

УДК 606

DOI 10.17802/2306-1278-2025-14-3-51-61

## СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В СОСТАВЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ

М.Н. Егорихина, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, Д.Д. Линькова, Е.А. Фарафонтова,  
Е.А. Левичева, Д.Я. Алейник

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «При- волжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, Российская Федерация, 603950

### Основные положения

- Предложен способ определения жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток в составе тканеинженерных конструкций, который может стать эффективным инструментом регенеративной медицины и тканевой инженерии для оценки механизмов регенеративного процесса при использовании данных конструкций и прогнозировании их эффективности в системе *in vitro*.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ

<b>Цель</b>	Экспериментальное обоснование эффективности способа определения жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток в составе тканеинженерных конструкций (ТИК) в процессе регенерации.
<b>Материалы и методы</b>	Экспериментальное исследование проведено на 12 животных (самцы крыс). Животным формировали полнослойную скальпированную рану диаметром 3 см. В рану имплантировали ТИК на основе криопреципитата плазмы крови человека, в состав которого вводили суспензию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) крыс, предварительно окрашенных трейсером DiOC <sub>14</sub> (3). В контрольные сроки (3, 7–8, 14 и 21-е сутки) животные были выведены из эксперимента. В ходе операции вырезалась область раневого дефекта для проведения <i>ex tempore</i> исследования методом широкопольной флуоресцентной микроскопии с визуализацией образцов с 40, 100 и 200-кратным увеличением по GFP-каналу флуоресценции.
<b>Результаты</b>	При исследовании материала, полученного от животных на 3-и сутки, внешние характеристики подавляющего большинства выявленных объектов с флуоресцентным свечением соответствовали морфологическим характеристикам МСК – веретенообразные клетки с характерными отростками. В материале, полученном от экспериментальных животных на 7–8 сутки, также выявляли большое количество клеток, окрашенных трассирующим флуоресцентным мембранным красителем, которые имели зеленое флуоресцентное свечение и характерную морфологию. В биоматериале, полученном на 14 сутки эксперимента, количество объектов с характерной для МСК морфологией, окрашенных трейсером DiOC <sub>14</sub> (3), значительно меньше, чем на 3 и 7–8 сутки эксперимента. На 21 сутки также детектировали сигнал, специфический для трейсера DiOC <sub>14</sub> (3), однако визуализировать хотя бы единичные клетки с характерной для МСК морфологией не удалось, вероятно, сигнал был обусловлен фрагментами мембран, элиминированных МСК, меченных флуоресцентным красителем.
<b>Заключение</b>	Показано, что МСК в имплантированном на рану животного ТИК сохраняют жизнеспособность и характерную морфологию как минимум в течение 14 суток. Важно, что предложенный способ позволяет прижизненно визуализировать и фотофиксировать жизнеспособные МСК с характерной морфологией, и таким образом, избежать искажений, которые могут быть связаны с фиксацией биологического материала. Предложенный способ может стать эффективным инструментом регенеративной медицины и тканевой инженерии в отношении оценки механизмов регенеративного процесса при использовании ТИК и прогнозирования их эффективности в системе <i>in vitro</i> .

Для корреспонденции: Марфа Николаевна Егорихина, egorihina.marfa@yandex.ru; адрес: пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, Российская Федерация, 603950

Corresponding author: Marfa N. Egorikhina, egorihina.marfa@yandex.ru; address: 10/1, Minin and Pozharsky Sq., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950

**Ключевые слова** Тканеинженерный конструкт • Трейсер DiOC<sub>14</sub>(3) • Мезенхимальные стволовые клетки • Жизнеспособность • Морфология • Имиджинг

*Поступила в редакцию: 26.03.2025; поступила после доработки: 10.04.2025; принята к печати: 01.05.2025*

## METHOD FOR DETERMINING THE VIABILITY OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN TISSUE-ENGINEERED STRUCTURES DURING REGENERATION – EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF EFFICIENCY

M.N. Egorikhina, Yu.P. Rubtsova, I.N. Charykova, D.D. Linkova, E.A. Farafontova,  
E.A. Levicheva, D.Ya. Aleinik

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 10/1, Minin and Pozharsky Sq., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950

### Highlights

- A method for determining the viability of mesenchymal stem cells in the composition of tissue-engineering constructs is proposed, which can become an effective tool for regenerative medicine and tissue engineering for assessing the mechanisms of the regenerative process when using tissue-engineered constructs and predicting their effectiveness in an *in vitro* system.

