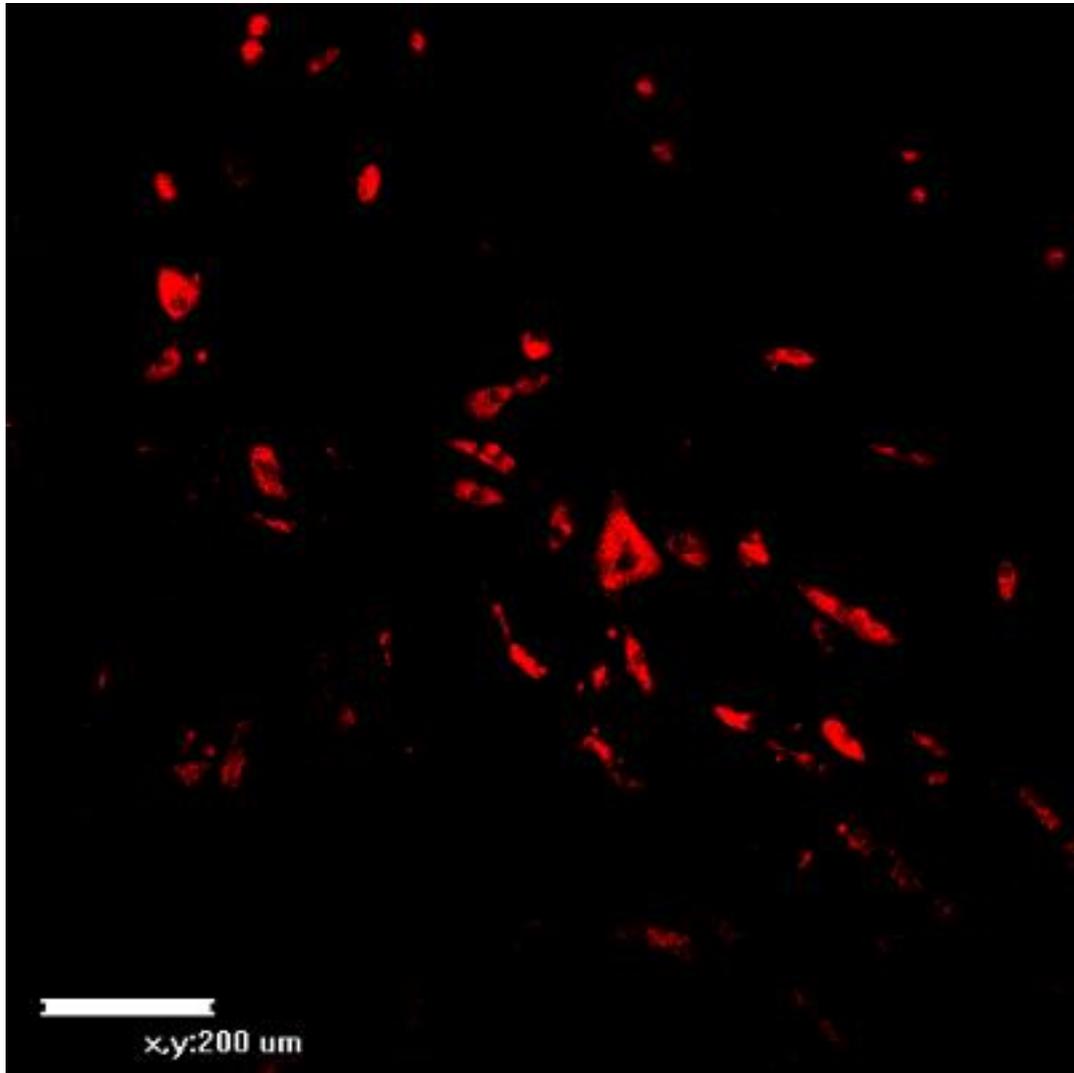


Рис. . Клетки, культивируемые на стеклянной поверхности

3.3. Изменение площади контакта клеток с поверхностью в условиях культивирования на различных субстратах

Подсчет площади контакта клетки с поверхностью производился с помощью встроенного программного обеспечения EZ-C1 viewer v.3.90 (Nikon, Япония).

