

УДК

В.В. Кумейко^{1,2}, *А.П. Анисимов*², *А.В. Щерблякина*¹, *А.А. Астахова*¹, *Н.Е. Зюмченко*², *Н.П. Токмакова*²,
*И.А. Кирсанова*², *А.А. Анисимова*², *Е.В. Демиденко*¹, *И.В. Дюйзен*¹, *Ю.С. Хотимченко*¹

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),

² Дальневосточный государственный университет (690950 г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

ИНГИБИРОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Ключевые слова: стволовые клетки, внеклеточный матрикс, биополимерные материалы, репродукция и дифференцировка.

Выполнен анализ свойств биополимерных матриксных материалов, являющихся частичными структурно-функциональными аналогами гликополимеров на основе гиалуроновой кислоты. Оригинальные модифицированные полисахаридные композиции оказывали ингибирующее влияние на способность нейральных стволовых клеток к дифференцировке. Для оценки жизнеспособности клеток после культивирования на исследуемых субстратах производили их рекультивирование в условиях индукции адгезии и дифференцировки. Для всех исследованных вариантов гликополимерных матриц установлена способность клеток к дифференцировке и нормальному росту после перевода культур на нейроиндукторный субстрат, включающий димерные формы коллагена IV типа. Один из материалов, включающих модифицированные производные уроновых кислот, рекомендован в качестве перспективного матрикса, подавляющего нежелательную спонтанную дифференцировку нейральных стволовых клеток в процессе получения и сохранения их биомассы для создания искусственных имплантатов нервной ткани.

Изучение стволовых клеток – одно из самых динамично развивающихся направлений в современной биологии и медицине. Стволовые клетки стали объектом исследования молекулярных биологов, генетиков, цитологов, медиков и фармакологов. Благодаря столь пристальному вниманию со стороны разных специалистов получены интересные данные об особенностях стволовых клеток с различным потенциалом, их свойствах, маркерах, генах, контролирующих пролиферацию и дифференцировку. Как с теоретической точки зрения, так и с целью создания эффективных способов лечения дегенеративных заболеваний значительное внимание в ближайшие годы должно быть уделено исследованиям, посвященным управлению репродукцией и дифференцировкой стволовых клеток, раскрытию молекулярных механизмов внутриклеточной и межклеточной сигнализации, а также геномных и эпигенетических программ развития этих элементов. Особую роль в последнее время отводят созданию специализированных матриксных материалов, имитирующих различное микроокружение, которое в одних случаях стимулирует клетку к пролиферации и подавляет дифференцировку, а в других – напротив, вызывает индукцию дифференцировки и образование специа-

лизированных клеточных типов взрослого организма. Отправной точкой в таких исследованиях является анализ состава и строения макромолекул внеклеточного матрикса, их комбинаторики, взаимодействий между собой в составе сложно устроенных трехмерных структур и способности таких структур влиять на судьбу клеток *in vitro* и *in vivo*.

Внеклеточный матрикс играет огромную роль в жизнедеятельности клеток и формировании тканей. Главными макромолекулами межклеточного вещества являются углеводы и фибриллярные белки, образующие сложно структурированные сети. Вместе белки и углеводы создают микроокружение клеток и поддерживают постоянный химический состав и физико-механические характеристики среды. В зависимости от типа сахарных остатков, типа и положения связей и количества сульфатных групп углеводы разделяют на две основные группы: несulfатированные (гиалуроновая кислота) и sulfатированные (галактозамины – хондроитин- или дерматансульфат, глюкозамины – гепарансульфат, гепарин и кератансульфат) [2, 14].

Основным физическим свойством гликозаминогликанов является высокая гидрофильность. Из-за отталкивания отрицательно заряженных цепей в растворе эти вещества формируют гели даже при низкой концентрации; кроме того, химические группировки способны притягивать катионы (например, Na⁺, Ca²⁺), то есть депонировать вещества. Что немало важно, эти гели не препятствуют перераспределению молекул, равно как и миграции клеток [13]. Гликозаминогликаны способны связывать и регулировать активность многих белков – цитокинов, хемокинов, факторов роста, морфогенов, факторов адгезии, – что позволяет им влиять на судьбу клеток и определяет общие функции этих соединений [2].

Самым распространенным гликозаминогликаном является гиалуроновая кислота, которая входит в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей, составляет существенную часть внеклеточного матрикса и выполняет ряд функций в ходе развития и жизнедеятельности взрослого организма [7]. Гиалуронат способен взаимодействовать с различными белками и протеогликанами. У многих из них даже выявлены гомологичные гиалуронатсвязывающие домены со специфическим кластером положительно заряженных аминокислот. Гиалуронат участвует в запуске сигнальных путей. Рецепторы CD44

Кумейко Вадим Владимирович – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии ИБМ ДВО РАН, доцент кафедры клеточной биологии ДВГУ; тел. +7 (902) 555-18-21, e-mail: vkumeiko@yandex.ru.

и RHAMM — основные известные партнеры гиалуроновой кислоты при сигналинге — экспрессируются как эмбриональными, так и другими типами стволовых клеток, включая раковые [2].