<b>Aim</b>	Experimental substantiation of the efficiency of the method for determining the viability of mesenchymal stem cells in tissue-engineered constructs during regeneration
<b>Methods</b>	The experimental study was conducted on 12 animals (rats). A full-layer scalped wound with a diameter of 3 cm was formed in the animals. A tissue-engineering construct based on human plasma cryoprecipitate was implanted into the wound, with the composition of which a suspension of rat mesenchymal stem cells (MSCs) pre-stained with the DiOC <sub>14</sub> (3) tracer was introduced. At the control periods (3, 7–8, 14 and 21 days), the animals were withdrawn from the experiment. During the operation, the wound defect area was cut out for ex-tempore examination using wide-field fluorescence microscopy with visualization of samples with 40×, 100×, 200× magnification in the GFP fluorescence channel.
<b>Results</b>	When examining the material obtained from animals on day 3, the external characteristics of the overwhelming majority of identified objects with characteristic fluorescent glow corresponded to the morphological characteristics of MSCs – spindle-shaped cells with characteristic processes. In the material obtained from experimental animals on days 7–8, a large number of cells stained with a tracer fluorescent membrane dye were also detected, which had a green fluorescent glow and characteristic morphology. In the biomaterial obtained on day 14 of the experiment, the number of objects with characteristic MSC morphology stained with the DiOC <sub>14</sub> (3) tracer was significantly less than on days 3 and 7–8 of the experiment. On day 21, a signal specific for the DiOC <sub>14</sub> (3) tracer was also detected, but it was not possible to visualize even single cells with the morphology characteristic of MSCs; the signal was probably due to fragments of membranes of eliminated MSCs labeled with a fluorescent dye.
<b>Conclusion</b>	It was shown that MSCs in tissue-engineering constructs implanted on the animal wound retain viability and characteristic morphology for at least 14 days. It is important that the proposed method allows for intravital visualization and photofixation of viable MSCs with characteristic morphology, and thus avoiding distortions that may be associated with fixation of biological material. The proposed method can become an effective tool for regenerative medicine and tissue engineering in relation to assessing the mechanisms of the regenerative process using TECs and predicting their effectiveness in the <i>in vitro</i> system.
<b>Keywords</b>	Tissue-engineered construct • DiOC <sub>14</sub> (3) tracer • Mesenchymal stem cells • Viability • Morphology • Imaging

*Received: 26.03.2025; received in revised form: 10.04.2025; accepted: 01.05.2025*

## Список сокращений

ТИК – тканеинженерный конструкт МСК – мезенхимальные стволовые клетки

### Введение

Важным инструментом регенеративной медицины является тканевая инженерия, которая предполагает разработку конструкций из специальных материалов (матриц, скаффолдов) и культивирование на них стволовых или тканеспецифических клеток [1]. Дальнейшее развитие регенеративной медицины будет тесно связано с использованием тканеинженерных конструкций (ТИК) сложного состава. Эти конструкции могут включать клетки, биосовместимые материалы, биоактивные молекулы, которые вместе создают среду, способствующую регенерации ткани. Наиболее распространенным типом клеток, вводимых в состав ТИК, являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК). МСК демонстрируют широкие перспективы применения не только за счет способности к самообновлению *in vitro* и мультипотентной дифференциации, но во многом благодаря модулирующим свойствам и паракринной активности [2, 3].

Ранее считалось, что МСК, введенные экзогенно, оказывают защитное действие, мигрируя к поврежденным тканям, приживаясь и взаимодействуя с другими клетками после введения. Однако недавние доклинические исследования и клинические испытания показали, что терапевтический эффект МСК проявляется через паракринную выработку факторов роста, хемо- и цитокинов [4, 5]. МСК вырабатывают множество внеклеточных везикул – экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца, которые служат паракринными посредниками между МСК и их клетками-мишенями [6, 7]. МСК благодаря производству трофических факторов с различными свойствами могут способствовать заживлению ран, уменьшению повреждения тканей и защите ткани от дальнейшей деградации, усилению процесса восстановления и ремоделирования ткани [5, 8]. Так, S.S. Hashemi и коллегами [9] показано, что жизнеспособные МСК, помещенные на децеллюляризованную амниотическую мембрану человека (ДНАМ) и имплантированные на ожоги 3-й степени у крыс (20% площади поверхности тела с полным поражением всех слоев кожи), значительно повышали скорость заживления, реэпителизацию, грануляцию ран. На месте ожога формировалась зрелая рубцовая ткань, уменьшались кровоизлияния и воспаления по сравнению с контрольными группами.

Эффективность применения МСК подтверждена в ряде клинических исследований. Например, G. Marino с коллегами [10] провели клиническое исследование на группе из 20 пациентов в возрасте от 60 до 70 лет (20 человек), страдавших хроническими

язвами нижних конечностей. Показано, что инъекции МСК в края язвенного дефекта приводили к уменьшению диаметра и глубины язв, уменьшению болевого синдрома, а в шести из десяти случаев язва полностью зажила. E.V. Zinovev с коллегами [11] описали успешные случаи лечения глубоких ожогов кожи II–III степени с применением культур МСК. Авторы применяли МСК как самостоятельный способ лечения, так и в сочетании с природными раневыми покрытиями (коллагеновый биодеградируемый гель) и хирургическими методами лечения. У всех пациентов была показана терапевтическая эффективность трансплантации жизнеспособных мезенхимальных клеток в сочетании с коллагеновым гелем: сокращалась продолжительность периода эпителизации пограничных (дермальных) ожоговых поражений, окончательный срок заживления таких ран сокращался в 2 раза, а частота развития гнойного воспаления – в 4 раза. Введение суспензии МСК в зону глубокого ожога повышала частоту приживления кожных трансплантатов, стимулировала ангиогенез и пролиферацию фибробластов в поверхностных и глубоких слоях дермы.