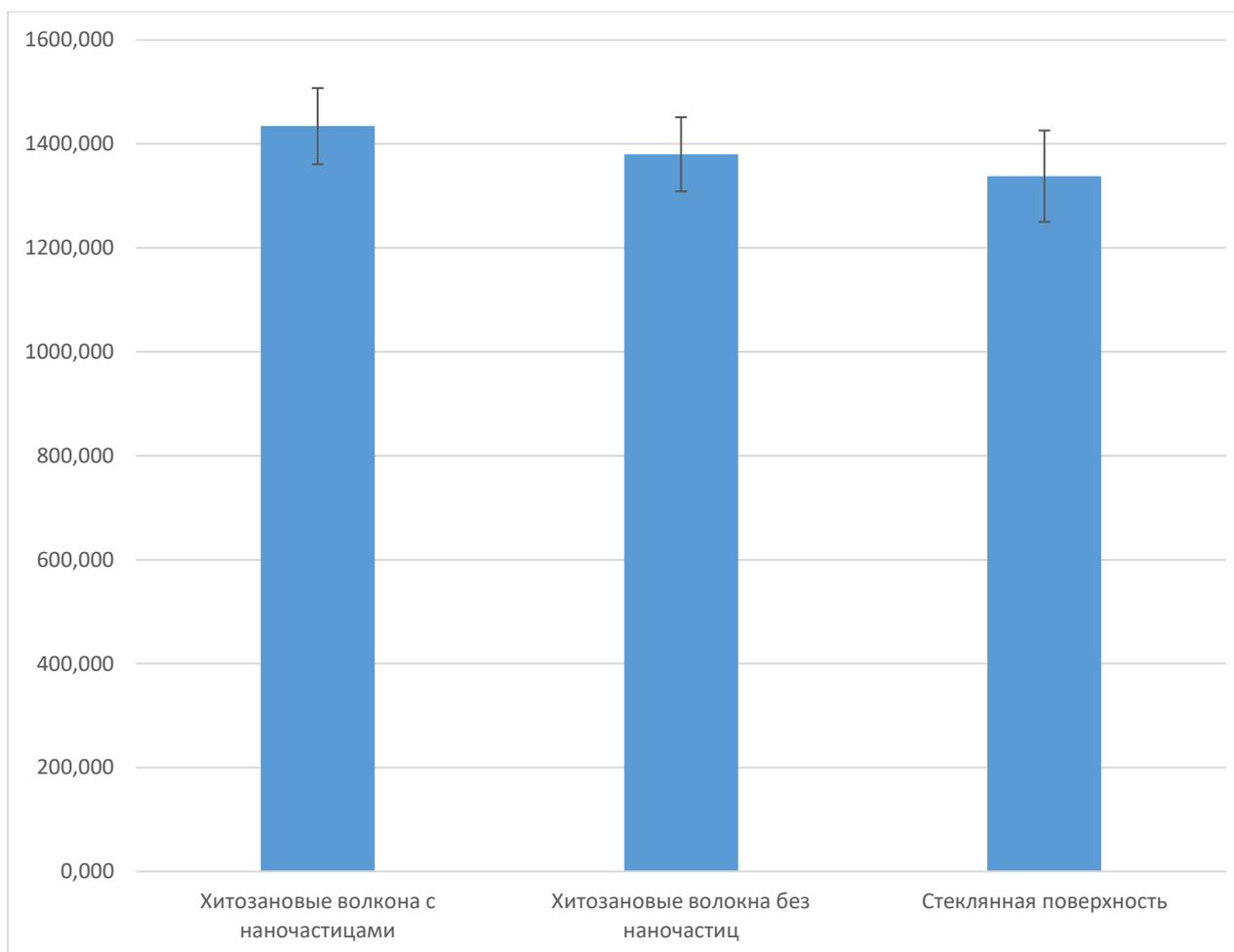


Рис. . Площадь контакта клеток с поверхностями, мкм²

Согласно полученным данным, площадь контакта клеток с хитозановыми поверхностями без с наночастицами выше, чем у стеклянной поверхности на 7,2%. Площадь контакта клеток с поверхностями без наночастиц выше, чем у клеток, культивируемых на стеклянных поверхностях на 3,15% (рис.).