Гиалуронат оказывает определенное влияние на нейрогенез, и в норме достаточно обильно представлен в нервной ткани. Различные структуры взрослой и развивающейся нервной системы содержат разное количество этого гликозаминогликана, варьирует и длина полимерных цепей, что свидетельствует об участии различных форм вещества в разных процессах [3].

Многочисленные эксперименты по культивированию нейтральных стволовых клеток в гелевых матриксах на основе гиалуроновой кислоты позволили выявить специфическое воздействие полисахарида на развитие и гомеостаз нервной системы. Результаты исследований демонстрируют, что гиалуронат способствует выживаемости клеток, поддерживает и усиливает рост аксонов, сдвигает паттерны дифференцировки клеток или поддерживает недифференцированное состояние, специфически взаимодействует с другими факторами и не препятствует действию растворенных в жидкой фазе гелевого материала иных индукторных веществ. Крайне важно, что введение гелей на основе гиалуроновой кислоты не вызывает цитотоксических эффектов и патологических реакций, материал является биосовместимым и деградирует в организме. Терапия травм нервной системы с использованием гиалуроновой кислоты приводит к уменьшению глиального шрама, формированию меньших адгезивных формаций, ускорению регенерации аксонов, в целом способствует более успешному восстановлению утраченных функций [1, 10].

Целью данного исследования явился анализ функциональных свойств матриксных материалов нового типа, не относящихся к производным гиалуроновой кислоты, однако существенным образом имитирующих ее функции и отчасти химическое строение. Такие материалы, содержащие уроновые кислоты, были получены авторами данной работы, а их способность влиять на судьбу нейтральных стволовых клеток в культуре продемонстрирована в настоящем исследовании.

Материал и методы. Для исследования использовали клетки из разных отделов головного мозга 15-дневных эмбрионов крыс линии Vistar. Беременных крыс усыпляли эфирным наркозом и забивали путем декапитации. После препарирования матки эмбрионов извлекали, быстро промывали в стерильном физиологическом растворе и помещали в чашки Петри со средой ДМЕМ. Далее в культуральном боксе эмбрионов препарировали, вскрывали черепную коробку и аккуратно выделяли нужные отделы головного мозга: вентральные области среднего мозга, обонятельные луковицы и гиппокамп. Выделенные отделы мозга помещали в маркированные чашки со средой ДМЕМ. Средний мозг выделен от 12, обонятельные доли — от 10 и гиппокамп — от 15 эмбрионов.

Органы переносили в стерильные пробирки со средой ДМЕМ в объеме 2–3 мл и 20–30 раз пипетировали с помощью стерильной пипетки Пастера. Полученную суспензию клеток центрифугировали в стерильных флаконах типа Falcon при 400 g 10 мин. Клетки ресуспензировали в 2 мл стандартного раствора трипсина и ЭДТА (1:4), приготовленного на фосфатном буфере (pH 7,4), и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Действие трипсина ингибировали добавлением среды с эмбриональной телячьей сывороткой. Материал пипетировали и суспензию осаждали при 400 g 15 мин. Полученный осадок ресуспензировали в растворе среды с добавлением 12% эмбриональной сыворотки.

Оценку жизнеспособности клеток проводили при помощи витальной окраски трипановым синим с подсчетом живых и погибших клеток в камере Горяева.

Полученные суспензии рассаживали с плотностью 1×10^5 клеток/см² в культуральные полистирольные флаконы (Corning Inc., 25 см²) для дальнейшей инкубации. Клетки вентрального среднего мозга, обонятельного мозга и гиппокампа эмбрионов выращивали на среде ДМЕМ с добавлением 12% эмбриональной сыворотки при 37°C, 5% CO₂, во влажной камере. Среду меняли три раза в неделю. Нейросферы были готовы для пересева через 6–8 дней культивирования. Для пересева клетки аккуратно собирали и осаждали, дезагрегировали стерильной пипеткой и высевали с плотностью $1,25 \times 10^4$ клеток/см². Культуры пересевали каждые 7 дней.

Тщательно вымытые оптические стекла обрабатывали горячей концентрированной соляной кислотой, промывали в проточной и дистиллированной воде, сушили, стерилизовали и хранили в стерильной посуде. Стерильные оптические стекла инкубировали 1 час в растворе стерильных модифицированных полисахаридных комплексов (МПК) 1, 2 и 3 в закрытых чашках Петри. Далее стекла высушивали в течение 30–40 мин и раскладывали в лунки планшетов. Часть стекол покрывали оригинальной матриксной белковой композицией БМ-IV, которая в качестве важного индукторного компонента содержала димерную форму коллагена IV типа (процедура получения коллагена IV подробно описана в другой нашей статье, помещенной в этом же номере журнала).

