

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. Шеблыкина*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 установок 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

внутри взрослого организма, позволяет сделать вывод о большой перспективности, но вместе с тем и потенциальной опасности таких элементов, способных безгранично делиться и приводить к образованию не только дифференцированных «рабочих» клеток, но и к развитию новообразований. Таким образом, задачей ближайшего будущего является создание технологий управления репродукцией, ростом и дифференцировкой стволовых элементов с целью развития их в нормальный, функционально активный клеточный тип. Только при условии включения клеточных программ на определенный путь дифференцировки терапия с помощью стволовых клеток может стать потенциально безопасной и эффективной.

Травматические повреждения центральной нервной системы, помимо высокой летальности, часто характеризуются инвалидизацией пациентов в связи с развитием психоневрологических, соматических и вегетативных осложнений. Восстановление утраченных функций спинного и головного мозга существующими фармакологическими средствами не представляется возможным из-за очень низкой способности нервной ткани к регенерации. В связи с этим в качестве перспективных инструментов управляемого реконструктивного нейrogenеза рассматривается использование различных биodeградируемых полимерных имплантатов, выполняющих сложную формообразующую, заместительную и трофическую, а также индукторную функцию в реализации репаративных процессов. Наибольшие перспективы, по мнению многих исследователей, имеет подход, комбинирующий идеи клеточной терапии с помощью коммитированных стволовых клеток и применения биodeградируемых матриксных материалов, управляющих ростом и дифференцировкой имплантируемых клеток.

Матриксные материалы востребованы и перспективны в области разработки биомедицинских клеточных технологий. Правильно созданный и организованный матрикс будет не инертным окружением, а активной средой, регулирующей основные процессы жизни клеток: выживание, пролиферацию, метаболизм, дифференцировку. Основным правилом при создании биоматериалов считается максимальное подобие искусственной системы естественному внеклеточному матриксу. Речь идет о химическом, физическом и механическом соответствии [5]. Основой таких материалов должно служить физиологически совместимое гелеобразное вещество белковой и/или углеводной природы [6]. В состав материала должны входить компоненты, определяющие свойства и характер воздействия матрикса. Поскольку внеклеточная среда сложно упорядоченная структура, для искусственных матриксов, параллельно с поиском и тестированием различных потенциальных компонентов, разрабатываются технологии, позволяющие располагать вещества гетерогенно относительно друг друга. Основными

подходами для упорядочивания индукторных компонентов в структуре поддерживающего аморфного вещества на сегодняшний день можно считать литографическое нанесение и инжекторное напыление материалов.

Данная работа является одной из попыток реализации подхода к изготовлению микроструктурированных наногетерогенных матриксных материалов, базовым принципом которого является применение многоканального инжекторного напыления компонентов (струйной печати).

Материал и методы. Для получения культур нейральных стволовых клеток использовали разные отделы головного мозга 15-дневных эмбрионов крыс линии Vistar. В данной работе основные результаты продемонстрированы на нейральных стволовых клетках, полученных из области эмбрионального стриатума. Особенности получения и культивирования нейральных стволовых клеток приведены нами в другой работе в данном номере журнала, где подробно описаны получение и культивирование стволовых клеток из других отделов мозга крыс.

Коллаген IV типа, по-видимому, имеет ряд специфических функций в нервной ткани и может выступать претендентом для исследований, связанных с дифференцировкой и регенерацией нейронов и глиальных клеток. Данный белок мы получали в димерной форме, для которой показаны нейроиндукторные свойства.

Коллаген выделяли из мускульных куриных желудков по методике [8]. Желудки (100 г) гомогенизировали в 500 мл буфера 1 (0,15 М NaCl, 0,05 М Tris-HCl, 0,02 М PMSF, pH 7,4). Суспензию центрифугировали дважды в течение 20 мин при 12000 g и 4°C (Allegra Beckman, угловой ротор). После второго центрифугирования осадок ресуспензировали в 250 мл буфера 2 (0,15 М NaCl, 0,05 М Tris-HCl, 0,02 М PMSF, 0,01 М EDTA, pH 7,4) и оставляли на магнитной мешалке на ледяной бане на 1 час. Смесь осаждали центрифугированием, повторяли промывание буфером 2 в течение часа, суспензию центрифугировали.

