

что эффект ускорения эпителизации связан только с применением МСК. Таким образом, аутологичные МСК являются эффективным средством ускорения эпителизации диабетической язвы даже при однократном применении. Клеточные технологии являются новым многообещающим подходом к лечению заболевания, для которого не существует эффективных фармакологических методов лечения.

**Мавликеев М.О.¹, Плотников М.В.²,
Максимов А.В.², Муртазин А.И.³,
Гафиятуллина Г.Р.¹, Титова А.А.¹,
Абызова М.С.³, Сахапов Д.И.¹,
Гумерова А.А.¹, Деев Р.В.⁴, Киясов А.П.¹**

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет

² ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Республики Татарстан

³ Казанский государственный медицинский университет

⁴ ПАО «Институт стволовых клеток человека»
mmavlikeev@gmail.com

ПОИСК МОРФОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ ОБЛИТЕРИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) занимают второе место по распространённости в мире среди сердечно-сосудистых заболеваний. Рядом масштабных исследований продемонстрирован положительный потенциал применения клеточных и генных препаратов, стимулирующих неоангиогенез. Однако на данный момент отсутствуют объективные морфологические критерии оценки эффективности результатов терапевтического ангиогенеза. Цель исследования – выявление патоморфологических показателей, способных служить объективными показателями для оценки результатов генно-клеточной терапии ХОЗАНК различного генеза. В качестве материала были использованы биоптаты икроножной мышцы 45 пациентов с хронической ишемией нижних конечностей IIБ степени (по А.В. Покровскому) с различными нозологиями (дистальный атеросклероз, многоэтажный атеросклероз, многоэтажный атеросклероз в сочетании с синдромом Лериша, многоэтажный атеросклероз в сочетании с синдромом Такаюсу, дистальный атеросклероз в сочетании с болезнью Бюргера) возрастом 41–73 лет и длительностью заболевания более 2 лет без сопутствующего сахарного диабета. Контрольные три биоптата были взяты у здоровых лиц. Парафиновые срезы биоптатов окрашивали гематоксилином и эозином, по Массону, иммуногистохимически с антителами к CD34. На окрашенных срезах производили оценку капиллярной плотности (КП), доли мышечных трубочек (ДМТ), относительной площади соединительной ткани. Производился анализ динамики морфологических показателей в зависимости от нозологии, возраста и длительности заболевания. Морфометрический анализ выявил отсутствие статистически значимых различий КП между различными нозологиями, при этом соотношение «количество капилляров/количество мышечных волокон» при ХОЗАНК было достоверно ниже ($1,93 \pm 0,48$ против $2,91 \pm 0,84$ в норме, $p < 0,05$) и имело тенденцию к снижению с возрастом и неболь-

шому повышению при присоединении воспалительного компонента – при сочетании синдрома Такаюсу и атеросклероза выявлена сильная положительная корреляция ($r = 0,894427$, $p < 0,05$) между возрастом и КП, что может объясняться ангиогенным влиянием провоспалительных цитокинов. Установлено, что при атеросклеротическом поражении степень фиброза значимо не меняется по мере прогрессирования заболевания, при этом неуклонно возрастает при сочетании с синдромом Такаюсу и болезнью Бюргера. При этом относительная площадь соединительной ткани при ХОЗАНК выше, чем в норме ($3,38 \pm 1,91\%$ против $0,79 \pm 0,89\%$, $p < 0,05$). Нам не удалось выявить какой-либо тенденции динамики ДМТ в зависимости от анализируемых показателей, однако их доля была статистически значимо выше, чем в норме ($5,14 \pm 5,11\%$ против $0,79 \pm 1,06\%$, $p < 0,05$). ДМТ отражает регенераторный ответ мышечных волокон и должно учитываться индивидуально для каждого пациента, которому назначается ангиогенный препарат. Таким образом, при морфологической оценке результатов терапевтического ангиогенеза следует ориентироваться на динамику КП и фиброза, исключая случаи с сочетанными аутоиммунными поражениями.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (14-15-00916) и при поддержке программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидий, выделенных Казанским федеральным университетом по государственному заданию*

**Макаров А.В.¹, Аполихина И.А.¹,
Саидова А.С.¹, Попов В.К.²,
Фатхудинов Т.Х.¹**

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии, перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России

² Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН
anvitmak@yandex.ru

ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СТРЕССОВОГО НЕДЕРЖАНИЯ

Поиск новых методов лечения урогинекологических заболеваний является высоко актуальной задачей. Изучение изменений, возникающих при трансплантации тканеинженерных конструкций, как одного из методов коррекции патологии малого таза, является необходимым условием в комплексе доклинических исследований. Целью настоящего исследования является разработка инъекционной тканеинженерной конструкции (ТИК) для регенеративной терапии ряда гинекологических заболеваний, сопровождающихся несостоятельностью мышечных и соединительных тканей малого таза. Для этого предлагается использовать синтетические биорезорбируемые полимерные носители как в качестве объемобразующего агента, так и в качестве матричной конструкции, содержащей рекомбинантный FGFb и аллогенные МСК, являющиеся активными индукторами ангиогенеза и репаративной регенерации. Разработаны методы формирования плотных с гладкой поверхностью и пористых с развитой поверхностью биорезорбируемых микроносителей размером от 50 до 200 мкм из полимеров гомологического ряда алифатических