После трех недель культивирования и пересева нейросфер в культуральных флаконах их клетки ресуспензировали и пересаживали на матрицы в 24-луночные культуральные планшеты. Матрицы предварительно раскладывали в лунки планшетов, после чего заливали средой на 1 час. Для создания условий, препятствующих активной пролиферации, далее исходную среду (с 12% эмбриональной сывороткой) меняли на среду с 2% эмбриональной сывороткой и клетки помещали в лунки планшета из расчета 22000 единиц на лунку. В качестве контроля использовали полистирольный пластик дна планшета. Культивировали клетки в течение 7 суток, среду меняли раз в трое суток.

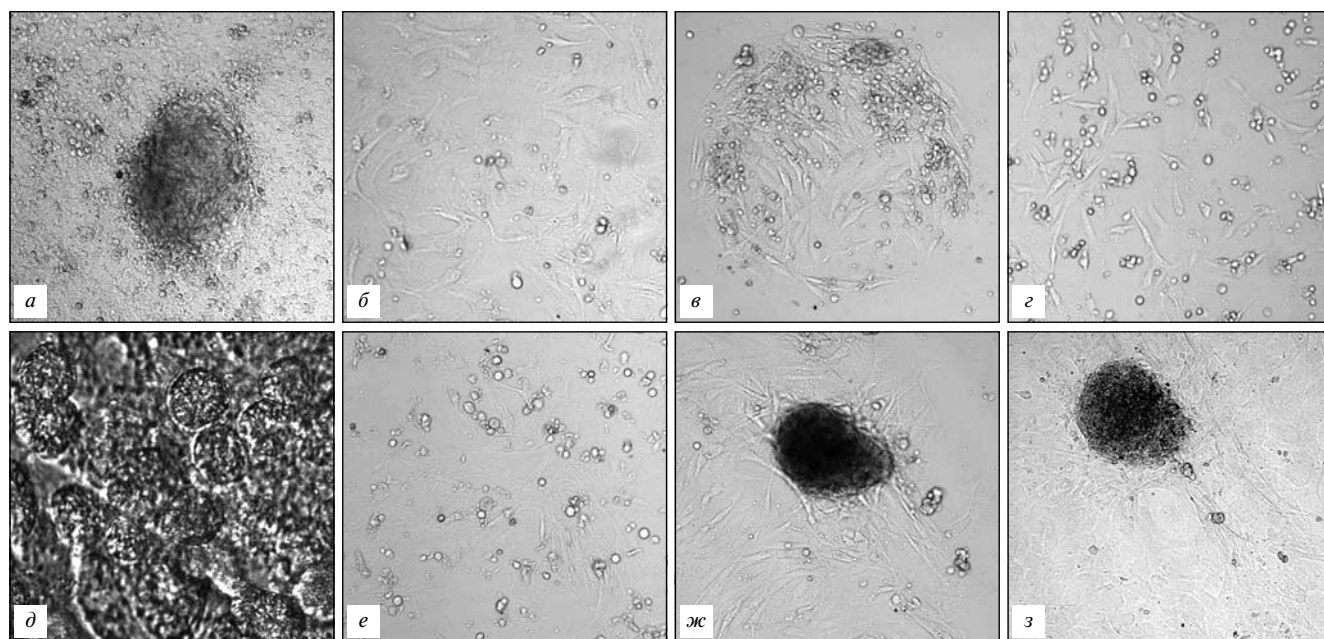


Рис. 1. Поведение нейральных стволовых клеток крыс в условиях, стимулирующих пролиферацию и дифференцировку: а – культура активно пролиферирующих клеток с типичными нейросферами; б, в, г – спонтанно дифференцирующиеся культуры среднего мозга, гиппокампа и обонятельных луковиц соответственно на полистирольном пластике при 2% эмбриональной телячьей сыворотке; д – типичный вид нейросфер при 63-кратном увеличении объектива; е, ж, з – поведение культуры нейральных стволовых клеток обонятельных луковиц на матриксе БМ-IV на 1, 2 и 6-е сутки культивирования. Увеличение объектива $\times 10$ (если не указано иное).

Препараты анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 Meta (Carl Zeiss) с применением детектора проходящего света, источников когерентного излучения – аргонового и гелиево-неонового лазеров и техники дифференциального интерференционного контрастирования.

Результаты исследования. Культуры эмбриональных клеток вентрального среднего мозга, гиппокампа и обонятельных луковиц активно пролиферировали в среде с добавлением 12% эмбриональной телячьей сыворотки и образовывали многочисленные нейросферы (рис. 1, а). Активно пролиферирующие клетки нейросфер (рис. 1, д) характеризовались типичной для стволовых клеток сферической формой, проявляли умеренную адгезионную способность и по мере культивирования расселялись за пределы нейросфер, достигая на 7-е сутки каждого из пассажей практически полной конфлюентности клеточного слоя (рис. 1, а). С целью обогащения культур мультипотентными клетками и удаления из них дифференцирующихся клеток при каждом из последующих пассажей для культивирования отбирали только фракции клеток, входившие в состав нейросфер, которые первыми отделялись от субстрата в процессе ферментативной обработки. Таким образом, после трех пассажей были получены культуры нейральных стволовых клеток, пригодные для дальнейших экспериментальных процедур.