Осадок ресуспензировали в 250 мл 0,5 М уксусной кислоты, оставляли на магнитной мешалке на 3 суток при температуре 9°C. Суспензию центрифугировали. Осадок ресуспензировали в 125 мл 0,2 М NH_4HCO_3 при pH 7,9 и обрабатывали трипсином (150 мг, 1200 ед./мг) в течение 4 часов при комнатной температуре, после чего трипсинизацию останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов в количестве 250 мг. Смесь центрифугировали. К надосадочной жидкости при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке добавляли NaCl до конечной концентрации 1,7 М. Смесь инкубировали в течение ночи при температуре 3°C. После центрифугирования осадок ресуспензировали в буфере 3 (0,05 М Tris-HCl, 2 М $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 8,6), 37 мл конечной смеси. Раствор осветляли центрифугированием для удаления нерастворимых примесей.

Смесь наносили на колонку DEAE Sepharose Fast Flow (12 мл), уравновешенную буфером 3. Собирали проточную фракцию, не связавшуюся с носителем. Хроматографические процедуры контролировали с помощью проточной кюветы и спектрофотометра (Schimadzu UV-2550, программное обеспечение UVprobe 2.10). Фотоабсорбцию проточной фракции регистрировали при длине волны 234 нм. Фракцию, содержащую очищенный коллаген IV типа, диализовали против раствора гидрокарбоната аммония (0,2 М, рН 7,9, 900 мл) в течение суток при 0°C. Результаты очистки белка проверяли электрофорезом по Лэммли [3] в 9% разделяющем геле. Концентрацию белка определяли микробиуретовым методом [13] и методом Брэдфорда [1]. Полученный препарат димерного коллагена использовали для приготовления оригинальных матриксных композиций различного состава.

Для того чтобы контролировать положение коллагена и сопутствующих ему компонентов в структурированной матрице, белок модифицировали путем ковалентного присоединения флуоресцеина-5-изотиоцианата. Для окрашивания белка использовали свежеприготовленный раствор в концентрации 100 мкг/мл на 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,2). К белку, растворенному в 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,2), 0,2 М NaCl, добавляли раствор флуоресцеина-5-изотиоцианата в молярном соотношении 1:20. Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре на шейкере, измеряли ее оптическую плотность при 280 и 493 нм. Отделяли конъюгат от несвязавшегося красителя при помощи гель-фильтрации на Sephadex G-25. В собранных фракциях определяли оптическую плотность при длинах волн 280 и 493 нм и строили профиль элюции. Фракции, содержащие флуоресцирующий конъюгат белка и красителя, объединяли и использовали для изготовления оригинальной композиции, в которой коллаген IV типа является важным адгезионным и индуцирующим нейрогенез компонентом.

Результаты исследования. Наиболее перспективные технологии практического применения стволовых клеток, по нашему мнению, должны заключаться в изготовлении искусственных тканевых имплантатов на основе микроструктурированных наногетерогенных биополимерно-клеточных конструкций. Сам принцип данной технологии предусматривает следующие этапы:

- 1) создание графического проекта матрицы (маски) с помощью специального программного обеспечения;
- 2) печать многокомпонентных матриц с заданными свойствами с помощью многоканального инжекторного напыления, скоординированного с микро- и нанопозиционированием поддерживающей основы образца;
- 3) нанесение суспензии стволовых клеток на матрицы и их культивирование;
- 4) отбор проб клеток на фрагментах матрицы из образца с помощью системы микродиссекции;

- 5) идентификация индукции необходимого направления дифференцировки с помощью выявления специфических молекулярных маркеров;
- 6) введение полученного имплантата в очаг повреждения.