Выводы

1. определена оптимальная методика изготовления волокон для культивирования мезенхимных стволовых клеток;

2. изучена площадь контакта клеток с поверхностью при культивировании их на различных субстратах; в случае культивирования на поверхностях с хитозановыми волокнами с наночастицами $1434,28 \pm 73,27$ мкм², на поверхностях, с хитозановыми волокнами без наночастиц $1380,10 \pm 71,377$. Площадь контакта клеток со стеклянными поверхностями составила $1337,91 \pm 87,970$.

3. исследовано изменение активности митохондрий мезенхимных стволовых клеток в условиях культивирования на поверхностях, характеризующихся различными свойствами. Интенсивность флуоресценции клеток, культивируемых на хитозановых волокнах

Список использованных источников

1. Вермель А. Е. Стволовые клетки: общая характеристика и перспективы применения в клинической практике // Клиническая медицина. 2004. № 1. С. 5–11.
2. Гусева Д. С. Генетические модифицированные мононуклеары пуповинной крови — стимуляторы нейрорегенерации при регенеративных заболеваниях ЦНС // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 106–112.
3. Дорошенко О. Мультипотентные «взрослые» прогениторные клетки костного мозга (МАРС) восстанавливают гемопоэз // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. Т. 2, №2. С. 10.
4. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., Цыган В.Н. Препараты на основе хитина и хитозана в медицине и рациональном питании // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3., № 2. С. 316–317.
5. Зорин В. Л., Зорина А. И., Еремин И. И. и др. Сравнительный анализ остеогенного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток слизистой оболочки полости рта и костного мозга // Гены & клетки. 2014. Т. 9, № 1. С. 50–57.
6. Квачева З. Б. Клеточные технологии в комбустиологии: успехи, проблемы и перспективы // Военная медицина. 2008. № 3. С. 52–59.
7. Коржевский Д. Э. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5, № 3. С. 57–63.
8. Кривенко С. И. и др. Трансплантация МСК из жировой ткани: получение, стандартизация и использование // Актуальные вопросы гематологии. № 20. С. 52–55.
9. Куртова А. В., Зуева Е. Е., Немков А. С. Постинфарктная клеточная регенерационная терапия сердечной мышцы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006. № 2 (4). С. 35–43.

10. Лищук В. А., Мосткова Е. В. Стволовые клетки: исследования и практика // Валеология. 2003. № 2. С. 4–16.
11. Мезен Н. И., Квачева З. Б., Сычик Л. М. Стволовые клетки. Минск: БГМУ. 2014. 66 с.
12. Максимов А. А. Лимфоцит как общая стволовая клетка различных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих // Клеточная терапия и трансплантация. 2009. Т. 1, № 3. С. 19–24.
13. Никольский Н. Н., Габай И. А., Сомова Н. В. Эмбриональные стволовые клетки человека, проблемы и перспективы // Цитология. 2007. Т. 49, № 7. С. 529–537.
14. Полтавцева Р. А. и др. Стволовые клетки как общебиологическая проблема // Онтогенез. 2003. Т. 34, № 3. С. 204–210.
15. Семенов М. Г., Степанова Ю. В., Трощиева Д. О. Перспективы применения стволовых клеток в реконструктивно-восстановительной хирургии челюстно-лицевой области // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. 2016. Т. 4, № 4. С. 84–92.
16. Серебровская Т. В., Никольский И. С., Ищук В. А., Никольская В. В. Адаптация человека к периодической гипоксии: влияние на гемопоэтические стволовые клетки и иммунную систему // Вестник международной академии наук (русская секция) 2010. С. 12–18.
17. Худяков А. А. Сравнение эффективности методов получения функционально активных кардиомиоцитов человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 47–55.
18. Хулуп Г. Я., Мастицкая С. Ю. Пластичность стволовых красного костного мозга и их применение в регенеративной медицине // Медицина. 2006. № 1. С. 6–9.
19. Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, Zummo G, Farina F, La Rocca G. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity // Stem Cells. 2010. № 19. P. 423–438.

