

8. Nguyen V. H., Talarico E. F., Jr. A morphometric anatomical study of the right coronary artery in Vietnamese. *Eur. J. Anat.* 2019;23(5):341-353.
9. Fazliogullari Z., Karabulut A. K., Kayrak M., Kayrak M., Uysal I. I. [et al.]. Investigation and review of myocardial bridges in adult cadaver hearts and angiographs. *Surg. Radiol. Anat.* 2010;32:437-445. <https://doi.org/10.1007/s00276-009-0590-z>
10. Teofilovski-Parapid G., Jankovic R., Kanjuh V., Virmani R., Danchinf N. [et al.]. Myocardial bridges, neither rare nor isolated – Autopsy study. *Ann. Anat.* 2017;210:25-31. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.09.007>
11. Micić-Labudović J., Atanasijević T., Popović V., Mihailović Z., Nikolić S. [et al.]. Myocardial Bridges: A Prospective Forensic Autopsy Study. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 2015;143(3-4):53-157. <https://doi.org/10.2298/sarh1504153m>
12. Каган И. И., Тютюнникова Н. Н. Мышечные мостики и петли как составная часть топографии венечных артерий сердца и их ветвей. *Морфология.* 2017;152(4):27-31. [Kagan I. I., Tyutyunnikova N. N. Myshechnye mostiki i petli kak sostavnaya chast' topografii venechnykh arteriy serdtsa i ikh vetvey. *Morfologiya. – Morphology.* 2017;152(4):27-31 (In Russ.)].

Поступила 20.10.2020

**Сведения об авторе**

Дмитриева Евгения Германовна, аспирант кафедры анатомии человека; тел.: 89533868514; e-mail: anmayak@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.717.3:021.2

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17020>

ISSN – 2073-8137

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОЛЛАГЕН-СОДЕРЖАЩИХ ГЕЛЕЙ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ БИОМАТЕРИАЛОВ**А. А. Долгалев<sup>1</sup>, Е. М. Бойко<sup>1</sup>, Д. В. Бобрышев<sup>1</sup>, Н. Н. Диденко<sup>1</sup>, Ю. А. Глумскова<sup>2</sup><sup>1</sup> Ставропольский государственный медицинский университет, Российская Федерация<sup>2</sup> ООО «Кардиоплант», Пенза, Российская Федерация**EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF COLLAGEN-CONTAINING GELS ON EXPERIMENTAL SAMPLES OF BIOMATERIALS**Dolgalev A. A.<sup>1</sup>, Boyko E. M.<sup>1</sup>, Bobryshev D. V.<sup>1</sup>, Didenko N. N.<sup>1</sup>, Glumskova Yu. A.<sup>2</sup><sup>1</sup> Stavropol State Medical University, Russian Federation<sup>2</sup> «Cardioplant» Ltd., Penza, Russian Federation

Проведена оценка цитотоксичности, пролиферативной активности и динамики численности клеточных культур при использовании опытных образцов геля из перикарда крупного рогатого скота и подслизистой тонкого кишечника свиньи. Образцы не обладают цитотоксичностью, не препятствуют митотической активности и приросту количества мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека. Полученные данные дают основание проводить исследования эффективности и безопасности изделий в экспериментах *in vivo* на лабораторных животных.

*Ключевые слова:* коллагеновый гель, внеклеточный матрикс, имплантация

Cytotoxicity, proliferative activity and the dynamics of the number of cell cultures were evaluated using experimental gel samples from the pericardium of cattle and the submucosa of the small intestine of pigs. The samples do not have cytotoxicity, do not interfere with mitotic activity and the increase in the number of human bone marrow mesenchymal stromal cells. The obtained data provide a basis for conducting *in vivo* studies of the products effectiveness and safety on laboratory animals.

*Keywords:* collagen gel, extracellular matrix, implantation

**Для цитирования:** Долгалев А. А., Бойко Е. М., Бобрышев Д. В., Диденко Н. Н., Глумскова Ю. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОЛЛАГЕН-СОДЕРЖАЩИХ ГЕЛЕЙ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ БИОМАТЕРИАЛОВ. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2022;17(1):74-76. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17020>

**For citation:** Dolgalev A. A., Boyko E. M., Bobryshev D. V., Didenko N. N., Glumskova Yu. A. EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF COLLAGEN-CONTAINING GELS ON EXPERIMENTAL SAMPLES OF BIOMATERIALS. *Medical News of North Caucasus.* 2022;17(1):74-76. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17020> (In Russ.)

ВКМ – внеклеточный матрикс  
КРС – крупный рогатый скот

МСК-КМ – мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека

ПТК – подслизистая тонкого кишечника

**С**огласно современным представлениям, коллаген является важнейшим компонентом экстрацеллюлярного (внеклеточного) матрикса (ВКМ), который играет важнейшую роль в обеспечении механической прочности, упругости соединительных тканей, а также поддерживает рост и дифференцировку клеток [1, 2]. Активное развитие различных направлений регенерации костно-хрящевой ткани способствовало появлению новых коллагеновых продуктов, среди которых особое место занимают гидрогели [3].