Для создания матриц была применена установка для прецизионного нанесения индукторных компонентов, имитирующих тренды естественных морфогенетических полей, управляющих ростом и дифференцировкой клеток.

Спроектированная нами система представляет собой инжекторную многоканальную установку с точным позиционированием образца поддерживающего аморфного носителя, на который наносятся компоненты, растворенные в подходящем растворителе. Разработанная конструкция позволяет осуществлять быстрое изготовление матриц с градиентами морфогенов и точным микропозиционированием каждого компонента комплексных полимеров. Все матрицы были получены с применением данного аппаратного средства. Основой установки является двухосевой координатный стол с электромеханической и пьезоэлектрической подачей, обеспечивающий позиционирование образцов с точностью в микро- и нанометровом диапазоне. Вторым важным узлом является многоканальный блок нанесения растворов, который закреплен неподвижно по осям X и Y относительно стола и может перемещаться по оси Z. Это сделано для компенсации толщины образцов и подбора зазора между образцом и блоком нанесения. Управление установкой осуществляется с персонального компьютера со специальным программным обеспечением. Взаимодействие компьютера с блоком нанесения растворов и столом осуществляется при помощи специальных модулей управления.

В данной работе представлены результаты конструирования матриксных материалов двух основных типов:

- 1) состоящих только из упорядоченного специализированного нейроиндукторного матрикса, содержащего в качестве основного компонента димерную форму коллагена IV типа (матрикс БМ-IV) на инертной аморфной основе;
- 2) матрикс БМ-IV, прецизионно нанесенный на поддерживающий слой модифицированных полисахаридных компонентов (МПК) типов 1, 2 и 3, являющихся гетерополисахаридами на основе уроновых кислот.

Экспериментальным путем было установлено, что степень и способ прикрепления компонентов матриц на подложку сильно зависит от подготовки поверхности, на которую наносятся элементы с помощью инжекторной установки.

В качестве нескольких способов подготовки поверхностей мы выбрали следующие. Первая группа вариантов поддерживающего слоя представляла собой оптическое стекло, обработанное концентрированной соляной кислотой, покрытое гидрофильным

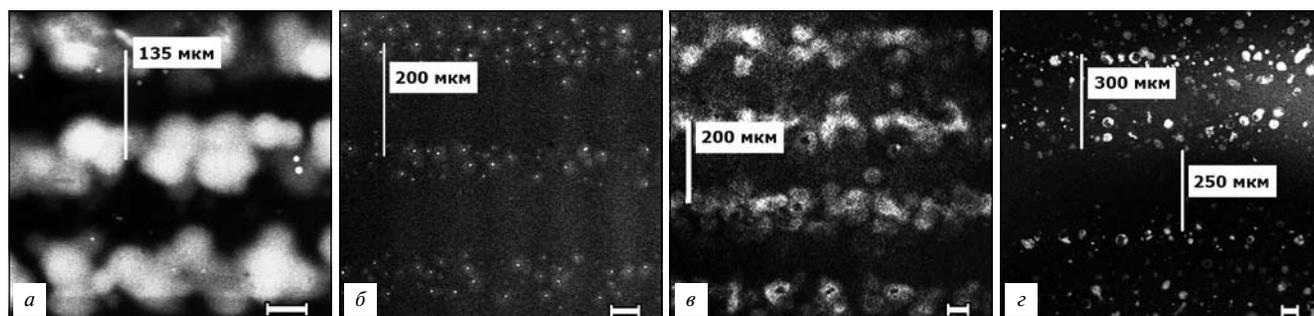


Рис. 1. Изображения матриц, полученные с помощью конфокального лазерного микроскопа при маркировании коллагена IV типа флуоресцентным красителем:

а – комбинированные матрицы БМ-IV на подлежащем белковом гидрофильном слое; *б* – вариант прецизионного точечного рисунка треков БМ-IV; *в* – комбинированные матрицы БМ-IV с композицией МПК-2 в качестве подлежащего слоя; *г* – вариант нанесения треков БМ-IV в виде пятен («spot»-мозаика).