полиэфиров. Проведен анализ структуры и морфологии полученных полимерных микроносителей. Получены и охарактеризованы культуры мультипотентных стромальных клеток (МСК) пупочного канатика человека. С помощью полученных клеточных культур изучены цитотоксические (в соответствии с действующим ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009) и адгезивные свойства разработанных микроносителей, а также влияние их на динамику экспансии и фенотипические свойства МСК. В результате выполнения проекта разработана методика получения инъекционной ТИК на основе микрочастиц поликапролактона (ПКЛ), импрегнированных рекомбинантным FGFb, и заселенных МСК. На основании исследований цитотоксичности, адгезивных свойств и скорости резорбции были выбраны микрочастицы из ПКЛ. Проведено исследование биосовместимости образцов на экспериментальной модели подкожной трансплантации, а специфическая активность ТИК была изучена на модели стрессового недержания мочи у крыс. В результате была продемонстрирована высокая эффективность предложенного подхода по сравнению с коммерческим объемобразующим препаратом. Но на основании полученных результатов о повышении коллаген синтетической активности тканей в области трансплантации при использовании разработанной ТИК, есть основания предполагать, что на отдаленных сроках это ограничит миграцию микрочастиц и пролонгирует терапевтические эффекты.

**Макаров М.С., Боровкова Н.В.,
Сторожева М.В., Пономарев И.Н.**

ГБУЗ г. Москвы

*«Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы»
mcsimmc@yandex.ru*

РОСТ-СТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ В СОСТАВЕ КОЛЛАГЕНОВЫХ ПОВЯЗОК

АКТУАЛЬНОСТЬ. Наночастицы серебра способны стабилизировать тромбоциты человека на ранних стадиях адгезии, препятствуя их массовой дегрануляции. Этот эффект может быть использован при создании тромбоцит-насыщенных биотрансплантатов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. В работе использовали тромбоциты, выделенные из цельной крови доноров. После внесения тромбоцитов коллагеновые повязки площадью 4–5 см² экспонировали при 37°C в течение 10 мин. для стимуляции адгезии, затем добавляли наносеребро до конечной концентрации 5 мкМ наносеребра в каждой дозе. В присутствии наночастиц коллагеновые повязки с тромбоцитами экспонировали при 37°C в течение 30 мин., после чего удаляли весь остаточный объем дозы с неадгезировавшими тромбоцитами. Выделение компонентов гранул за пределы стабилизированных тромбоцитов осуществляли с помощью криодеструкции. Рост-стимулирующий эффект исследовали на примере культуры МСК тканевых доноров. Анализ биологической полноценности тромбоцитов и МСК, оценку количества клеток на коллагеновых повязках проводили с помощью оригинальных методов, основанных на витальном окрашивании клеток и их исследовании во флуоресцентном микроскопе.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Общее содержание стабилизированных тромбоцитов с гранулами в опытных коллагеновых повязках варьировало от 30 до 550 млн из

расчета на 100 тыс. клеток МСК. При сравнении общего числа МСК (тыс/см²) в опыте и в контроле (повязки без тромбоцитов) через 3 сут. культивирования установлено, что на повязках, содержащих до 170 млн тромбоцитов с гранулами, наблюдался выраженный рост-стимулирующий эффект. Так, если в контроле среднее число клеток составляло 6,4±0,9 тыс/см², то при 40 млн стабилизированных тромбоцитов с гранулами этот показатель достигал 8,5±0,4 тыс/см², при 80 млн – 12,1±0,6 тыс/см², при 100 млн – 15,3±0,9 тыс/см², при 150 млн – 9,0±0,4 тыс/см². В целом, 30–58 млн стабилизированных тромбоцитов увеличивали индекс пролиферации МСК в 1,75 раза, 60–90 млн – в 2,2 раза, 96–120 млн – в 2,6 раза, 140–170 млн – в 1,2 раза. Таким образом, в диапазоне 30–120 млн стабилизированных тромбоцитов на 100 тыс. МСК наблюдался выраженный дозозависимый эффект стимуляции роста клеток *in vitro*. При 120–170 млн тромбоцитов с гранулами ростовой эффект снижался, а при 180–240 млн индекс пролиферации МСК был уже меньше, чем в контроле. Максимальное подавление роста отмечено в опытах с 500–550 млн стабилизированных тромбоцитов, где число МСК на повязках было в 3–4 раза снижено по сравнению с контролем; в опытных образцах у многих клеток наблюдалось нарушение адгезивной и секреторной активности. При этом на дне чашки Петри (вне повязки) клетки сохраняли нормальную пролиферативную активность и структурную целостность.

ВЫВОДЫ. Концентрация 5 мкМ наносеребра является адекватной для стабилизации тромбоцитов с гранулами на коллагене. 60–120 млн стабилизированных тромбоцитов в расчете на 100 тыс. клеток позволяет в 2 и более раз увеличить пролиферативную активность МСК на коллагеновых матриксах.

**Макашова Е.Е., Зубов П.М., Зубова О.Л.,
Бабийчук Л.А.**

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины
olena.makashova@gmail.com*

РОЛЬ ГЛУТАТИОНА ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

АКТУАЛЬНОСТЬ. При криоконсервировании с ДМСО ядродержащих (ЯСК), в том числе и гемопозитических прогениторных клеток (ГПК) происходит целый комплекс структурно-функциональных изменений, способных инициировать их гибель. Одной из причин этого может быть увеличение уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках. Особенно данные процессы могут усиливаться после переноса клеток в кровеносное русло, что должно учитываться при расчете терапевтической дозы препарата перед введением реципиенту. В связи с этим, оценка сохранности, жизнеспособности и количества клеток с избыточным содержанием АФК после инкубации клеток в условиях моделирующих физиологические, даст возможность более объективно определить состояние ЯСК/ГПК КК после переноса в кровеносное русло реципиента, а добавление к среде замораживания глутатиона может снизить интенсивность образования АФК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. В выделенную полиглобулином фракцию ЯСК вносили ДМСО до конечных кон-