Полученные культуры трех типов проявляли хорошую жизнеспособность, которая в среднем составляла $84 \pm 9\%$. Способность клеток к спонтанной дифференцировке и выходу из клеточного цикла оценивали стандартным способом, переводя неболь-

шие порции клеток в условия 2% эмбриональной сыворотки. Такие клетки уже через 2 суток культивирования образовывали хорошо адгезированные пласты на полистирольном пластиковом дне 24-луночного планшета. Не менее 50% клеток каждой из трех типов культур в этих условиях содержали распластанные биполярные и триангулярные клетки (рис. 1, б, в, г). В процессе культивирования в составе спонтанно дифференцирующихся культур наблюдали незначительное число нейросфер, которые практически исчезали на 15-е сутки.

Способность полученных культур нейральных стволовых клеток к индуцированной адгезии и дифференцировке выявляли с применением БМ-IV. Результаты культивирования нейральных стволовых клеток обонятельного мозга на 1-е, 2-е и 6-е сутки эксперимента на матриксе БМ-IV в присутствии 2% эмбриональной телячьей сыворотки представлены на рис. 1 е, ж, з. К концу срока культивирования наблюдали немногочисленные нейросферы, а практически все дно лунок было покрыто хорошо адгезированными отростчатыми элементами с гранулярной цитоплазмой – клетками нейронального направления дифференцировки. Идентичные картины были зарегистрированы и для двух других типов культур – прогениторных клеток вентрального среднего мозга и гиппокампа.

Ключевым моментом исследования было наблюдение за поведением нейральных стволовых клеток на разработанных нами матриксных композициях (ноу-хау авторов работы), содержащих модифицированные полисахаридные комплексы, в состав которых входят производные уроновых кислот разного

