

## ФОРМА "Т". ТИТУЛЬНАЯ СТРАНИЦА ЗАЯВКИ

<b>НАЗВАНИЕ ПРОЕКТА</b> Разработка новых тканеинженерных комплексов для оптимальной регенерации трофических язв при сахарном диабете с включением культивированных разными методами аутологичных фибробластов.		<b>НОМЕР ПРОЕКТА</b> 0196	
<b>ОБЛАСТЬ ЗНАНИЯ</b> 04		<b>КОД КЛАССИФИКАТОРА</b> 04-350, 04-260	
<b>ВИД КОНКУРСА ЭСТАФЕТА ВУЗОВСКОЙ НАУКИ:</b> инициативные			
<b>ФАМИЛИЯ, ИМЯ, ОТЧЕСТВО РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА</b> Шаповалова Елена Юрьевна		<b>ТЕЛЕФОН РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА</b> +79787657196	
<b>ПОЛНОЕ НАЗВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ, предоставляющей условия для выполнения работ по Проекту физическим лицам</b> Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского»			
<b>ЗАПРАШИВАЕМЫЙ ОБЪЕМ ФИНАНСИРОВАНИЯ на 2015 г. (руб.)</b>		<b>ГОД НАЧАЛА ПРОЕКТА</b>	<b>ГОД ОКОНЧАНИЯ ПРОЕКТА</b>
500000		2015	2017
<b>ЧИСЛО ЧЛЕНОВ НАУЧНОГО КОЛЛЕКТИВА (включая руководителя)</b>	<b>ЧИСЛО ЧЛЕНОВ НАУЧНОГО КОЛЛЕКТИВА, ИМЕЮЩИХ УЧЕНУЮ СТЕПЕНЬ</b>	<b>ЧИСЛО МОЛОДЫХ ЧЛЕНОВ НАУЧНОГО КОЛЛЕКТИВА (до 35 лет включительно)</b>	
4	4	2	
Ильченко Федор Николаевич Барановский Юрий Геннадиевич Бойко Татьяна Анатольевна			
<b>ПОДПИСЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА – руководителя коллектива</b> 		<b>ДАТА</b> 13.10.2014	

## **Форма 1. Данные о проекте**

- 1.0.1. Номер проекта**  
0196
- 1.0.2. Руководитель проекта**  
Шаповалова Елена Юрьевна
- 1.1.1. Название проекта** (на русском языке, с прописной буквы, строчными буквами)  
Разработка новых тканеинженерных комплексов для оптимальной регенерации трофических язв при сахарном диабете с включением культивированных разными методами аутологичных фибробластов.
- 1.1.2. Название проекта** (на английском языке)  
Development of new tissue-engineered complexes for optimal regeneration of trophic ulcers in diabetes mellitus with the inclusion of cultivated different methods of autologous fibroblasts.
- 1.2.1. Вид конкурса**  
ЭСТАФЕТА ВУЗОВСКОЙ НАУКИ: инициативные
- 1.2.2. Область знания** (только один цифровой код)  
04
- 1.3.1. Научная дисциплина – основной код** (по классификатору 2014 года)  
04-350 Молекулярная и клеточная медицина
- 1.3.2. Научная дисциплина – дополнительные коды** (по классификатору 2014 года, через пробел)  
04-260 Молекулярная и клеточная биология. Биоинформатика
- 1.4. Ключевые слова** (указываются отдельные слова и словосочетания, наиболее полно отражающие содержание проекта; не более 15, строчными буквами, через запятые)  
Клеточные технологии, регенеративная медицина, биоинженерные конструкции, иммунофлуоресценция, иммуногистохимия, лектиногистохимия, гистология, эмбриогенез человека
- 1.5. Аннотация** (не более 0,5 стр.)  
Предлагается создание новых тканеинженерных комплексов на базе забора аутологичных дермальных фибробластов у мышей с ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета I типа, дальнейшее их размножение в клеточной культуре при различных условиях культивации, высев этих клеток на нетканые каркасы из коллагена I и III типа, коллагеновой губки, фибрина или биodeградирующего синтетического скаффолда. Такой аутодермальный эквивалент будет трансплантирован в трофическую язву. Для поддержки терапевтического эффекта будут использованы местные инъекции эритропоэтина или взвеси культивированных аутофибробластов. Будет разработан оптимальный алгоритм создания аутологичной биоинженерной конструкции для регенерации язв в условиях ишемии в условиях сахарного диабета I типа.
- 1.6. Количество членов научного коллектива** (цифрой)  
4
- 1.7. Сроки выполнения** (год начала – год окончания)  
2015 - 2017
- 1.8. Запрашиваемый объем финансирования на 2015 год** (в руб. – цифрами, без пробелов, точек и запятых)  
500000