белковым композитом (рис. 1, а). Вторая группа вариантов являлась гидрофобной поверхностью оптического стекла, обработанной винилтрихлорсилом в комбинации с другими реагентами (рис. 1, б). Третий вариант представлял собой гидрофильную коллоидную систему на основе МПК-1, МПК-2 и МПК-3 (рис. 1, в). Кроме того, было апробировано распыление полос в виде пятен – «спотов» и применено прецизионное нанесение точечного рисунка матрикса БМ-IV. Размеры отдельных точек при этом составляли около 1–7 мкм (рис. 1, г).

В качестве базовой маски – графического образа, по шаблону которого осуществлялась печать, были использованы простые геометрические изображения – чередующиеся полосы матриксного состава БМ-IV, один из главных компонентов которых (коллаген IV типа) для визуализации результата был маркирован флуоресцентным красителем. Таким образом, мы предприняли попытку моделирования роста и дифференцировки клеток вдоль нарисованных полос – треков.

Во всех случаях маской (графическим цифровым прототипом) служили созданные в компьютерной программе полосы различной ширины. Полученные варианты являются результатом выбора поверхности для нанесения, способа регулирования ее гидрофильных и гидрофобных свойств и способа управления инжекторной системой. Результат фиксировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 Meta (Carl Zeiss).

После посева нейральных стволовых клеток на искусственно созданные матрицы наблюдалась активная адгезия и дифференцировка нейронов и глиальных клеток. Характерной особенностью данных культур явилось то, что дифференцирующиеся клетки располагались вдоль треков специфического матриксного полимера. Они направлены по диагонали кадров, а их медианы отстоят на 200 мкм друг от друга (рис. 2, а, б). Данный эффект наблюдался на матрицах на основе оптических стекол, содержащих упорядоченный матрикс БМ-IV. При этом направленное расположение было замечено уже на ранних стадиях культивирования в течение 2 суток (рис. 2,

а), первоначально в виде отдельных адгезированных клеток и небольших нейросфер. Затем, на 5–7-е сутки, процесс приобретал более выраженный характер, при котором большая часть формирующихся клеточных отростков располагалась вдоль треков морфогена (рис. 2, б). Данные факты позволили заключить, что БМ-IV является комфортным субстратом для нейральных стволовых клеток, и при длительном культивировании в контекстзависимой форме достаточно эффективно стимулирует их дифференцировку как в нейрональном, так и в глиальном направлениях. Возможность дифференцировки клеток в данных условиях с преобладанием одного из направлений продемонстрирована на рис. 2, в и г.

Для сравнения анализировали контрольную культуру, выращенную на обычном культуральном пластике. При отсутствии дополнительных стимулов, присутствующих в созданных нами матрицах, клетки, тем не менее, также были способны к спонтанной дифференцировке и адгезии в среде с 2% эмбриональной телячьей сывороткой (рис. 2, д). При этом нет какой-либо выраженной направленности данных процессов и, кроме того, дифференцировка и адгезия в контрольных случаях существенно запаздывали, примерно на 2–3 дня по сравнению с опытными образцами. Обращал на себя внимание и тот факт, что делящихся клеток было гораздо больше в контрольной культуре, где чаще наблюдалось формирование нейросфер, описываемых в литературе как показатель сохранения делящихся стволовых клеток в нейральной культуре. Этот факт подтверждает наши выводы о нейроиндукторных свойствах БМ-IV.

Другой частью эксперимента было использование комплексных матриц, в которых в качестве базовых матриксных материалов использовались полисахаридные композиции, содержащие уроновые кислоты (МПК-1, МПК-2 и МПК-3), поверх которых был прецизионно нанесен компонент БМ-IV. На данных матрицах мы не обнаружили признаков дифференцировки клеток. На рис. 2, е представлены результаты культивирования нейральных стволовых клеток на матрицах такого типа с подлежащим компонентом МПК-2. Однако обращал на себя внимание факт