Известно, что важным условием успешного протекания регенеративного процесса при применении МСК является сохранение жизнеспособности клеток в процессе регенерации. Только живые клетки могут длительно осуществлять паракринную функцию, вырабатывать факторы роста, хемокины, цитокины и другие биологически активные вещества и таким образом поддерживать регенеративный процесс на протяжении длительного времени.

Оценка жизнеспособности и пролиферации клеток – необходимый этап многих биомедицинских исследований. Такая оценка обязательна при производстве и контроле качества клеточных продуктов [12]. Жизнеспособность, оцениваемая после различных манипуляций с клетками, является одним из важнейших показателей, который может служить критерием качества тканеинженерных конструкций сложного состава (включающих скаффолд-носитель и клетки). Все существующие методы оценки жизнеспособности клеток можно разделить на следующие группы: методы исключительного окрашивания, методы колориметрического анализа, методы флуориметрического анализа, методы люцинометрического анализа, анализ с помощью проточной цитометрии [13]. Каждый метод имеет преимущества и недостатки, что необходимо иметь в виду при проведении исследования.

В настоящее время большинство исследователей, работающих с 3D-конструкциями, по-прежнему прибегают к протоколам определения жизнеспособности

способности, разработанным для 2D-культур и суспензии клеток, что может быть связано с относительно недавним началом развития новых подходов оценки для 3D-конструкций [12]. Определение жизнеспособности клеток в 3D-конструкциях представляет собой сложную задачу, которая требует учета специфики трехмерной структуры и особенностей клеточного поведения в таких условиях [14]. Чаще всего такие исследования проводятся *in vitro*, а используемые методы предполагают выделение клеточного компонента из состава ТИК [15–17].

В то же время встречаются работы, в которых проводится оценка жизнеспособности клеток в составе ТИК. Решить эту проблему R.C. Dittmar с коллегами [17] предлагают с помощью измерения различия в аутофлуоресценции, которая возникает из-за изменений метаболической активности (уровня восстановленного никотинамидадениндинуклеотида) в клетках. В этом исследовании полученные данные аутофлуоресцентного излучения живых и мертвых клеток различались как по интенсивности, так и по спектру [17]. Однако такой тип исследований требует дорогостоящего оборудования (двухфотонный и/или конфокальный микроскоп), которое не всегда доступно для лабораторий.

Неоднозначные результаты получили F. Bonnier с коллегами [18] при сравнении методов, основанных на восстановлении резазурина в 2D- и 3D-моделях. Для данного типа анализов существенным критерием оказался выбор 3D-каркаса. Так, при использовании коллагеновых матриц наблюдалось искажение результатов тестов на основе резазурина в сравнении с 2D-структурами, так как молекулы резазурина застревают в порах носителя, тем самым снижалась эффективная концентрация, взаимодействующая с клетками. Авторы сделали вывод о том, что необходимо учитывать диффузию и биодоступность исследуемых веществ в трехмерных матрицах и адаптировать протоколы, используемые на двухмерных моделях, с учетом данных особенностей [18].

Методы исследования *in vitro* широко применимы и очень популярны, они позволяют проводить относительно несложный, удобный и подробный анализ жизнеспособности клеток. Однако нужно понимать, что внутри живой системы, в ткани клетки могут функционировать иначе, чем *in vitro*. Не вызывает сомнения, что изменение окружения при переходе ТИК из условий *in vitro* со стабильными параметрами культивирования в условия *in vivo* при трансплантации ТИК могут существенно повлиять на жизнеспособность клеток, вплоть до полной гибели в первые часы после трансплантации. Поэтому показатели жизнеспособности клеток, полученные вне организма методами *in vitro*, не всегда соответствуют реальной картине *in vivo*. Последнее обуславливает необходимость разработки методов, позволяющих оценивать жизнеспособ-

ность клеток в составе ТИК после трансплантации *in vivo* на протяжении регенеративного процесса, что позволит прогнозировать эффективность разрабатываемых ТИК на этапах доклинических исследований на животных.

**Цель работы** – экспериментальное обоснование эффективности способа определения жизнеспособности МСК в составе ТИК в процессе регенерации.

## Материалы и методы

### Культура МСК крысы

Культуры клеток МСК получали из подкожной жировой ткани интактного животного. Клетки выделяли с помощью механической дезагрегации и тепловой ферментативной обработки раствором коллагеназы (Sigma-Aldrich, США) с последующей фильтрацией и культивированием в полной ростовой среде в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (5% CO<sub>2</sub>, +37 °C, абсолютная влажность). Полная ростовая среда имела следующий состав: DMEM F-12 (Gibco™, Thermo Fisher, США), 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FBS) (Gibco™, Thermo Fisher, США), 2% глутамин, антибиотики (пенициллин/стрептомицин) (LLC PanEco, Россия). Для пересева использовали 0,25% раствор трипсина в Версене (Gibco™, Thermo Fisher, США). По достижении субконфлюэнтного монослоя (до 80%) культуру пересевали. В работе использовали культуры 3–4-го пассажа.