Подпись руководителя проекта \_\_\_\_\_



**Форма 2-Р. Данные о физическом лице, подавшем Заявку на Конкурс – руководителе проекта**

- 2.1.1.1. Фамилия**  
Шаповалова
- 2.1.1.2. Имя**  
Елена
- 2.1.1.3. Отчество**  
Юрьевна
- 2.1.2.1. Фамилия (на английском языке)**  
Sharovalova
- 2.1.2.2. Имя (на английском языке)**  
Elena
- 2.1.2.3. Отчество (на английском языке)**  
Yurievna
- 2.2.1. Дата рождения**  
23.03.1958
- 2.2.2. Пол (указать цифрой: 1 – мужской; 2 – женский)**  
2
- 2.3.1. Ученая степень (сокращенное название)**  
доктор медицинских наук
- 2.3.2. Год присуждения ученой степени**  
2003
- 2.4.1. Ученое звание (сокращенное название)**  
профессор
- 2.4.2. Год присвоения ученого звания**  
2005
- 2.5.1. Полное название организации – основного места работы**  
Государственное учреждение «Крымский государственный  
медицинский университет имени С.И. Георгиевского »
- 2.5.2. Сокращенное название организации – основного места работы**  
ГУ КГМУ
- 2.6. Должность по основному месту работы**  
зав. каф.
- 2.7.1. Область научных интересов (ключевые слова, не более 15, строчными буквами, через запятые)**
- 2.7.2. Область научных интересов (коды по классификатору 2013 года)**  
04-350

- 2.8.       Общее число публикаций** (исключая тезисы докладов)  
175
- 2.9.       Телефон для связи**  
0505659465
- 2.10.      Электронный адрес** shapovalova\_l@mail.ru
- 2.11.      Участие в Проекте** - Р – Руководитель проекта, поданного на Конкурс  
Р
- 2.12.      Образование**  
Высшее
- 2.13.      Индекс Хирша**  
2

**Форма 2-И. Данные о физическом лице, подавшем Заявку на Конкурс – члене коллектива**

- 2.1.1.1. Фамилия**  
Барановский
- 2.1.1.2. Имя**  
Юрий
- 2.1.1.3. Отчество**  
Геннадиевич
- 2.1.2.1. Фамилия (на английском языке)**  
Baranovskiy
- 2.1.2.2. Имя (на английском языке)**  
Yuriy
- 2.1.2.3. Отчество (на английском языке)**  
Gennadievich
- 2.2.1. Дата рождения**  
21.11.1982
- 2.2.2. Пол (указать цифрой: 1 – мужской; 2 – женский)**  
1
- 2.3.1. Ученая степень (сокращенное название)**  
кандидат медицинских наук
- 2.3.2. Год присуждения ученой степени**  
2012
- 2.4.1. Ученое звание (сокращенное название)**  
без ученого звания
- 2.4.2. Год присвоения ученого звания**
- 2.5.1. Полное название организации – основного места работы**  
Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского »
- 2.5.2. Сокращенное название организации – основного места работы**  
ГУ КГМУ
- 2.6. Должность по основному месту работы**  
ассистент
- 2.7.1. Область научных интересов (ключевые слова, не более 15, строчными буквами, через запятые)**
- 2.7.2. Область научных интересов (коды по классификатору 2013 года)**  
04-350

- 2.8. Общее число публикаций** (исключая тезисы докладов)  
25
- 2.9. Телефон для связи**  
+79787196605
- 2.10. Электронный адрес**  
baranovskiy\_yura@mail.ru
- 2.11. Участие в Проекте - И** – член коллектива, подавшего заявку на Конкурс  
И
- 2.12. Образование**  
Высшее
- 2.13. Индекс Хирша**  
1

**Форма 2-И. Данные о физическом лице, подавшем Заявку на Конкурс – члене коллектива**

- 2.1.1.1. Фамилия**  
Ильченко
- 2.1.1.2. Имя**  
Федор
- 2.1.1.3. Отчество**  
Николаевич
- 2.1.2.1. Фамилия** (на английском языке)  
Ishchenko
- 2.1.2.2. Имя** (на английском языке)  
Fedor
- 2.1.2.3. Отчество** (на английском языке)  
Nikolayevich
- 2.2.1. Дата рождения**  
02.11.1952
- 2.2.2. Пол** (указать цифрой: **1** – мужской; **2** – женский)  
1
- 2.3.1. Ученая степень** (сокращенное название)  
доктор медицинских наук
- 2.3.2. Год присуждения ученой степени**  
2007
- 2.4.1. Ученое звание** (сокращенное название)  
профессор
- 2.4.2. Год присвоения ученого звания**  
2008
- 2.5.1. Полное название организации – основного места работы**  
Государственное учреждение «Крымский государственный  
медицинский университет имени С.И. Георгиевского »
- 2.5.2. Сокращенное название организации – основного места работы**  
ГУ КГМУ
- 2.6. Должность по основному месту**  
зав. каф.
- 2.7.1. Область научных интересов** (ключевые слова, не более 15, строчными  
буквами, через запятые)
- 2.7.2. Область научных интересов** (коды по классификатору 2013 года)  
04-350