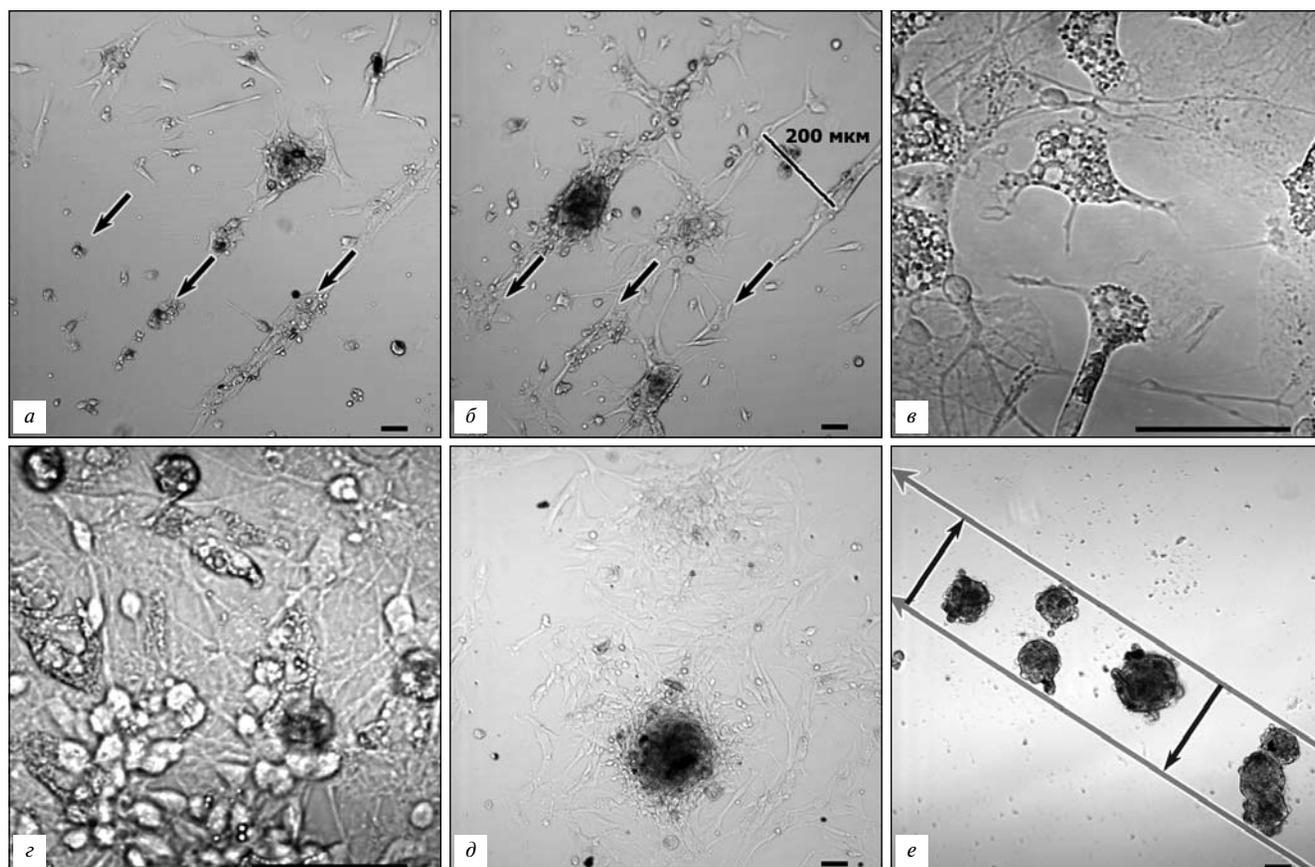


Рис. 2. Результат взаимодействия нейральных стволовых клеток с матричными материалами разных типов:

a, б – этапы формирования треков направленного роста и дифференцировки клеток на микроструктурированных матрицах (на 2-е и 7-е сутки культивирования соответственно); *в* – типичный вид результата дифференцировки культуры с преобладанием нейронов над глиальными элементами; *г* – типичный вид результата дифференцировки культуры с преобладанием глиальных клеток над нейронами; *д* – типичный вид спонтанно дифференцирующихся клеток в контрольных лунках на полистироле; *е* – ингибирование дифференцировки с помощью композиции МПК-2 в сочетании с направленной локализацией клеточных ассоциаций вдоль треков матрицы.