Фенотипирование МСК крыс проводили на точном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson США), используя специфические моноклональные антитела с соответствующими изопических контролями. По результатам фенотипирования более 90% клеток имели характеристики, свойственные МСК: CD90<sup>+</sup>, CD 45<sup>-</sup>. Жизнеспособность клеток перед введением в ТИК составляла 98–99%.

### Формирование ТИК

Для формирования ТИК использовали композит на основе криопреципитата плазмы крови человека. С целью ПЭГилирования белковой части криопреципитата вводили PEG-NHS (Sigma-Aldrich, США). К ПЭГилированному криопреципитату добавляли 2% раствор коллагена (морской коллаген, выделенный из шкур трески; pH = 7,2 – 7,4) [19].

В состав композита вводили суспензию МСК крыс в PBS, меченных трейсером DiOC<sub>14</sub>(3) гидроксиэтансульфонат (Biotium Inc., США). DiOC<sub>14</sub>(3) является производным красителя DiO, но более растворим в водной среде, поскольку имеет более короткие углеводородные цепи. Окраску МСК крыс трейсером проводили по инструкции производителя. Концентрация клеток крыс составляла  $1,2 \times 10^5$  на 1 мл композита.

Затем композит переносили в форму – чашку Петри диаметром 3,5 см. Для полимеризации композита в него добавляли тромбин-кальциевую смесь: 80 МЕ/мл тромбина (Sigma-Aldrich, США) в 1% растворе CaCl<sub>2</sub>. ТИК культивировали в течение 4 суток в полной ростовой среде в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора с 5% содержанием CO<sub>2</sub>, температурой +37 °С и абсолютной влажностью. Перед началом эксперимента ТИК трехкратно отмывали фосфатным буферным раствором.

#### Экспериментальное исследование на животных

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (Нижний Новгород, Россия) (протокол № 5 от 10 марта 2021 г.).

Экспериментальное исследование проведено на 12 животных (самцы крыс, аутбредные, нелинейные, стока Wistar, породы Вильсон, весом 200–250 г): по три животных на четыре контрольных срока (3, 7–8, 14, 21-е сутки).

Животным вдоль позвоночника с использованием трафарета размечали области формирования раневых дефектов. Моделировали одну полнослойную скальпированную рану диаметром 3 см. Для предотвращения контракции раны к окружающей рану коже крысы фиксировали специальное кольцо, подшивая его нерассасывающимся шовным материалом. В сформированную рану помещали ТИК с МСК крыс, меченных трейсером DiOC<sub>14</sub>(3).

Все раны закрывались силиконизированным защитным покрытием (Transparent dressing, Winner medical, Китай) и влагоудерживающей повязкой (Cosmopor E, Германия). Чтобы снизить риск случайного срывания повязок и дальнейшего инфицирования ран, накладывались дополнительные защитные повязки.

На протяжении послеоперационного периода ежедневно проводилось наблюдение за общим клиническим состоянием животного (поведением, степенью активности, потреблением корма и воды, температурой тела).

В контрольные сроки на 3, 7–8, 14-е сутки животные были выведены из эксперимента (по 3 животных на 3-и, 7–8-е и 14-е сутки). При выведении оценивалось общее состояние животных, внешний вид ран и окружающих тканей, цвет ткани, признаки воспаления в области импланта. После выведения животного из эксперимента осуществлялся забор тканей области раневых дефектов. Проводилась фотодокументация всех этапов процедуры забора биоматериала.

Все манипуляции с животными выполняли под общим наркозом. Общую анестезию осуществляют внутримышечным введением «Золетила 100» в дозе 60 мг/кг (Virbac Sante Animale, Франция) и «Ксила-Вета» в дозе 6 мг/кг (Pharmamagist Ltd, Венгрия).

#### Исследование биоматериала

Образцы тканей, полученные из области имплантации, проанализированы на имиджере Cyation 5 с диспетчером задач Gen + (BioTek Instruments Inc., США). Образец помещали в чашку Петри и перемещали на ридер-столик. С помощью модуля микроскопии проводили визуализацию образцов с 40, 100 и 200-кратным увеличением по зеленому каналу флуоресценции (GFP).

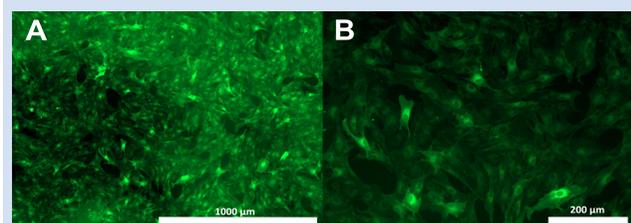
#### Гистологическое исследование

Образцы ТИК были зафиксированы в растворе нейтрального 10% формалина (BioVitrum, Россия). Стандартная гистологическая проводка осуществлялась на аппарате Excelsior ES (Thermo Scientific, США) [20]. После проводки изготавливались парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoStar (Thermo Scientific, США). Срезы толщиной 4–6 мкм получали на микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США). Срезы окрашивались гематоксилином и эозином (ООО «ЭргоПродакшн», Россия). Окрашивание проводили в соответствии с инструкцией производителя.