- 2.8.       Общее число публикаций** (исключая тезисы докладов)  
**173**
- 2.9.       Телефон для связи**  
+79787057684
- 2.10.      Электронный    адрес**  
ilchenko5252@mail.ru
- 2.11.      Участие в Проекте - И** – член коллектива, подавшего заявку на Конкурс  
**И**
- 2.12.      Образование**  
**Высшее**
- 2.13.      Индекс Хирша**  
**3**



**Форма 2-И. Данные о физическом лице, подавшем Заявку на Конкурс – члене коллектива**

- 2.1.1.1. Фамилия**  
Бойко
- 2.1.1.2. Имя**  
Татьяна
- 2.1.1.3. Отчество**  
Анатольевна
- 2.1.2.1. Фамилия** (на английском языке)  
Boyko
- 2.1.2.2. Имя** (на английском языке)  
Tatyana
- 2.1.2.3. Отчество** (на английском языке)  
Anatolievna
- 2.2.1. Дата рождения**  
28.08.1981
- 2.2.2. Пол** (указать цифрой: **1** – мужской; **2** – женский)  
2
- 2.3.1. Ученая степень** (сокращенное название)  
кандидат медицинских наук
- 2.3.2. Год присуждения ученой степени**  
2011
- 2.4.1. Ученое звание** (сокращенное название)  
без ученого звания
- 2.4.2. Год присвоения ученого звания**
- 2.5.1. Полное название организации – основного места работы**  
Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского »
- 2.5.2. Сокращенное название организации – основного места работы**  
ГУ КГМУ
- 2.6. Должность** по основному месту работы доц.
- 2.7.1. Область научных интересов** (ключевые слова, не более 15, строчными буквами, через запятые)
- 2.7.2. Область научных интересов** (коды по классификатору 2013 года)  
04-350

- 2.8.       Общее число публикаций** (исключая тезисы докладов)  
26
- 2.9.       Телефон для связи**  
+79787198488
- 2.10.      Электронный адрес**  
tatyana\_boyko\_5@mail.ru
- 2.11.      Участие в Проекте - И** – член коллектива, подавшего заявку на Конкурс  
И
- 2.12.      Образование**  
Высшее

**Форма 3. Сведения об Организации, предоставляющей условия для выполнения работ по Проекту, в случае получения гранта.**

- 3.1. Сокращенное название:**  
ГУ КГМУ
- 3.2.1. Полное название:**  
Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского»
- 3.2.2. Полное название на английском языке:**  
State Institution «Crimea State Medical University named by S.I. Georgievskiy »
- 3.3. Ведомственная принадлежность:**  
Прочие
- 3.4.1. Почтовый индекс:**  
295006
- 3.4.2. Почтовый адрес:**  
Бульвар Ленина 5/7
- 3.5. Город, населенный пункт:**  
Симферополь
- 3.6. Код региона:**  
82
- 3.7. Идентификационный номер налогоплательщика (ИНН):**  
не заполнено
- 3.8. № ОГРН (основной государственный регистрационный номер)**  
не заполнено

#### **Форма 4. Содержание инициативного проекта**

##### **4.1. Фундаментальная научная проблема, на решение которой направлен проект**

Сахарный диабет является острой медико-социальной проблемой, как в нашей стране, так и во всем мире. На 1.01.2012 в мире официально зарегистрировано порядка 366.000.000 больных сахарным диабетом. В России на 1.01.12, согласно государственного регистра этим заболеванием страдает 3.549.203 больных, однако по многочисленным исследованиям, их количество может достигать 10 млн. (проф. Дедов И.И., президент РАМН, 2012). Проблема определяется как исключительно быстрым ростом заболеваемости, так и высокой степенью инвалидизации больных, особенно заболевших в детском возрасте. Развитие синдром диабетической стопы является не редким осложнением сахарного диабета. Синдром диабетической стопы- патологическое состояние стопы при сахарном диабете, возникающее на фоне поражения периферических нервов, кожи и мягких тканей, что рано или поздно приводит к трофическими нарушениями кожных покровов – трофическими язвами. Диабетические язвы стоп характеризуются хроническим течением в связи с рядом проблем, нарушающих процесс регенерации. Одним из перспективных направлений современной медицины является регенеративная медицина, которая решает проблему улучшения продолжительности и качества жизни человека за счет восстановления утраченных структур и функций органов и тканей. Тканевая инженерия призвана решить многие задачи регенеративной медицины. Известно, что при таком заболевании, как незаживающие или трофические язвы, собственного регенеративного потенциала часто оказывается недостаточно. В этих случаях перспективным способом лечения и восстановлением тканей может быть применение новых клеточных технологий. Поэтому одной из актуальных задач клеточной биологии и медицины является разработка эффективных и безопасных методик выделения, наращивания и подготовки ключевых клеток регенерации – аутологичных фибробластов к трансплантации. Основным достоинством применения аутологичных клеток является минимализация рисков, связанных с возможным отторжением трансплантата, активизации трансплантата против хозяина или переносом инфекции (Ткачук В.А. и др., 2012). В случае использования аутологичных фибробластов подразумевается, что: фибробласты стимулируют пролиферативную активность эпителиоцитов и обновление эпителия, выделяемые фибробластами цитокины и факторы роста вызывают приход клеток-предшественников в зону введения, вводимые клетки сохраняют способность синтезировать компоненты внеклеточного матрикса *in situ* (Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Калинина Н.И. и др., 2009). В этой связи использование аутологичных фибробластов в регенеративной медицине представляется крайне актуальным и перспективным, особенно для лечения заболеваний, для которых стандартные методы мало эффективны (Воротников А.В., Суздальцева Ю.Г. и др., 2012).