умеренной адгезии конгломератов недифференцированных клеток вдоль матричных треков. Это свидетельствует об ингибирующей дифференцировку способности МПК-субстратов и их неспособности ингибировать ориентацию конгломератов вдоль треков компонента БМ-IV, а также умеренную контактную реакцию данных клеток с исследуемой поверхностью.

Обсуждение полученных данных. Одним из наиболее распространенных способов изготовления микроструктурированных матриц для направленного роста и дифференцировки клеток является литографический подход, применяемый в электронной промышленности при производстве печатных плат. Первым вариантом в литографии был метод фотолитографии, напоминающий технологию фотографии высокого разрешения, опосредованно контролирующей место, где будет возможна адсорбция наносимых молекул на стекле или кремнийорганических материалах. Ему на смену пришли методы мягкой литографии на основе эластомерных (резиновых) штампов, относительно легкие в применении. С их помощью можно контактно печатать определенные рисунки или, подключая методики наподобие

микрофлюидных каналов, создавать мозаики, обеспечивать градиенты концентраций веществ [2, 12]. Многоуровневые штампы и их аналоги позволяют расширить возможности методики и сделать ее более гибкой [11]. Мягкая литография была также применена для создания матричных систем, близких к трехмерным: при формировании гидрогеля из коллагена I типа или других веществ между стеклом и штампом, покрытым противoadгезивным для геля веществом, возможно формирование сложно упорядоченной поверхности гидрогеля. При использовании деградирующих штампов, созданных из парафина, матригеля и других веществ, возможно и внутреннее, истинно трехмерное моделирование матрикса [10].

Технология литографии имеет ряд очевидных недостатков: прежде всего это ограниченность возможностей индивидуальных штампов. Разрешение, достигаемое литографическими процедурами, часто недостаточно высоко, особенно при трехмерном упорядочивании (не более 100 мкм). Кроме того, контакт штампа с поверхностью биоматериала является нежелательным, но он технически необходим в процедуре. Использование дополнительных антиад-

гезивных препаратов также настораживает исследователей [4, 9].

По меньшей мере, части этих недостатков лишена технология инжекторного нанесения биоматриксных компонентов. Суть методики заключается в печати биоматериалов посредством цветного струйного принтера или с помощью специально сконструированных инжекторных установок. В зависимости от аппарата и особенностей технологического подхода метод позволяет получать в среднем разрешение около 75 мкм [9]. Возможность упорядочивать компоненты биоматериала с высокой точностью и создавать градиенты, а также легкость в создании рисунка любой сложности являются достоинствами описанной методики.

В настоящей работе мы представили результаты, демонстрирующие создание матриксных материалов с упорядоченными индукторными компонентами с помощью специализированной инжекторной установки с точным позиционированием образца.

Созданные посредством инжекторного нанесения материалы позволяют пространственно разделять биокомпоненты материала, причем не только вещества, но и популяции клеток. Печать структурированного геля, иммобилизующего субпопуляции клеток, позволит создавать гетерогенные слои. Так, послойно можно создавать тканевые аналоги. При описанном подходе снижается акцент на разрешении, но вопросы создания градиентов требуют специализированных решений. Относительно невысокая скорость формирования таких конструкций, очевидно, не является преимуществом методики [5].

Структурировать двух- и трехмерный биоматериал с клеточными популяциями позволяет также технология лазерно-контролируемого письма, при которой клетки внедряются в нужную позицию посредством захвата и проведения лазерным лучом. Методика позволяет позиционировать даже отдельные клетки, но, по-видимому, имеет ограничения в структурировании на молекулярном уровне [4, 7].