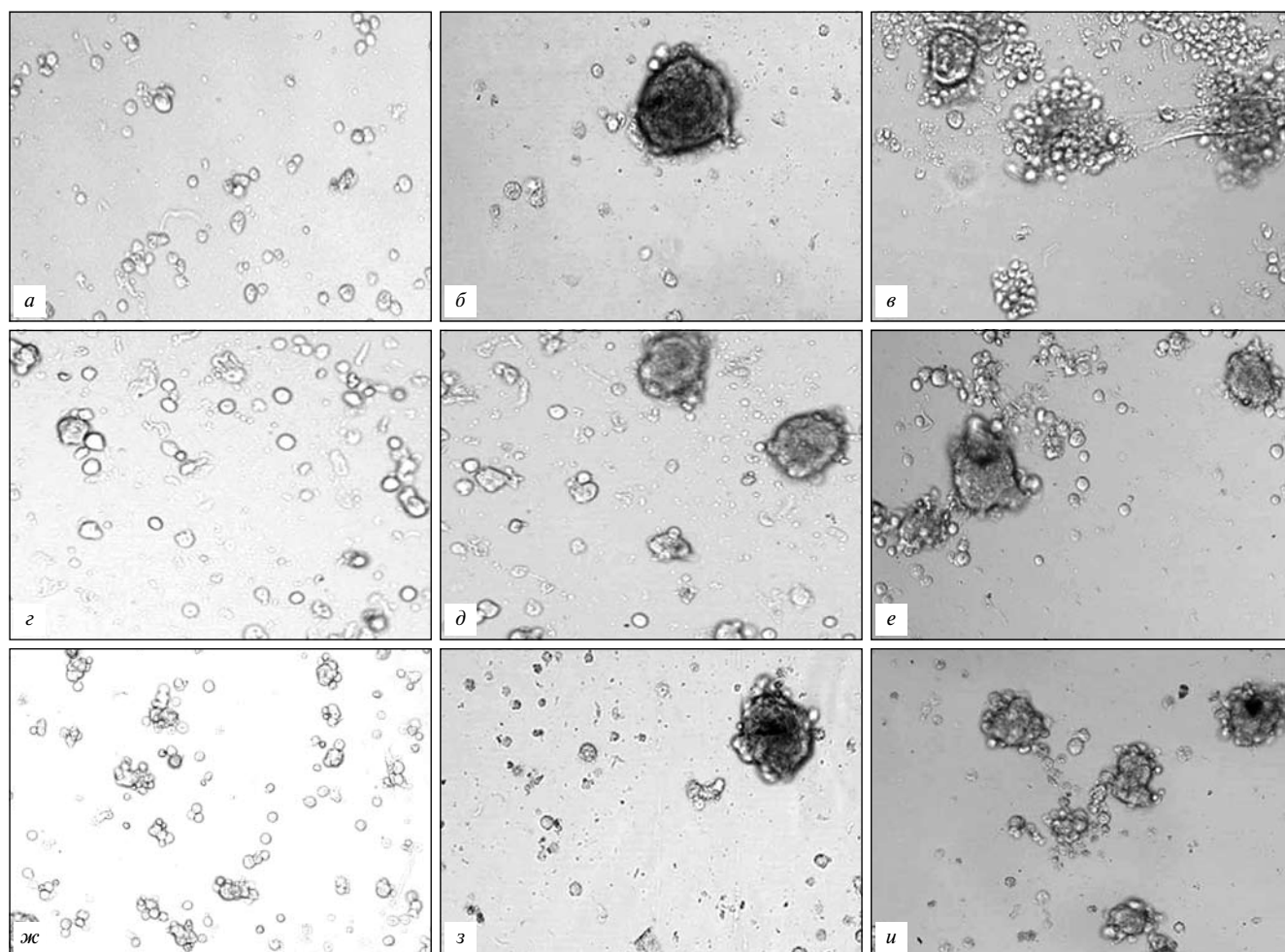


Рис. 2. Результат культивирования нейральных стволовых клеток крыс на матриксах МПК-1, МПК-2 и МПК-3: а, б, в – культура нейральных клеток эмбрионального вентрального среднего мозга; г, д, е – культура нейральных клеток эмбрионального гиппокампа; ж, з, и – культура нейральных клеток эмбриональных обонятельных луковиц; а, г, ж – соответствуют матриксу МПК-1; б, д, з – соответствуют матриксу МПК-2; в, е, и – соответствуют матриксу МПК-3. Увеличение объектива $\times 10$.

строения. Оценивали поведение нейральных стволовых клеток на матриксах МПК-1, МПК-2 и МПК-3. Контролем служили культуры на обычном полистирольном культуральном пластике и на матриксе БМ-IV, для которого продемонстрирована способность индуцировать адгезию и дифференцировку прогениторных клеток (см. другую нашу статью в этом же номере журнала).

Уже на вторые сутки все исследуемые культуры на матриксе МПК-1 представляли собой поля разрозненных слабо адгезированных клеток сферической формы; в отдельных случаях образовывались небольшие ассоциации из 5–15 элементов, которые в присутствии 2% эмбриональной сыворотки не проявляли значительной пролиферативной активности. Количество клеток заметно не изменялось ни для одного из типов исследуемых культур на протяжении 7 суток. В культурах на матриксе МПК-1 мы не наблюдали никаких признаков начала дифференцировки – плотной адгезии, образования отростков будущих нейронов или глиальных клеток; напротив, наблюдалось выраженное ингибирование этих процессов (рис. 2, а, г, ж).

Клетки всех трех типов проявляли несколько иные свойства на матриксе МПК-2. Они формировали крупные сфероидные ассоциации, морфологически сходные с эмбриоидными телами, наблюдаемыми в культурах плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток (рис. 2, б, д, з). Следует отметить, что такие ассоциации были сходны с нейросферами по размерам, однако существенно отличались от них своими гладкими границами. При этом клетки проявляли более выраженные, чем в нейросферах, контактные взаимодействия типа «клетка–клетка», что в целом демонстрировало внешнее сходство данных образований с телами эмбрионов, завершивших стадию дробления. В составе таких культур, как и на матриксе МПК-1, мы не обнаружили никаких признаков дифференцировки клеток на протяжении 7 суток эксперимента.

Поведение клеток на матриксе МПК-3 также имело свои особенности, общие для всех типов культур. На данном субстрате клетки формировали конгломераты, морфологически отличные от таковых на матриксе МПК-2. Для клеточных ассоциаций здесь была характерна более разобшенная структура

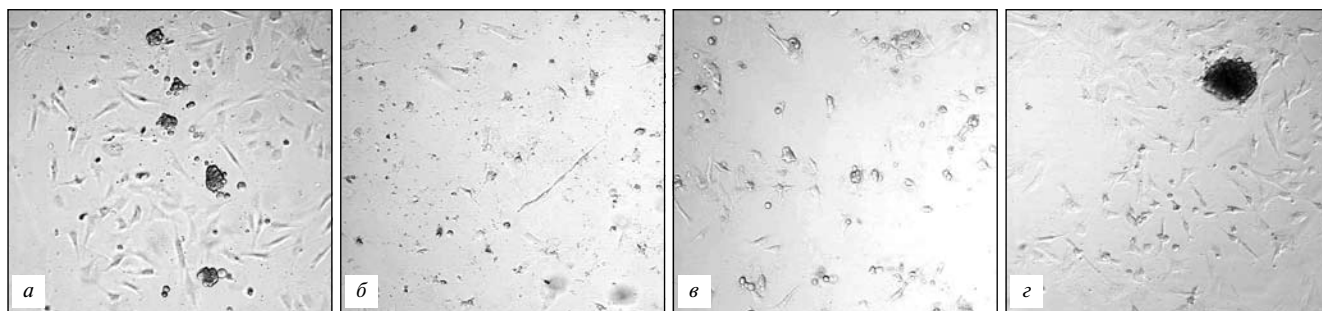


Рис. 3. Результат рекультивирования нейральных стволовых клеток на матриксе БМ-IV, предварительно культивированных на композициях МПК-1, МПК-2, и МПК-3:

а, б, в – стволовые клетки обонятельных луковиц через 1 сутки рекультивирования на субстратах МПК-1, МПК-2 и МПК-3 соответственно; *г* – формирование отростчатых клеток в культуре обонятельных луковиц на 3-и сутки рекультивирования после МПК-2. Увеличение объектива $\times 10$.