##### **4.2. Конкретная фундаментальная задача в рамках проблемы, на решение которой направлен проект** (если данная задача является дополнением к теме работ, выполняемых авторами по плану своей организации, - указать название и гос. регистрационный номер этой темы)

Существует идеальная стратегия инжиниринга тканей, которая состоит в заборе аутологичных фибробластов у экспериментального животного с ишемией нижних конечностей, дальнейшее их размножение в клеточной культуре и высев этих клеток на каркасы (Butteri D.K., Bishop E.E., 2006; Ковалев А.В., 2010). После имплантации биоинженерная конструкция, полученная при инжиниринге тканей, должна выжить, интегрироваться с окружающими тканями и восстановить структурную целостность кожи и ее функции. При реализации этой стратегии возникла проблема, связанная с гибелью в процессе интеграции значительной части клеток, что поставило под сомнение возможность развития полноценного «заместительного сценария» в регенеративной медицине. Фундаментальной задачей данного проекта является сравнительный поиск наилучших условий культивирования аутологичных фибробластов, помещения их на основные известные каркасы, трансплантации тканеинженерной конструкции в трофическую язву при венозной недостаточности в условиях невозможности успешной реваскуляризации и в сочетании с сахарным диабетом. Для решения фундаментальной задачи будут решены следующие задачи: 1. Изучить морфологические и фенотипические особенности аутологичных фибробластов, культивированных в среде DMEM с добавлением 10% бычьей сыворотки, лизата тромбоцитов и фактора роста фибробластов, в среде «Гибрис С», при изменении газовой среды (повышенное содержание углекислого газа). 2. Выявить наилучшие концентрации и условия интеграции аутологичных фибробластов с каркасами: коллагеновым гелем, коллагеновой губкой, фибриновым гелем и биodeградируемыми синтетическими скаффолдами. 3. Тестировать тканеинженерные конструкции на лабораторных животных с моделированной трофической язвой на фоне сахарного диабета первого типа. 4. Оценить влияние на заживление язвы в условиях имплантации тканеинженерной конструкции местных инъекций эритропоэтина и взвеси аутологичных

фибробластов разной концентрации.

#### **4.3. Предлагаемые методы и подходы** (с оценкой степени новизны; общий план работ на весь срок выполнения проекта)