Те или иные модификации каждой из технологий имеют как достоинства, так и недостатки, однако уже сейчас предоставляют огромные возможности для исследований фундаментальных аспектов гистогенеза и позволяют разрабатывать многокомпонентные сложноустроенные матриксные материалы, перспективные для решения задач практической медицины.

Работы коллектива были поддержаны в рамках программы фундаментальных исследований президиума РАН № 27 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» (грант 09-1-П27-10), государственными контрактами с Роснаукой № 02.740.11.0292 и № 02.740.11.0450.

Литература

1. Bradford M. M. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Prin-*

- inciple of Protein-Dye Binding // Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
2. Dike L., Chen C., Mrksich M. et al. *Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates in vitro // Cell Devel. Biol. – Animal.* 1999. No. 25. P. 441–448.
3. Laemmli U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.* 1970. Vol. 227, No. 5259. P. 680–685.
4. Nahmias Y., Schwartz R.E., Verfaillie C.M. et al. *Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering // Biotechnol. Bioeng.* 2005. Vol. 92, No. 2. P. 129–136.
5. Nelson C.M., Tien J. *Microstructured extracellular matrices in tissue engineering and development // Current Opinion in Biotechnology.* 2006. No. 17. P. 518–523.
6. Nisbet D.R., Crompton K.E., Horne M.K. et al. *Neural tissue engineering of the CNS using hydrogels // Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials.* 2008. No. 87B. P. 251–263.
7. Odde D.J., Renn M.J. *Laser-guided direct writing of living cells // Biotechnol. Bioeng.* 2000. Vol. 67, No. 3. P. 312–318.
8. Perris R., Syfrig J., Paulsson M., Bronnerfraser M. *Molecular Mechanisms of Neural Crest Cell Attachment and Migration on Type-I and Type-Iv Collagen // Journal of Cell Science.* 1993. Vol. 106. P. 1357–1368.
9. Phillippi J.A., Miller E., Weiss L. et al. *Microenvironments engineered by inkjet bioprinting spatially direct adult stem cells toward muscle- and bone-like subpopulations // Stem Cells.* 2008. No. 26. P. 127–134.
10. Tang M.D., Golden A.P., Tien J. *Molding of three-dimensional microstructures of gels // J. Am. Chem. Soc.* 2003. No. 125. P. 12988–12989.
11. Tien J., Nelson C.M., Chen C.S. *Fabrication of aligned microstructures with a single elastomeric stamp // PNAS.* 2002. Vol. 99, No. 4. P. 1758–1762.
12. Whitesides G.M., Ostuni E., Takayama S. *Soft lithography in biology and biochemistry // Annu. Rev. Biomed.* 2001. No. 3. P. 335–373.
13. Ytzhaki R.F., Gill D.M. *A micro-biuret method for estimating proteins // Analyt. Biochem.* 1964. Vol. 9. P. 401–407.

Поступила в редакцию 20.01.2010.

REGULATION OF NEUTRAL STEM CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION USING MICROSTRUCTURED NANO-HETEROGENOUS MATRIX MATERIALS

V.V. Kumeiko^{1,2}, Yu.S. Khotimchenko¹, A.A. Astakhova¹, A.V. Scheblyikina¹, N.E. Zyumchenko¹, N.P. Tokmakova², A.A. Anisimova², S.I. Titov², E.V. Demidenko¹, A.A. Boreiko¹, I.V. Dyuzhen¹, I.A. Kirsanova², A.P. Anisimov²

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 present results of studies devoted to the development of microstructured nano-heterogenous matrix materials that ensure regulation of cell growth and differentiation to create artificial tissue implants based upon cell bio-polymer constructions. To create microstructured matrixes, the authors have used original bio-polymer compounds of protein and carbohydrate origin modified and positioned in the compound via multiport injection spraying unit. Using neutral stem cell cultures allows demonstrating the capability of one matrix types to induce directed cell growth and differentiation along the composition tracks, and of other matrix types – to inhibit differentiation with cell congregation positioning.

Key words: stem cells, reproduction and differentiation, extracellular matrix, biopolymers.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 2, p. 26–31.