с менее выраженными контактами «клетка–клетка». Часть элементов таких ассоциаций рассыпью располагалась по периферии более плотной центральной части конгломератов. Кроме того, значительная доля клеток была спорадически распределена между конгломератами. Среди свободно рассеянных элементов изредка встречались веретеновидные и отростчатые клетки с первыми признаками дифференцировки, однако их доля не превышала 1–2% от общего числа клеток в культуре.

Анализ поведения клеток на исследуемых матриксных композициях, содержащих модифицированные природные полисахаридные комплексы, показал способность всех трех типов материалов ингибировать клеточную дифференцировку в культурах нейральных стволовых клеток. Однако необходимо было выяснить, сохраняется ли жизнеспособность этих клеток в процессе культивирования на данных материалах и будут ли они способны дифференцироваться и продолжать нормальную жизнедеятельность. С этой целью проводили рекультивирование клеток, после того как их дифференцировка была подавлена на матриксах МПК-1, МПК-2 и МПК-3. В ходе данных экспериментов через 7 суток культивирования клетки всех анализируемых культур были сняты с полисахаридных субстратов и пересеяны на стекла, покрытые матриксом БМ-IV, содержащим коллаген IV типа. Для иллюстрации результатов этих экспериментов приведем данные, полученные на культурах нейральных клеток обонятельных луковиц. На рис. 3, а, б и в показаны результаты рекультивирования в течение 1 суток. Видно, на субстрате БМ-IV происходила адгезия клеток, их распластывание и формирование отростков. Уже через 3 суток такие клеточные культуры содержали значительное количество многоотростчатых элементов с характерными признаками начальных этапов дифференцировки (рис. 3, г).

Таким образом, все три типа исследуемых полисахаридных матриксных материалов были способны обратимо подавлять дифференцировку клеток. Тем не менее были обнаружены и некоторые отличия: так, для культур на МПК-1 была установлена более низкая жизнеспособность по сравнению с таковой на МПК-2 и МПК-3.

Обсуждение полученных данных. При создании биогелей для нужд клеточной инженерии часто используется гиалуроновая кислота. Процедуры производства таких гидрогелей в качестве основы и среды для клеточных имплантатов нервной системы, как правило, включают их модификацию с добавлением нейротрофических факторов, полилизина, нейро-репеллентов или других веществ. В зависимости от преобразования такие гели поддерживают нервные прекурсоры клетки в недифференцированном состоянии или, наоборот, сдвигают их развитие в сторону нейрональных или глиальных линий. Материал способствует выживанию клеток и может служить основой для комбинированных гелево-клеточных имплантатов [8].

В настоящей работе продемонстрированы результаты культивирования нейральных стволовых клеток на углеводном матриксе, содержащем уруновые кислоты, но существенно отличном от гиалуроната по своему строению. Культивирование нейральных стволовых клеток трех отделов эмбрионального мозга крыс на матрицах МПК-1, МПК-2 и МПК-3 приводило к эффективному подавлению дифференцировки клеток (рис. 2). Подобные результаты были получены ранее некоторыми авторами с применением матриксных материалов, также содержащих уруновые кислоты, но не относящихся к гиалуронату и получаемых из некоторых источников неживотного происхождения.

Примером полисахаридов на основе уруновых кислот, активно исследуемых в качестве перспективных сред для терапии повреждений центральной нервной системы, является альгиновая кислота – линейный полимер, мономерами которого являются (1-4)-связанная β -D-маннуросовая и α -L-гулуросовая кислоты.

Культивирование обкладочных обонятельных клеток, шванновских клеток и стромальных клеток красного костного мозга на альгинатном геле трансформирует их в атипичные сферические формы, метаболическая активность клеток при этом ингибируется [6]. Однако внедрение альгинатного геля в поврежденный спинной мозг крыс стимулирует рост аксонов и уменьшает размер глиального рубца

[4]. Более того, аксоны, которые прорастают в гель, покидают имплантат с другого его конца и образуют контакты с локальными нейронами [11]. Имплантация волокон из поли- β -гидроксипропиридата, покрытых альгинатом и фибронектином, в поврежденный спинной мозг крыс также увеличивает количество выживающих аксонов [5].

Как видно из результатов работ других авторов, полисахариды из нетрадиционных сырьевых источников могут быть эффективны и перспективны для создания биомедицинских материалов нового поколения. Важным свойством таких материалов на основе полисахаридов может оказаться их способность ингибировать дифференцировку клеток, что является необходимым для нужд практической медицины на этапах наращивания и сохранения биомассы стволовых клеток, которые предшествуют дальнейшему запуску программ дифференцировки и инокуляции коммитированных элементов в составе клеточно-биополимерных конструкций в область повреждения. Такие матриксные материалы будут способствовать правильному культивированию клеток в лабораторных условиях и исключат появление паразитной спонтанной дифференцировки. Следует, однако, отметить, что при создании новых матриксных материалов на основе углеводов следует учитывать и тщательно анализировать новые субстраты на предмет обратимости ингибированной ими дифференцировки, анализировать жизнеспособность клеток на таких субстратах разного строения. В данном исследовании показано, что после недельного культивирования клеток на предлагаемых нами полисахаридных матриксах, выступающих в качестве ингибиторов дифференцировки, возможно дальнейшее развитие и дифференцировка таких клеток при их рекультивировании на субстратах, индуцирующих нейродифференцировку. То есть установленный ингибиторный эффект был обратимым, а жизнеспособность культивируемых клеток оставалась на приемлемом уровне.