Исследование будет выполнено на белых мышах линии C57/B1, которые содержатся в виварии КГМУ имени С.И. Георгиевского. Животные будут разделены на контрольную группу и экспериментальную группу. Во всех группах для формирования язв будет создана модель односторонней умеренной ишемии задней конечности. Для этого под лупой на бедренную артерию будут накладываться шелковые лигатуры нитью 6-0 над ее дистальной бифуркацией с сохранением n. ischiaticus и бедренной вены, затем рана будет ушита асептической иглой с шелковой нитью 4-0. В данном случае лигирование позволяет нарушить кровообращение нижележащих тканей с относительно сохраненными крупными коллатеральными, отходящими от вышележащей части бедренной артерии. Для оценки кровотока будет использована доплерография с режимом CDK. Данные будут обработаны в виде отношения кровотока в ишемизированной конечности (левая лапа) к кровотоку в интактной лапе. Измерения будут проведены после операции и перед закрытием сформировавшейся трофической язвы предлагаемыми биоинженерными конструкциями. В экспериментальной группе до операции по ишемизации конечности будет создана модель стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. Развитие диабета будет контролироваться уровнем глюкозы в крови с помощью глюкометра. Свидетельством присутствия диабета будет уровень глюкозы в крови 10-18 ммоль/л. Одновременно интраоперационно из кожи мышей экспериментальных групп будут выделены фибробласты в условиях стерильного бокса с ламинарным потоком воздуха. Кусочки кожи будут помещены в среду DMEM (Invitrogen) и измельчены сосудистыми ножницами до размера 1-2 мм. Затем к кусочкам ткани будут добавлены равные объемы растворов коллагеназы I типа (200 ед/мл, Sigma) и диспазы (30 ед/мл) (Gibco). Полученная смесь будет инкубироваться в течение 1 часа при 37<sup>0</sup> С и постоянном перемешивании. Культивация фибробластов будет в среде DMEM (Invitrogen) с добавлением 10% телячьей сыворотки и 50 ед./мл пенициллина - стрептомицина (ПанЭко) в чашках Петри в инкубаторе при 37<sup>0</sup> и концентрации CO<sub>2</sub> – 5% до достижения 100% конfluence. Для посева клеток будет использован 0,25% трипсин-0,02% ЭДТА. Для проведения экспериментов будут использованы клетки не старше третьего - четвертого пассажа. В каждой группе будет создана контрольная подгруппа. В контрольной подгруппе клетки будут пересеваться в стандартных условиях (таблица 1). Кроме того, в каждой группе будут созданы подгруппы, в которых аутологичные фибробласты, начиная со второго пассажа, будут культивироваться в различных условиях: в среде «Гибрис С» (ПанЭко), в условиях повышенного содержания (свыше 5%) углекислого газа в инкубаторе, при добавлении фактора роста фибробластов. Для оценки фибробластов в популяции культивируемых клеток фибробласты будут фиксированы ледяным ацетоном и окрашены антителами против CD 34, CD 90, CD 44, CD 105, конъюгированными с различными флуорохромами. С помощью люминисцентного микроскопа будет подсчитан и проанализирован индекс антиген - положительных клеток. Морфология фибробластов будет оценена после их двукратной промывки фосфатно-солевым буфером и фиксации в 4% формальдегиде 60 мин при комнатной температуре. Окрашивать фибробласты предполагается гематоксилином и эозином. Будет проведена адгезия фибробластов к коллагеновому гелю, состоящему из коллагена I типа, коллагеновой губке, фибринового геля и биодеградируемому синтетическому скаффолду (таблица 2). В эксперименте будут использованы коллагеновые губки, произведенные в ТОО НПП «Антиген» в соответствии со стандартом организации СТ ТОО 38661483 -023-2010. Коллагеновый гель, состоящий из коллагена I типа, будет получен стандартным методом из крысиных хвостов. В чашку Петри с фибробластами 3-4-го пассажа будет помещен исследуемый каркас. При посеве доза во всех случаях составит 20 тысяч клеток/см<sup>2</sup>. Будет оценена адгезия клеток, целостность монослоя, форма и размеры клеток, состояние цитоплазмы и структура ядра. Будет вычислена плотность клеток монослоя на единицу площади, количество поврежденных и слущенных клеток, рассчитано время удвоения культуры. Часть материала будет фиксирована 90% спиртом и окрашена гематоксилином и эозином. Биоинженерная конструкция, состоящая из фибробластов и каркаса, будет имплантирована в трофическую язву мышей со строгим соблюдением аутологичности. Инъекции клеток будут проведены в концентрации 1 млн в 1 мл раствора Версена в дно язвы и в ее края. Аналогично будут осуществлены инъекции эритропоэтина. По мере заживления язвы животные будут выведены из эксперимента (примерно на 5, 10, 14 и 30-е сутки). Кусочки тканей будут иссечены по большому диаметру раны с краями и подлежащими тканями для гистологического исследования. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм будут окрашены для обзорных препаратов гематоксилином и эозином, на коллагеновые волокна по Ван-Гизону, иммуногистохимически на присутствие коллагенов I, II, III и IV типов, макрофагов на антиген CD 68, на пролиферацию клеток на антиген Ki-67 и апоптоз клеток на антиген p53.

**4.4. Ожидаемые в конце 2015 года научные результаты** (развернутое описание с оценкой степени оригинальности; форма изложения должна дать возможность провести экспертизу результатов). Весь объем работ по заявленному проекту реально выполнить за три года, охватив при этом практическое применение полученных результатов на терапии трофических язв у человека. К концу 20145 года будет написана статья в рецензируемый журнал по результатам исследований.

Планируется выступление с докладом на Всероссийском учебно-научном совещании в г. Санкт-Петербурге

«Учение о тканях. Гистогенез и регенерация» 9-10 апреля 2015. Для контроля можно будет ознакомиться с фотографиями и микропрепаратами, которые будут созданы в процессе работы.