#### Результаты

МСК крыс перед введением в эксперимент метили трейсером DiOC<sub>14</sub>(3) гидроксизтансульфонат по протоколу производителя. При проведении флуоресцентной микроскопии на поверхности пластика визуализировали монослой, сформированный клетками типичной веретеновидной формы с выраженными отростками. Клетки были не токсированы, окрашивались трейсером в ярко-зеленый цвет (рис. 1).

Перед началом эксперимента ТИК с введенными в их состав мечеными клетками трехкратно отмывали фосфатным буферным раствором и проводили фотофиксацию внешнего вида клеток в структуре скаффолда. Для этого скаффолд с клетками помещали на предметный столик имиджера Cyation 5 и проводили фотосъемку по зеленому каналу флуоресценции (GFP). Клетки в структуре ТИК хорошо визуализировались, имели характерную для МСК



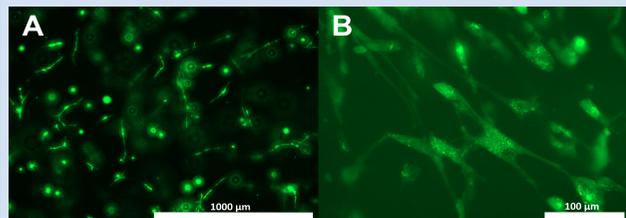
**Рисунок 1.** Внешний вид клеток на поверхности культурального пластика, окрашенных трейсером DiOC<sub>14</sub>(3): *A* – увеличение 40×; *B* – увеличение 100×

**Figure 1.** Appearance of cells on the surface of culture plastic stained with DiOC<sub>14</sub>(3) tracer: *A* – 40× magnification; *B* – 100× magnification

форму с длинными отростками и формировали межклеточные контакты (рис. 2).

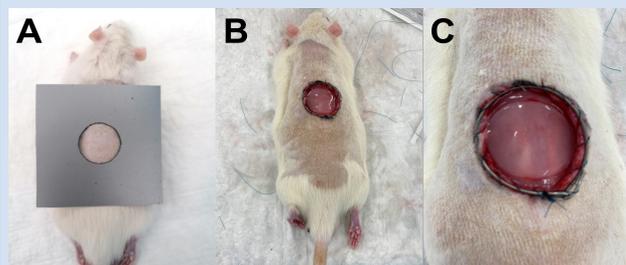
Экспериментальным животным на подготовленную операционную область с использованием шаблона формировали полнослойную скальпированную рану диаметром 3 см (рис. 3, А). По краю раны подшивали антитракционное кольцо, которое предотвращало стягивание раны (см. рис. 3, В). В подготовленную рану имплантировали ТИК с мечеными трейсером DiOC<sub>14</sub>(3) клетками (см. рис. 3, С).

В контрольные сроки (3, 7–8, 14, 21-е сутки) животных подвергли эвтаназии и осуществили забор образцов тканей, выделенных из области имплантации ТИК. Затем *ex tempore*, в течение часа после выделения образцов, чашку с образцом тканей переносили на оборудование, позволяющее проводить широкопольную флуоресцентную микроскопию – имиджер Cytation™ 5. После чего проводили визуализацию жизнеспособных клеток, окрашенных мембранным трейсером DiOC<sub>14</sub>(3), используя GFP-канал для регистрации «зеленого» сигнала (длина волны возбуждения – 477 нм, длина волны эмиссии – 525 нм). При выявлении объектов с характерным флуоресцентным свечением их фотофиксировали. Поиск и визуализацию светящихся объектов осуществляли, перемещаясь вдоль оси Z на фиксированную глубину 500 мкм от дна чашки Петри.



**Рисунок 2.** Визуализация меченных трейсером DiOC<sub>14</sub>(3) клеток в структуре ТИК перед имплантацией животным: А – увеличение 40×; В – увеличение 200×

**Figure 2.** Visualization of cells labeled with the DiOC<sub>14</sub>(3) tracer in the structure of the TEC before implantation into animals: А – 40× magnification; В – 200× magnification

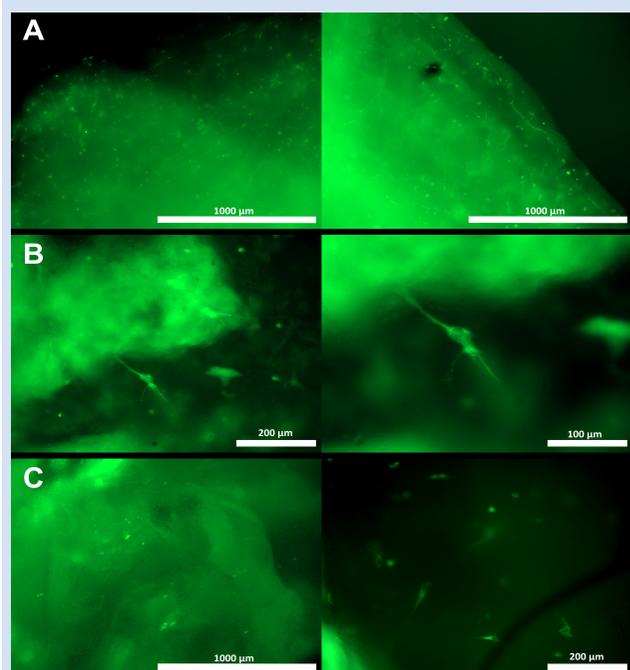


**Рисунок 3.** Введение животных в эксперимент: А – маркировка раневого дефекта с использованием шаблона; В – формирование полнослойной скальпированной раны; В–С – аппликация в область раневого дефекта ТИК с клетками, мечеными трейсером DiOC<sub>14</sub>(3)