Возможным источником сырья для изготовления ВКМ являются перикард крупного рогатого скота (КРС) и подслизистая тонкого кишечника (ПТК) свиньи. Оба материала являются соединительной тканью и состоят в основном из коллагена, однако имеют отличное друг от друга строение и биохимический состав. Перикард обладает более утолщённой структурой, нежели подслизистая, и дольше замещается тканями реципиента. Изделия из них обладают высокой степенью биосовместимости и предрасположенности к адгезии, пролиферации, миграции и связыванию клеток. В сухом виде ВКМ имеет вид порошкообразного вещества, способного впитывать и удерживать влагу, масса которой в 20 раз больше массы исходного материала, что позволяет придать гелю нужное консистентное состояние.

Цель исследования – изучение цитотоксичности экспериментальных образцов биоматериалов с оценкой пролиферативной активности клеток, культивируемых на образцах биоматериалов *in vitro*.

**Материал и методы.** Объектами исследования явились следующие материалы для направленной тканевой регенерации: 1-й опытный образец – ВКМ-гель из перикарда КРС; 2-й опытный образец – ВКМ-гель из ПТК свиньи. Контролем служила чистая посуда из культурального пластика.

По результатам тестов оценивалась цитотоксичность материалов по параметрам: жизнеспособности, пролиферативной активности клеточных культур через 24 часа и 96 часов после начала культивирования клеток на экспериментальных образцах, а также динамики их численности каждые 24 часа в течение недели с помощью методик, ранее описанных при проведении исследования с бесклеточными многослойными лиофилизированными мембранами [4].

В работе использовали мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека (МСК-КМ). Клетки культивировали в среде «alfa MEM» (Sigma-Aldrich, США) с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (Gibco, США), 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США), при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Смену питательной среды осуществляли каждые 2–3 дня. Клетки культивировали до достижения 70–80 % конfluence. В экспериментах использовали клетки 1–4 пассажей.

**Результаты и обсуждение.** Анализ жизнеспособности (определение количества живых и погибших клеток) с использованием проточного цитометра «Accuri C6» (BD Bioscience, USA), окрашивания флуоресцентными красителями кальцеином АМ и йодидом пропидия (Sigma-Aldrich, США) показал, что количество погибших клеток на опытных образцах достоверно не отличалось от количества погибших клеток при культивировании на культуральной посуде (спонтанная клеточная гибель). Через 24 часа культивирования доля погибших клеток составила 2 %, 4 % и 6 % в контроле, при использовании перикарда КРС и ПТК свиньи соответственно. Через 96 часов таких клеток было соответственно 2 %, 1 % и 1 %. Получен-

ные данные свидетельствуют об отсутствии негативного влияния исследуемых материалов на жизнеспособность МСК-КМ.

При определении митотической активности клеток с использованием прижизненного окрашивания флуоресцентным ядерным красителем «Hoechst 33342» (Sigma-Aldrich, США) митотические клетки выявляли по распределению хроматина, характерному для профазы, метафазы, анафазы и телофазы с помощью флуоресцентного микроскопа «DM 6000» (Leica, Германия). Для анализа подсчитывали не менее 500 клеток. Митотический индекс (MI) вычисляли по формуле  $MI = (P+M+A+T)/N \times 100 \%$ , где (P+M+A+T) – сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы, N – общее число проанализированных клеток. Митотическая активность МСК-КМ, культивируемых на опытных образцах, практически не отличалась от контрольных значений: MI через 24 часа роста клеточной культуры в контроле составил 5,2, для перикарда КРС и ПТК свиньи – 4,0 и 4,1 соответственно. Через 96 часов MI составил 2,4, 2,0 и 2,16, что свидетельствует об отсутствии значимого влияния исследуемых ВКМ-гелей на пролиферацию клеток.

При оценке динамики численности клеток, культивируемых на образцах, и подсчете их числа с помощью автоматического счетчика «Countess» (Invitrogen, США) после открепления с помощью коктейля «Accutase» (Sigma-Aldrich, США) и окрашивания 0,4 % раствором трипанового синего была показана более низкая, в сравнении с контролем, численность МСК-КМ, культивируемых на опытных образцах ВКМ-гелей. Тем не менее лог-фаза роста культуры была однотипной во всех группах и завершилась к 96 часам культивирования. Число клеток на четвертые сутки составило  $6,4 \times 10^4 / \text{см}^2$  в контроле,  $3,8 \times 10^4 / \text{см}^2$  при культивировании на ВКМ-геле из перикарда КРС и  $3,9 \times 10^4 / \text{см}^2$  – из ПТК свиньи. С учётом описанного выше отсутствия влияния гелей на жизнеспособность и митотическую активность клеток можно предположить, что уменьшение числа МСК-КМ связано не с негативным эффектом экспериментального материала, но с более высокой адгезией клеток к нему в сравнении с культуральным пластиком, что затруднило открепление клеток с поверхности исследуемых образцов.

**Заключение.** По результатам исследования показано, что опытные образцы геля из перикарда КРС и ПТК свиньи не обладают цитотоксичностью – не влияют на жизнеспособность, не препятствуют митотической активности и приросту количества МСК-КМ. Полученные данные дают основание проводить исследования эффективности и безопасности изделий в экспериментах *in vivo* на лабораторных животных.