#### **4.5. Современное состояние исследований в данной области науки, сравнение ожидаемых результатов с мировым уровнем**

В работах, связанных с поиском оптимальных источников для клеточной терапии при восстановлении кожных покровов, существует два направления. Первыми начали разрабатываться технологии на основе использования аллогенных клеток. Их можно нарастить заранее и в нужном объеме. Но есть опасность переноса инфекций от донора, образования злокачественных новообразований и реакции отторжения аллогенного трансплантата. Наименее опасными с точки зрения злокачественных новообразований являются фибробласты. Многочисленные работы отечественных и зарубежных авторов подтверждают стабильность генома этих клеток (Колокольева Т.Д., Юрченко Е.А., 2007; Alexandrova, Shvemberg, 2005). В отечественной практике разработаны технологии применения аллогенных фибробластов для лечения обширных ожоговых ран у взрослых и детей (Саркисов и др., 1996; Алексеев и др., 1996). В ФБУН ГНЦ «Вектор» получены штаммы диплоидных фибробластов человека, которые сохраняют стабильные свойства в течение десятков пассажей (Радаева И.Ф. и др., 2012). Их предлагается использовать для лечения ран различной этиологии. Для клеточной терапии разрешена к использованию линия линейных диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека – штамм ЛЭЧ-4. За рубежом используются клеточные препараты на основе клеточных линий, способные к неограниченной пролиферации и сохраняющих диплоидный кариотип. Так, препараты аллогенных дермальных фибробластов Isolog en Therapy (Isologen, Inc) проходят 3-ю фазу клинических рандомизированных многоцентровых испытаний, или ICX-SKN (Intercytex), а также, Apligraf (Organogenesis) Griffiths M. Et al, 2004), AlloDerm (Life-Cell) (Sclafani A.P. et al, 2000) Dermagraft (Smith & Nephew) (Hansbrough, 1997), TestSkin II (Organogenesis). Основными механизмами участия аллогенных фибробластов в этих методиках считается синтез внеклеточного матрикса и факторов роста, активизирующих процессы регенерации, ангиогенеза и пролиферации собственного эпидермиса. Выяснено влияние на культивацию аллогенных фибробластов изменения газовой среды – уменьшение или увеличение концентрации кислорода (Андреева Е.Р. и др., 2009). Совсем недавно появились технологии выделения и применения собственных (аутологичных) клеток пациента (Бозо И.Я. и др., 2011; Зорин В.Л. и др. 2009). Основным достоинством применения аутологичных фибробластов является минимизация рисков, связанных с возможным отторжением трансплантата или переносом инфекции. Вместе с тем, в случае аутологичных клеток возникают сложности с получением и наращиванием клеточного материала в необходимом количестве и в нужные сроки (Сысоева В.Ю. и др., 2009; Сергеева Н.С. и др., 2013). Влияние на аутологичные фибробласты увеличения концентрации углекислого газа исследователями не рассматривалось. Поэтому разработка оптимальных условий культивации аутологичных фибробластов актуальна и практически необходима, что и является одной из задач предлагаемого проекта. Биоинженерные конструкции, называемые также дермальными эквивалентами, используются для лечения ран, ожогов и трофических язв и готовятся на основе коллагена или фибрина или скаффолдов и заключенных в них дермальных фибробластов. Каждая из приведенных основ имеет свои преимущества и недостатки. Так, коллаген I типа, полученный из сухожилий хвостов крыс, может вызвать отсроченные аллергические реакции у пациента (Юдинцева Н.М., 2009). Из такого коллагена выпускаются губки, которые наиболее эффективны при лечении трофических язв Кулакова К.В. и др., 2013). Фибрин более адекватен, т.к. это белок плазмы крови и применение такого продукта моделирует те процессы, которые происходят в условиях заживления раны. Биodeградируемые полимеры – скаффолды – выпускаются фармакологическими фирмами и находят все более широкое практическое применение (Швед Ю.А. и др., 2009). Они отвечают многим требованиям: не токсичны и не вызывают реакцию отторжения, имеют достаточно высокую адгезивную поверхность и имеют удовлетворительные механические характеристики. Культивация клеток фибробластов на таких основах одна из мало изученных проблем, которую необходимо рассмотреть в сравнительном аспекте, что и является одной из задач предлагаемого проекта. После трансплантации биоинженерной конструкции или дермального эквивалента в язву спорным остается вопрос его поддержки. Было предложено вводить в края язвы раствор гормона эритропоэтина, который стимулирует формирование эритроцитов ответственных за снабжение тканей кислородом (Bader A., 2011). Кроме того, предлагается обкалывать края язвы факторами, стимулирующими васкулогенез. Некоторые исследователи вводят дополнительно взвесь аутологичных фибробластов в ткани дна или краев язвы (Тимербулатов В.М. и др., 2009). Сравнительный анализ эффективности такой терапии не проводился.