**Figure 3.** Introduction of animals into the experiment: А – marking of the wound defect using a template; В – formation of a full-layer scalp wound; В–С – application of TEC with cells labeled with the DiOC<sub>14</sub>(3) tracer to the wound defect area

При исследовании материала, полученного от животных на 3-е сутки, внешние характеристики подавляющего большинства выявленных объектов с флуоресцентным свечением соответствовали морфологическим характеристикам МСК. Визуализировались множественные веретенообразные клетки с характерными отростками (рис. 4, А). В материале, полученном от экспериментальных животных на 7–8-е сутки, также выявляли достаточно большое количество клеток, окрашенных трассирующим флуоресцентным мембранным красителем, которые имели зеленое флуоресцентное свечение и характерную морфологию. В них также хорошо просматривалось ядро овальной формы (см. рис. 4, В). При проведении широкопольной флуоресцентной микроскопии на биоматериале, полученном от животных на 14-е сутки эксперимента, отмечено, что количество объектов с характерной для МСК морфологией окрашенных мембранным трейсером DiOC<sub>14</sub>(3) значительно меньше, чем визуализировали на 3-и и 7–8-е сутки эксперимента (см. рис. 4, С).

Жизнеспособность и функциональная активность МСК, как и любых других клеток, зависят от условий микросреды. В ранах, как правило, наблюдаются неблагоприятные условия для функционирования клеток, часто повреждение тканей сопровождается воспалением, гипоксией, выбросом цитоки-



**Рисунок 4.** Исследование биологического материала, полученного от экспериментальных животных из области имплантации ТИК: А – 3-и сутки от начала эксперимента (увеличение 40×); В – 7-е сутки от начала эксперимента (увеличение 100× и 200×); С – 14-е сутки от начала эксперимента (увеличение 40×, 100×)

**Figure 4.** Study of biological material obtained from experimental animals from the area of TIC implantation: А – 3 days from the beginning of the experiment (magnification 40×); В – 7 days from the beginning of the experiment (magnification 100× and 200×); С – 14 days from the beginning of the experiment (magnification 40×, 100×)

нов и ферментов [21, 22]. Все это может приводить к гибели МСК, имплантируемых в составе ТИК.

Известно, что нормальная морфология МСК при благоприятных условиях осуществления их жизнедеятельности представляет собой распластанные клетки веретенообразной или звездчатой формы с несколькими длинными тонкими отростками, а также большим ядром. Однако при неблагоприятных условиях морфология клеток резко меняется: клетки ошариваются, уплощаются, что зачастую сопровождается их гибелью. Безусловно, неблагоприятные условия влияют не только на жизнеспособность, но и функциональную активность клеток [23]. Клетки могут еще оставаться живыми, но уже не осуществлять своей паракринной функции. Таким образом, по морфологии МСК можно судить о жизнеспособности и косвенно о поддержании клетками функциональной активности. Последнее в конечном счете и обуславливает успешность протекания регенеративного процесса в присутствии ТИК. Морфология МСК в структуре ТИК представляет собой распластанные клетки фибробластоподобной формы со множественными отростками, то есть клетки имеют характерную морфологию жизнеспособных клеток (см. рис. 2). Данный факт подтверждают результаты гистологического исследования ТИК, культивируемого *in vitro* (рис. 5).

При проведении представленного исследования *in vivo* клетки в структуре ТИК, имплантированного в рану экспериментальных животных, с характерным флуоресцентным свечением и соответствующей морфологией визуализировались до 14 суток после имплантации ТИК в область раневого дефекта. Таким образом, на 3, 7–8 и 14-е сутки после имплантации ТИК в процессе регенерации определялись жизнеспособные мезенхимальные стволовые клетки. Это позволяет сделать заключение о том, что МСК в имплантированном ТИК сохраняют жизнеспособность и функциональную активность как минимум в течение 14 суток в процессе регенерации.

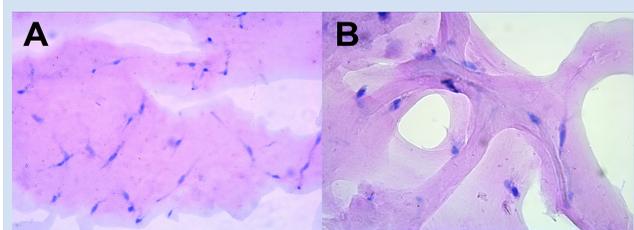
Наши результаты коррелируют с данными, полученными коллегами из Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Так, П.И. Макаревич выполнил прижизненное мечение МСК с помощью мембранного красителя РКН26 (Sigma-Aldrich, США) в клеточной суспензии или в форме клеточных пластов для оценки удержания мезенхимных стромальных клеток, трансплантированных в зону раневого дефекта в виде суспензии или в составе пласта. В случае формирования клеточных пластов МСК метили перед началом сборки ТИК. Эксперимент проводился *in vivo* на самцах крыс линии Wistar, на модели глубокой раны, которым имплантировали суспензию МСК или ТИК в зону раны. На препаратах тканей, забранных через 14 дней после трансплантации МСК, автор обнаружил МСК, меченные РКН26. Детектирова-