**Финансирование.** Научно-исследовательская работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации на научные исследования и разработки по теме «Разработка материала на основе внеклеточного коллагенового матрикса, содержащего экзосомы, для индукции процессов регенерации костно-хрящевых структур млекопитающих», НИОКТР № 121031700342-8.

**Информированное согласие.** Клетки костного мозга были получены путем пункционной аспирации в ходе стерильной пункции от здоровых доноров с их добровольного согласия. Забор проводился в МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

**Литература/References**

1. Kirkness M. W., Lehmann K., Forde N. R. Mechanics and structural stability of the collagen triple helix. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019;53:98-105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.08.001>
2. Tang V. W. Collagen, stiffness, and adhesion: the evolutionary basis of vertebrate mechanobiology. *Mol. Biol. Cell.* 2020;31(17):1823-1834. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-12-0709>
3. Avendano A., Chang J. J., Cortes-Medina M. G., Seibel A. J., Admasu B. R. [et al.]. Integrated Biophysical Characterization of Fibrillar Collagen-Based Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020;6(3):1408-1417. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01873>
4. Долгалев А. А., Венедиктов А. А., Бобрышев Д. В., Кручинина А. Д., Чагаров А. А. [и др.]. Исследование биосовместимости материала на основе подслизистой оболочки тонкой кишки в тестах in vitro и in vivo. *Гены и Клетки.* 2019;14(2):47-51. [Dolgalev A. A., Venediktov A. A., Bobryshev D. V., Kruchinina A. D., Chagarov A. A. [et al.]. Study of biocompatibility of the material based on small intestinal submucosa in tests in vitro and in vivo. *Geni i Kletki.* – *Genes and Cells.* 2019;14(2):47-51. (In Russ).] <https://doi.org/10.23868/201906018>

Поступила 05.10.2021

**Сведения об авторах:**

Долгалев Александр Александрович, доктор медицинских наук, доцент, начальник центра инноваций и трансфера технологий, профессор кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии; тел.: 89624404861; e-mail: [dolgalev@dolgalev.pro](mailto:dolgalev@dolgalev.pro); <https://orcid.org/0000-0002-6352-6750>

Бойко Евгений Михайлович, кандидат медицинских наук, преподаватель; тел.: 89188664905; e-mail: [evgedentzub@yandex.ru](mailto:evgedentzub@yandex.ru); <https://orcid.org/0000-0002-1827-8487>

Бобрышев Дмитрий Викторович, кандидат медицинских наук, начальник центра персонализированной медицины; тел.: 88652357369; e-mail: [bobryshevrg@ya.ru](mailto:bobryshevrg@ya.ru); <https://orcid.org/0000-0002-3947-4786>

Диденко Николай Николаевич, ассистент кафедры патологической физиологии; тел.: 88652352684; e-mail: [patphysiology@stgmu.ru](mailto:patphysiology@stgmu.ru); <https://orcid.org/0000-0001-9734-8158>

Глумскова Юлия Александровна, старший инженер-исследователь; тел.: 89656315045; e-mail: [y\\_glumskova@mail.ru](mailto:y_glumskova@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-4082-7892>

© Коллектив авторов, 2022

УДК 617.713:616.833:57.086

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17021>

ISSN – 2073-8137

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА КАК РАННЕГО МАРКЕРА СЕНСОРНОЙ НЕЙРОПАТИИ У БОЛЬНЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

В. Г. Оsepьянц<sup>1</sup>, С. М. Карпов<sup>2</sup>, Г. А. Санеева<sup>2</sup>, Н. Л. Чередниченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Городская клиническая консультативно-диагностическая поликлиника, Ставрополь, Российская Федерация

<sup>2</sup> Ставропольский государственный медицинский университет, Российская Федерация

## USE OF CONFOCAL MICROSCOPY OF THE CORNEA AS AN EARLY MARKER OF SENSORY NEUROPATHY IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

Osep'yants V. G.<sup>1</sup>, Karpov S. M.<sup>2</sup>, Saneeva G. A.<sup>2</sup>, Cherednichenko N. L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> City Clinical Consultative and Diagnostic Polyclinic, Stavropol, Russian Federation

<sup>2</sup> Stavropol State Medical University, Russian Federation

С использованием конфокальной микроскопии роговицы глаза (КМРГ) исследована распространенность дистальной полинейропатии и проведена оценка связи между выраженностью ее проявлений и степенью нарушения углеводного обмена у 41 пациента с ожирением, преддиабетическими дисгликемиями и сахарным диабетом (СД) 2 типа. Достоверно часто установлены отклонения от нормы коэффициентов анизометропии и асимметрии, прямо коррелирующие с показателями гликемии. Сопоставимые значения коэффициента асимметрии у больных с СД 2 типа и преддиабетом позволяют рассматривать его в качестве предиктора возникновения или раннего маркера дисметаболической полинейропатии.

*Ключевые слова:* нейропатия, метаболический синдром, конфокальная микроскопия роговицы глаза