#### **4.6. Имеющийся у коллектива научный задел по предлагаемому проекту: полученные ранее результаты (с оценкой степени оригинальности), разработанные методы (с оценкой степени новизны)**

Коллективом освоена операция по ишемизации конечности у мышей для создания модели недостаточности кровоснабжения и образования трофической язвы и одновременного забора кожи для выделения и последующей культивации дермальных макрофагов. Освоена методика создания модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета и контроля уровня глюкозы в крови с помощью глюкометра. Освоена методика выращивания фибробластов до нужного количества клеток, оценки их антигенного состава с помощью иммунофлуоресценции и введения их суспензии в трофическую язву. Гистологической техникой и техникой иммуногистохимии

коллектив владеет около 8 лет. По результатам проведенной работы в апреле 2014 года асс. Бойко Т.А. и Барановский А.Г. выступили с докладом на 86 Научно-практической конференции студентов и молодых ученых ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского» «Теоретические и практические аспекты современной медицины». В октябре 2012 отдел «Регенеративной медицины, лектино- и иммуногистохимии» ЦНИЛ КГМУ имени С.И. Георгиевского, который возглавляет зав. кафедры гистологии и эмбриологии того же университета профессор Е.Ю. Шаповалова был повторно аккредитирован комиссией МОЗ Украины на 5 лет.

**4.7.1. Список основных публикаций коллектива, наиболее близко относящихся к предлагаемому проекту (каждая с новой строки)**

Шаповалова Е.Ю. Особенности коллагенового состава волокнистой матрицы для клонирования окончательной почки человека. 2010. Бойко Т.А. Регенераторный гистогенез ран ишемизированных нижних конечностей мышей с помощью трансплантации аутологичных фибробластов. 2014. Шаповалова Е.Ю. Коллагеновый состав стромы органа человека в пренатальном онтогенезе создает основу для создания биоматрикс при развитии органа из стволовых клеток. 2014. Шаповалова Е.Ю. Особенности коллагенового состава волокнистой матрицы для развития поджелудочной железы человека из стволовых клеток. 2014.

**4.7.2. Список основных (не более 5) публикаций руководителя проекта в рецензируемых журналах за последние 3 года (независимо от их тематики; каждая с новой строки)**

1. Шаповалова Е.Ю. Формирование коллагеновых волокон четырех типов в дерме кожи эмбрионов человека первого триместра беременности / Е.Ю. Шаповалова, А.В. Мартынюк, Т.А. Коломеец // Світ медицини та біології. – 2013. – Т. 38, № 2. – С. 44-46.
2. Шаповалова Е.Ю. Морфометрическая вариабельность размеров канальцев метанефроса на разных этапах жизненного цикла окончательной почки у крыс в норме и под влиянием энalapрила / Е.Ю. Шаповалова, И.Ю. Акиншевич // Український журнал нефрології та діалізу. Додаток №1 до № 3. – 2012. – Т. 35, № 3. – С. 33-38.
3. Шаповалова Е.Ю. Некоторые гистотопографические и количественные особенности экспрессии галактозаминоконъюгатов почками крыс, развивавшихся под влиянием блокатора кальциевых каналов / Е.Ю. Шаповалова, И.Ю. Акиншевич // Медицинский журнал Западного Казахстана. – 2013. – Т. 37, Т. 1. – С. 104-107.
4. Акиншевич И.Ю., Шаповалова Е.Ю. Динамика изменения содержания гликогена и гликопротеинов в клетках закладок почек крыс, развивавшихся в норме и под влиянием ингибиторов АПФ / Е.Ю. Шаповалова, И.Ю. Акиншевич // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 63, № 3, Ч. 2. – С. 42-45.
5. Барсуков А.Н. Динамика эпителио-мезенхимных взаимодействий в процессе эмбрионального развития челюстно-лицевого аппарата человека в свете кариометрических исследований / А.Н. Барсуков, Е.Ю. Шаповалова, Г.А. Юнси // Морфология. – 2011. – Т. 140, № 5. – С. 34

**4.8. Перечень оборудования и материалов, имеющих у коллектива для выполнения проекта**

1. Микроскоп люминисцентный OLYMPUS BX43f.
2. Микроскоп OLIMPUS CX-31 с цифровой камерой OLIMPUS 35050Z
3. Ламинарный шкаф фирмы NUVE MN120
4. Инкубатор CO<sub>2</sub> фирмы NUVE EC 160 объемом 100 л.
5. Термошейкер-инкубатор ES 20 фирмы Биосан
6. Электроотсос фирмы Биомед 7А-23В на 5 л
7. Дозаторы переменного объема
8. Беспроводной автоматический дозатор (Пипетман) фирмы Biohit
9. Холодильник Samsung
10. Весы электронные ME-410
11. Микротом для парафиновых срезов, санный
12. Секундомер
13. Одноразовые стерильные материалы: чашки Петри на 100 и 15 мм, культуральные пипетки на 2, 10 и 25 мл, фильтры на 22 и 45 мкм, центрифужные пробирки на 15 и 50 мл.
14. Центрифуга фирмы Биотек
15. Микроскоп инвертированный OLYMPUS.