ние флуоресцентного сигнала осуществлялось на гистологических препаратах предварительно замороженных тканей в парах азота. На данном сроке хорошо визуализировались как МСК, введенные в форме суспензии, так и в виде пласта. Однако на 21-й день в группе введения суспензии МСК сигнала РКН26 обнаружено не было. Это соотносится с представлениями о том, что элиминация клеток после инъекционного введения происходит в течение первых 12–14 дней. В противовес этому в группе трансплантации клеточных пластов на срезах удалось визуализировать специфичный сигнал РКН26. Автор заключил, что наиболее вероятным источником сигнала являются выжившие или интегрировавшиеся МСК, доставленные в составе ТИК [24].

На 21-е сутки мы также детектировали сигнал, специфический для трейсера DiOC<sub>14</sub>(3) (рис. 6). Однако визуализировать хотя бы единичные клетки с характерной для МСК морфологией нам не удалось. Вероятнее всего, этот сигнал был обусловлен фрагментами мембран, элиминированных МСК, меченных трейсером. В связи с этим нельзя утверждать, что получение сигнала на 21-е сутки свидетельствует об интеграции МСК в ткани или наличии жизнеспособных, функционально активных клеток.

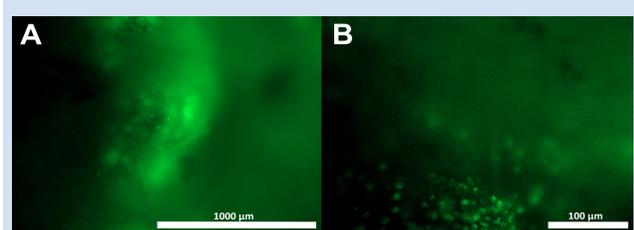
### Обсуждение

Известно, что регенеративный процесс включает три последовательных фазы. Первая фаза – воспалительная. Воспалительная фаза разделена на сосудистую (гемостаз) и клеточную (воспаление)



**Рисунок 5.** Фрагмент ТИК, культивируемого *in vitro* (окраска гематоксилин-эозин): *A* – увеличение 200×; *B* – увеличение 400×

**Figure 5.** Fragment of TEC cultured *in vitro* (hematoxylin and eosin staining): *A* – magnification 200×; *B* – magnification 400×



**Рисунок 6.** Внешний вид клеток из области имплантации ТИК с окрашенными трейсером DiOC<sub>14</sub>(3) МСК (21-е сутки от начала эксперимента): *A* – увеличение 100×; *B* – увеличение 200×

**Figure 6.** Appearance of cells from the area of TIC implantation with MSC stained with DiOC<sub>14</sub>(3) tracer (21 days from the beginning of the experiment): *A* – magnification 100×; *B* – magnification 200×

реакцию. Как только кровотечение остановлено, в рану мигрируют воспалительные клетки и начинается воспалительная фаза, которая характеризуется последовательной инфильтрацией нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов [21], высвобождением провоспалительных цитокинов и факторов роста, таких как трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ), фактор роста тромбоцитов (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF) и интерлейкин 8 (IL8/CXCL-8), из фибринового сгустка и непосредственно из поврежденной ткани [25]. Воспаление возникает сразу после повреждения тканей, и основная цель этой фазы – предотвратить инфекцию.

Вторая фаза – репаративная, связана с приходом фибробластов и МСК [26]. Пролиферативная стадия заживления начинается примерно через 2–10 дней после ранения и определяется взаимодействием разных типов клеток, кроме того, в этом процессе участвуют трофические и ростовые факторы, среди которых ключевую роль играет фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [25]. Третья, завершающая фаза – фаза ремоделирования, начинается через 2–3 недели после травмы и продолжается до нескольких лет. Данная фаза включает восстановление структуры и функции ткани, на этом этапе меняется состав матрикса, в частности коллаген III типа разрушается и заменяется коллагеном I типа, что происходит под действием матриксной металлопротеиназы (ММП) [22].

Таким образом, при заживлении раны без участия внешних факторов МСК играют ключевую роль на втором этапе регенеративного процесса. В то же время при имплантации МСК в область раневого дефекта они сразу же начинают участвовать в регенеративном процессе. МСК являются источником разнообразных цитокинов (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, IL-10, TNF $\alpha$ ), хемокинов (CXCL9, CXCL10 и CXCL11, способствующие хемотаксису иммунных клеток) [27] и трофических факторов (MCP-1, VEGF, OPG, TIMP-2 и др.) [23], которые стимулируют ангиогенез и способствуют раннему формированию грануляционной ткани. Таким образом, имплантированные МСК ускоряют протекание регенерации и сокращают сроки каждого из этапов регенеративного процесса. Вполне вероятно, что к 21-м суткам МСК уже выполнили паракринную функцию в обеспечении регенерации и привлечении в очаг повреждения из прилежащих тканей живых клеток. На завершающем этапе регенеративного процесса не критично наличие живых и функционально активных имплантированных МСК, так как их паракринная роль в регенеративном процессе завершена. Заключительные фазы процесса могут осуществляться без экзогенных МСК, так как в область раны уже пришли другие клетки из окружающих тканей, которые сами могут обеспечить завершение процесса регенерации.