20. Ashwin M. Nair, Yi-Ting Tsai, Krishna M. Shah, Jinhui Shen, Hong Weng, Jun Zhou, Xiankai Sun, Ramesh Saxena, Joseph Borrelli Jr. d, Liping Tang. The effect of erythropoietin on autologous stem cell-mediated bone regeneration // *Biomaterials*. 2013. № 30. P. 7364–7371.
21. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function // *Endocr Metab Disord*. 2001. № 2. P. 81–94.
22. Awad H. A., Halvorsen Y. D., Gimble J. M., Guilak F. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells // *Tissue Eng*. 2003. № 9. P. 1301–1312.
23. Baksh D., Song L., Tuan R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy // *J Cell Mol Med*. 2004. № 8. P. 301–316.
24. Barlow S., Brooke G., Chatterjee K., Price G., Pelekanos R., Rossetti T., Doody M., Venter D., Pain S., Gilshenan K., Atkinson K. Comparison of human placenta and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. 2008. № 17. P. 1095–1107.
25. Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J, Nadal-Ginard B., Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support // *Cell*. 2003. № 114. P. 736–76.
26. Bonner-Weir S. et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. № 97. P. 7999–8004.
27. Brooke G., Tong H., Levesque J. P., Atkinso K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta // *Stem Cells*. 2008. № 17. P. 929–940.
28. Cao C., Dong Y. Study on culture and in vitro osteogenesis of blood derived human mesenchymal stem cells // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005. № 19. P. 642–647.

29. Chatelet C., Damour O., Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomater.* 2001. № 22. P. 261–268.
30. Chen M. Y., Lie P. C., Li Z. L., Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow derived mesenchymal stem cells // *Exp Hematol.* 2009. № 37. P. 629–640.
31. Cheng A., Saint-Cyr M. Comparison of different ADM materials in breast surgery // *Clin. plast. surg.* 2012. Vol. 39, № 2. P. 167–175.
32. Chiou M., Xu Y., Longaker M. T. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells // *Biochem Biophys Res Commun.* 2006. № 343. P. 644–652.
33. Conconi M. T., Burra P., Di Liddo R., et al. CD105 (SH2) (+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential // *Int J Mol Med.* 2006. № 18. P. 1089–1096.
34. De Ugarte D. A., Alfonso Z., Zuk P. A., Elbarbary A., Zhu M., Ashjian P., Benhaim P., Hedrick M. H., Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow // *Immunol Lett.* 2003. № 89. P. 267–270.
35. DiDomenico L., Emch K., Landsman A. Prospective comparison of diabetic foot ulcers treated with either cryopreserved skin allograft or bioengineered skin substitute // *Wounds.* 2011. Vol. 23, № 7. P. 184–189.
36. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* 2006. № 8. P. 315–317.
37. Estes B. T., Wu A. W., Storms R. W., Guilak. Extended passaging, but not aldehyde dehydrogenase activity, increases the chondrogenic potential of human adipose-derived adult stem cells // *J Cell Physiol.* 2006. № 209. P. 987–995.

38. Feng G., Wan Y., Balian G., Laurencin C. T, Li X. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells // *Growth Factors*. 2008. № 26. P. 132–142.
39. Fraser J. K., Schreiber R., Strem B., et al. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006. №.3. P. 33–37.
40. Fraser J. K., Wulur I., Alfonso Z., Hedrick M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology // *Trends Biotechnol*. 2006. № 24. P. 150–154.
41. Fu Y. S, Cheng Y. C., Lin M. Y., Cheng H., et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton’s jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism // *Stem Cells*. 2006. № 24. P. 115–124.
42. Fu Y. S., Shih Y. T., Cheng Y. C. , Min M. Y. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro // *J Biomed Sci*. 2004. № 11. P. 652–660.
43. Griffiths M. J., Bonnet D., Janes S.M. Stem cells of the alveolar epithelium. // *Lancet*. 2005. № 366. P. 249–260.
44. Hoemann C. D., El-Gabalawy H., McKee M. D. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization // *Pathol Biol*. 2009. № 57. P. 318–323.
45. Hong L., Colpan A., Peptan I. A., Daw J., George A, Evans C. A. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose derived stromal cells // *Tissue Eng*. 2007. № 13. P. 1197–1203.
46. Hou T., Xu J., Wu X., Xie Z., Luo F., Zhang Z., Zeng L. Umbilical Cord Wharton’s Jelly: A New Potential Cell Source of Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering // *Tissue Eng Part A*. 2009. № 15. P. 2325–34.
47. Huang Z., Nelson E. R., Smith R. L., Goodman S. B. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts in vitro // *Tissue Eng*. 2007. № 13. P. 2311–2320.