**4.9.1. Перечень оборудования и материалов, которые необходимо дополнительно приобрести, изготовить или отремонтировать для успешного выполнения проекта; обосновать необходимость его приобретения**

Для успешного выполнения проекта необходимо дополнительно приобрести:  
- фактор роста фибробластов;

- моноклональные антитела к CD 68, к коллагену I, II и III типов, CD 95 для парафиновых срезов;
- моноклональные антитела к белку p53 (маркер апоптоза), к антиапоптотическому гену Bcl-2 для парафиновых срезов;
- прозрачную перфорированную кремнийорганическую пленку «Карбосил 2»;
- пленку Tamprograss (Hertmann Group AG Germany);
- криостат-микротом;
- сосуд Дюара.

**4.9.2. Перечень командировок (в том числе зарубежных), необходимых для выполнения проекта.**

Всероссийское учебно-научное совещание в г. Санкт-Петербурге «Учение о тканях. Гистогенез и регенерация» 9-10 апреля 2015.

Подпись руководителя проекта \_\_\_\_\_





Таблица 1.

**Подгруппы лабораторных животных при проведении  
эксперимента в 2015г.**

Группы с ишемией	Подгруппы	
	№ подгруппы	Условия культивирования
Контрольная группа без сахарного диабета	К I	Пересевались в стандартных условиях
	К II	Среда Гибрис С
	К III	Повышенное содержание CO <sub>2</sub>
	К IV	Фактор роста фибробласта
Экспериментальная группа с сахарным диабетом	Э I	Пересевались в стандартных условиях
	Э II	Среда Гибрис С
	Э III	Повышенное содержание CO <sub>2</sub>
	Э IV	Фактор роста фибробласта

Таблица 2.

**Условия создания биоинженерных конструкций и их посттрансплантационная поддержка в разных подгруппах экспериментальных животных в 2016-2017гг.**

№ подгруппы	Условия культивирования	Вид нетканого каркаса	Дополнительные факторы поддержки биоинженерной конструкции (введение)
К I 2016г.	Пересевались в стандартных условиях	Коллагеновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Коллагеновая губка	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Фибриновый гель	Эритропоэтина

			Взвеси аутофибробластов
		Биодеградируемый синтетический скаффолд	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
К II 2016г.	Среда Гибрис С	Коллагеновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Коллагеновая губка	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Фибриновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Биодеградируемый синтетический скаффолд	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
К III 2016г.	Повышенное содержание CO2	Коллагеновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Коллагеновая губка	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Фибриновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Биодеградируемый синтетический скаффолд	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
К IV 2016г.	Фактор роста фибробластов	Коллагеновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Коллагеновая губка	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Фибриновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Биодеградируемый синтетический скаффолд	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
Э I 2017г.	Пересевались в стандартных условиях	Коллагеновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов

		Коллагеновая губка	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Фибриновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Биодеградируемый синтетический скаффолд	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
Э II 2017г.	Среда Гибрис С	Коллагеновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Коллагеновая губка	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Фибриновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Биодеградируемый синтетический скаффолд	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
Э III 2017г.	Повышенное содержание CO <sub>2</sub>	Коллагеновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Коллагеновая губка	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Фибриновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Биодеградируемый синтетический скаффолд	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
Э IV 2017г.	Фактор роста фибробластов	Коллагеновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Коллагеновая губка	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Фибриновый гель	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов
		Биодеградируемый	Эритропоэтина
			Взвеси аутофибробластов

		синтетический скаффолд	Взвеси аутофибробластов
--	--	------------------------	-------------------------

## Финансовая модель проекта

Год исследования	Объем финансирования (руб.)	Расходы
2015	500000	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Покупка реактивов</li> <li>2. Покупка сосуда Дюара</li> <li>3. Участие в конференциях, симпозиумах</li> <li>4. Покупка расходных материалов (среды, пластик и т.д.)</li> <li>5. Возмещение трудовых затрат</li> </ol>
2016	500000	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Покупка криостат-микротом</li> <li>2. Покупка фактора роста фибробластов</li> <li>3. Участие в конференциях, симпозиумах</li> <li>4. Покупка расходных материалов (среды, пластик и т.д.)</li> <li>5. Возмещение трудовых затрат</li> </ol>
2017	500000	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Покупка моноклональных антител</li> <li>2. Покупка прозрачной перфорированной кремнийорганической пленки «Карбосил 2»</li> <li>3. Покупка пленки Tampograss (Hertmann Group AG Germany)</li> <li>4. Участие в конференциях, симпозиумах</li> </ol>

		<p>5. Возмещение трудовых затрат</p> <p>6. Покупка расходных материалов (среды, пластик и т.д.)</p>
--	--	---