Исследуя роль новых углеводсодержащих матриксных материалов, предлагаемых для культивирования стволовых клеток и создания имплантатов, следует обращать внимание на весь спектр биологических свойств, который отмечен для биополимеров данной группы, ведь результаты такого поиска могут дать новые комбинации свойств и новые контекст-зависимые регуляторные механизмы. Так, не лишним будет упомянуть о свойствах некоторых других гликополимеров животного происхождения, не являющихся аналогами гиалуроновой кислоты.

Гликозаминогликаны других типов имеют меньшие цепи (как правило, не более 300 остатков), состоящие из разных комбинаций дисахаридов в сульфатированной форме, и присутствуют в тканях в основном в виде протеогликанов. Протеогликаны чрезвычайно разнообразны, что делает возможной крайне гибкую настройку функций. Протеогликаны

способны формировать гели с любыми размерами пор и силой заряда, вследствие чего они могут функционировать как селективные сита, регулирующие движение молекул и клеток в соответствии с размером и зарядом.

Гепарансульфатированные протеогликаны участвуют в поддержании способности стволовых клеток к самообновлению, регулируя активность таких сигнальных путей, как LIF, BMP и Wnt [9]. Гепарансульфат влияет на пролиферацию и дифференцировку нейтральных стволовых клеток, так как является кофактором основного фактора роста фибробластов, необходимого для поддержания мультипотентности и стимуляции пролиферации нейтральных стволовых клеток и нейтральных клеток-предшественников [12].

Хондроитинсульфатированные и кератансульфатированные протеогликаны оказывают ингибирующее влияние на регенерацию нервной системы, так как способствуют формированию глиального рубца [15]. Тем не менее существуют данные о том, что низкая концентрация хондроитинсульфата в субстрате *in vitro* поддерживает аксональный рост, а высокая — подавляет.

Таким образом, углеводы сами по себе и в комплексе с другими молекулами внеклеточного матрикса оказывают влияние на самые разные типы клеток в организме, контролируют фундаментальные процессы пролиферации, дифференцировки и задействованы в развитии патологических состояний. С учетом свойств гликополимеров различного строения возможно создание новых матриксных материалов для нужд трансплантологии и регенеративной медицины. Так, по результатам настоящего исследования следует заключить, что из анализируемых нами матриксных материалов наиболее перспективным может стать МПК-2, поскольку в отличие от МПК-1 он способствует большей выживаемости клеток, а по сравнению с МПК-3 более эффективно подавляет клеточную дифференцировку. Данный матриксный материал может оказаться полезным для сохранения и наращивания стволовых клеток при создании имплантатов без выхода клеток на спонтанную дифференцировку в условиях лабораторной культуры.

Литература

1. Atzei A., Calcagni M., Breda B. et al. *Clinical evaluation of a hyaluronan-based gel following microsurgical reconstruction of peripheral nerves of the hand // Microsurgery. 2007. Vol. 27. P. 2–7.*
2. Gandhi N.S., Mancera R.L. *The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins // Chemical Biology and Drug Design. 2008. Vol. 72. P. 455–482.*
3. Inoue Y., Yoneda M., Miyai O. et al. *Hyaluronan dynamics during retinal development // Brain Research. 2009. Vol. 1256. P. 55–60.*
4. Kataoka K., Suzuki, Y., Kitada, M. et al. *Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats // J. Biomed. Mater. Res. 2001. Vol. 54, No. 3. P. 373–384.*