48. In 't Anker P. S., Scherjon S. A., Kleijburg-van der Keur C., de Groot-Swings G. M., Claas F. H., Fibbe W. E., Kanhai H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta // *Stem Cells*. 2004. № 22. P. 1338–1345.

49. Jaiswal N., Haynesworth S. E., Caplan A. I., Bruder S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro // *J. Cell Biochem*. 1997. № 64. P. 295–312.

50. Johe K. K. et al. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system // *Genes Dev*. 1996. № 10. P. 3129–3140.

51. Jörn W., Kuhbier B. W., Radtke Christine, Peter M., Vogt, Kasper Cornelia, Reimers Kerstin. Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells // *Adv Biochem Engin/Biotechnol*. 2010. № 123. P. 55–105.

52. Kakudo N., Shimotsuma A., Kusumoto K. Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells // *Biochem Biophys Res Commun*. 2007. № 359. P. 239–244.

53. Kassis I., Zangi L., Rivkin R., Levdansky L., Samuel S., Marx G, Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads // *Bone Marrow Transplant*. 2006. № 37. P. 967–976.

54. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue // *Stem Cells*. 2006. № 24. P. 1294–1301.

55. Kitagawa Y. K. M., Toriyama K., Kamei Y., Torii S. History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical applications // *Jpn J Plast Reconstr Surg* 2006. № 49. P. 1097–1104.

56. La Rocca G., Anzalone R., Corrao S., et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord ma-

trix: differentiation potential and detection of new markers // *Histochem Cell Biol.* 2009. № 131. P. 267–282.

57. Lu L. L., Liu Y. J., Yang S. G., Zhao Q. J., Wang X., Gong W., Han Z. B., Xu Z. S, Lu Y. X., Liu D., Chen Z. Z., Han Z. C. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials // *Haematologica.* 2006. № 91. P. 1017–1026.

58. Lu LL, Song YP, Wei XD, et al. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord tissue and bone marrow // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2008. № 16. P. 140–146.

59. McBeath R., Pirone D. M., Nelson C. M., Bhadriraju K., Chen C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Cell.* 2004. № 6. P. 483–495.

60. Ohnishi S., Ohgushi H., Kitamura S., Nagaya N. Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure // *Int J Hematol.* 2007. № 86. P. 17–21.

61. Pairault J., Green H. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979. № 76. P. 5138–5142.

62. Peng L., Jia Z., Yin X., et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue // *Stem Cells.* 2008. № 17. P. 761–773.

63. Pittenger M. F., Marshal D. R. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. P. 349–374.

64. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* 1999. № 284. P. 143–147.

65. Schaffler A., Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies // *Stem Cells.* 2007. № 25. P. 818–827.

66. Schipper B. M., Marra K. G., Zhang W., Donnenberg A. D., Rubin J. P. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells // *Ann Plast Surg.* 2008. № 60. P. 538–544.
67. Shi Y. Y., Nacamuli R. P., Salim A., Longaker M. T. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging // *Plast Reconstr Surg.* 2005. № 116. P. 1686–1696.
68. Spiegelman B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor // *Diabetes.* 1998. № 47. P. 507–514.
69. Tondreau T., Meuleman N., Delforge A., Dejeneffe M., Leroy R., Massy M., Mortier C., Bron D., Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity // *Stem Cells.* 2005. № 23. P. 1105–1112.
70. Van Harmelen V., Rohrig K., Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects // *Metabolism* 2004. № 53. P. 632–637.
71. Vater C., Kasten P., Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells // *Acta Biomater.* 2011. № 7. P. 463–477.
72. Wan C., He Q., Li G. Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna criticalsized bone defect model // *J Orthop Res* 2006. № 24. P. 610–618.
73. Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Huang C. C., Wei H. M., Guo Y. J., Fu Y. S., Lai M. C., Chen C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord // *Stem Cells.* 2004. № 22. P. 1330–1337.
74. Weiss M. L., Medicetty S., Bledsoe A. R., Rachakatla R. S., Choi M., Merchav S., Luo Y., Rao M. S., Velagaleti G., Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease // *Stem Cells.* 2006. №.24. P. 781–792.

75. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang JJ., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol Biol Cell*. 2002. № 13. P. 4279–4295.

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно.
Все использованные материалы из опубликованной научной литературы и
других источников имеют ссылки на них.

« ____ » _____ г.

(Ф.И.О.)