5. Novikov L. N., Novikova, L. N., Mosahebi, A. et al. A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury // *Biomaterials*. 2002. Vol. 23, No. 16. P. 3369–3376.
6. Novikova L. N., Mosahebi, A., Wiberg, M. et al. Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation // *J. Biomed. Mater. Res*. 2006. Vol. 77A, No. 2. P. 242–252.
7. Olczyk P., Komosinska-Vashev K., Winsz-Szczoika K. et al. Hyaluronic acid: Structure, metabolism, functions, and role in wound healing // *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*. 2008. Vol. 62. P. 651–659.
8. Pan L.J., Ren Y.J., Cui F.Z. et al. Viability and differentiation of neural precursors on hyaluronic acid hydrogel scaffold // *Journal of Neuroscience Research*. 2009. Vol. 87. P. 3207–3220.
9. Sasaki N., Okishio, K., Ui-Tei, K. et al. Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283, No. 6. P. 3594–3606.
10. Smit X., van Neck J.W., Afoke A. et al. Reduction of neural adhesions by biodegradable autocrosslinked hyaluronic acid gel after injury of peripheral nerves: an experimental study // *Journal of Neurosurgery*. 2004. Vol. 101. P. 648–652.
11. Suzuki Y., Kitaura, M., Wu, S. F. et al. Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord // *Neurosci. Lett*. 2002. Vol. 318, No. 3. P. 121–124.
12. Vaccarino F.M., Schwartz M.L., Raballo R. et al. Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis // *Nat. Neurosci*. 1999. Vol. 2. P. 246–253.
13. Wiig H., Gyenge C., Iversen P.O. et al. The role of the extracellular matrix in tissue distribution of macromolecules in normal and pathological tissues: Potential therapeutic consequences // *Microcirculation*. 2008. Vol. 15. P. 283–296.
14. Yung S., Chan T.M. Glycosaminoglycans and proteoglycans: Overlooked entities? // *Peritoneal Dialysis International*. 2007. Vol. 27. P. 104–109.
15. Zhang H., Uchimura K., Kadomatsu K. Brain Keratan Sulfate and Glial Scar Formation // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2006. Vol. 1086. P. 81–90.

Поступила в редакцию 20.10.2009.

DIFFERENTIATION INHIBITION OF NEUTRAL STEM CELLS VIA BIO-POLYMER MATRIX MATERIALS

V.V. Kumeiko^{1,2}, A.P. Anisimov², A.V. Scheblykina¹, A.A. Astakhova¹, N.E. Zyumchenko², N.P. Tokmakova², I.A. Kirsanova², A.A. Anisimova², E.V. Demidenko¹, I.V. Dyuzhen¹, Yu.S. Khotimchenko¹

¹ Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmundsky, FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russia),

² Far Eastern National University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950, Russia)

Summary – The authors analyze properties of bio-polymer matrix materials being partial structurally-functional analogues of hyaluronic acid-based glycopolymers. Original modified polysaccharidic compounds had inhibiting effect on the capability of neutral stem cells to differentiate. To estimate cell vitality after cultivation on the substrates under study, the authors have re-cultivated them under the conditions of induced adhesion and differentiation. All the studied variants of glycopolymer matrixes have proved the capability of cells to differentiate and regular grow under the conditions of neuro-induction substrate that included dimerous forms of IV type collagen. One of the materials included modified derivatives of uronic acids has been recommended as promising matrix capable of inhibiting undesirable spontaneous differentiation of neutral stem cells during derivation and conservation of their biomass needed to create artificial implants of nervous tissue. **Key words:** stem cells, extracellular matrix, bio-polymer materials, reproduction and differentiation.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 2, p. 20–26.

УДК

V.V. Кумейко^{1,2}, *Ю.С. Хотимченко*¹, *А.А. Астахова*¹, *А.В. Щеблыкина*¹, *Н.Е. Зюмченко*², *Н.П. Токмакова*², *А.А. Анисимова*², *С.И. Титов*², *Е.В. Демиденко*¹, *А.А. Борейко*¹, *И.В. Дюйзен*¹, *И.А. Кирсанова*², *А.П. Анисимов*²

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),

²Дальневосточный государственный университет (690950 г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

УПРАВЛЕНИЕ РОСТОМ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МИКРОСТРУКТУРИРОВАННЫХ НАНОГЕТЕРОГЕННЫХ МАТРИКСНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Ключевые слова: стволовые клетки, репродукция и дифференцировка, внеклеточный матрикс, биополимеры.

Представлены результаты исследования, посвященного разработке микроструктурированных наногетерогенных матриксных материалов, применение которых обеспечивает управление ростом и дифференцировкой клеток для создания искусственных тканевых имплантатов на основе клеточно-биополимерных конструкций. Для создания микроструктурированных матриц использованы оригинальные композиции биополимеров белковой и углеводной природы, специфически модифицированные и позиционированные в составе материалов с помощью установки для многоканального инъекторного напыления. На культурах нейральных стволовых клеток показана способность одних типов матриц вызывать направленный рост и дифференцировку клеток вдоль треков композита, а матриц других типов – ингибировать дифференцировку с сохранением позиционирования клеточных ассоциаций.

Кумейко Вадим Владимирович – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии ИБМ ДВО РАН, доцент кафедры клеточной биологии ДВГУ; тел. +7 (902) 555-18-21, e-mail: vkumeiko@yandex.ru.

Идентификация и исследование свойств стволовых клеток человека и животных являлись до настоящего времени одними из главных задач клеточной биологии и биоинженерии. Стволовые клетки, способные безгранично делиться, сохраняя в отличие от трансформированных (в том числе раковых) клеток нормальный генный и хромосомный набор, интересуют не только теоретическую науку, но и рассматриваются как реальный инструмент клеточной терапии. Этот инструмент может позволить в самом ближайшем будущем предотвращать и устранять дегенеративные процессы в тканях, сопровождающие целый ряд заболеваний, способствовать направленному обновлению тканей, омоложению клеточного состава органов с низкой способностью к обновлению, репарации тканей в посттравматическом периоде. Первый опыт использования стволовых клеток, введенных