В то же время на стадии доклинических исследований важно понимание о поддержании жизнеспособности и функциональной активности МСК, имплантируемых в составе ТИК в область дефекта. Последнее дает возможность обоснования эффективности разрабатываемых продуктов, понимания механизмов их действия и прогнозирования их эффективности.

### Заключение

Предложенный в работе способ определения жизнеспособности МСК в составе ТИК в процессе регенерации, включающий окрашивание флуоресцентным красителем DiOC<sub>14</sub>(3) мезенхимальных стволовых клеток до формирования ТИК, позволяет эффективно визуализировать меченые клетки на биологическом материале, полученном от экспериментальных животных. Показано, что МСК в имплантированном на рану животного ТИК сохраняют жизнеспособность и характерную морфологию как минимум в течение 14 суток. На 21-е сутки мы также детектировали сигнал, специфический для трейсера DiOC<sub>14</sub>(3), однако визуализировать хотя бы единичные клетки с характерной для МСК морфологией нам не удалось – вероятно, сигнал был обусловлен фрагментами мембран, элиминированных МСК, меченных флуоресцентным красителем. Важно, что предложенный способ позволяет прижизненно визуализировать и фотофиксировать жизнеспособные МСК с характерной морфологией и таким образом избежать искажений, которые могут быть связаны с фиксацией биологического материала. Наличие характерной морфологии при визуализации МСК позволяет судить не только о жизнеспособности, но и косвенно сделать вывод об их функциональной активности. Таким образом, предложенный способ может стать эффективным инструментом регенеративной медицины и тканевой инженерии в отношении оценки механизмов регенеративного процесса при использовании ТИК и прогнозировании их эффективности в системе *in vivo*.

### Конфликт интересов

М.Н. Егорихина заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.П. Рубцова заявляет об отсутствии конфликта интересов. И.Н. Чарыкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.Д. Линькова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Фарафонтова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Левичева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.Я. Алейник заявляет об отсутствии конфликта интересов.

### Финансирование

Работа выполнена в рамках программы «Приоритет-2036» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

**Информация об авторах**

*Егорихина Марфа Николаевна*, кандидат биологических наук заведующая лабораторией клеточных технологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, заведующая лабораторией биотехнологий университетской клиники, ведущий научный сотрудник НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8815-9651

*Рубцова Юлия Павловна*, кандидат биологических наук научный сотрудник научной лаборатории клеточных технологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-2781-6419

*Чарыкова Ирина Николаевна*, биолог лаборатории биотехнологий университетской клиники федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-0866-7857

*Линькова Дарья Дмитриевна*, младший научный сотрудник НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-3879-8460

*Фарафонтובה Екатерина Александровна*, лаборант научной лаборатории клеточных технологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-7940-0880

*Левичева Екатерина Андреевна*, лаборант научной лаборатории клеточных технологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0006-3807-1412

*Алейник Диана Яковлевна*, кандидат медицинских наук старший научный сотрудник НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-1482-4281

**Вклад авторов в статью**

*ЕМН* – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение данных исследования, написание и корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

**Author Information Form**

*Egorikhina Marfa N.*, PhD, Senior Researcher of Laboratory of Regenerative Medicine in Institute of Biomedical Technologies of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Privolzhsky Research Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8815-9651

*Rubtsova Yulia P.*, PhD in Biology, Researcher of Laboratory of Regenerative Medicine in Institute of Biomedical Technologies of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Privolzhsky Research Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-2781-6419

*Charykova Irina N.*, Biologist at the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Privolzhsky Research Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-0866-7857

*Linkova Daria D.*, Junior Researcher of Laboratory of Regenerative Medicine in Institute of Biomedical Technologies of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Privolzhsky Research Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-3879-8460

*Farafontova Ekaterina A.*, Laboratory Assistant of Laboratory of Regenerative Medicine in Institute of Biomedical Technologies of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Privolzhsky Research Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-7940-0880

*Levicheva Ekaterina A.*, Laboratory Assistant of Laboratory of Regenerative Medicine in Institute of Biomedical Technologies of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Privolzhsky Research Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation; **ORCID** 0009-0006-3807-1412

*Aleynik Diana Ya.*, PhD, Senior Researcher of Laboratory of Regenerative Medicine in Institute of Biomedical Technologies of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Privolzhsky Research Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-1482-4281

**Author Contribution Statement**

*EMN* – contribution to the concept and design of the study, data collection, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*РЮП* – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение данных исследования, написание и корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ЧИН* – анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ЛДД* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ФЕА* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ЛЕА* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*АДЯ* – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*RYuP* – contribution to the concept and design of the study, data collection, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*CIN* – data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*LDD* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*FEA* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*LEA* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

*ADYu* – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Файзуллин А.Л., Шехтер А.Б., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Руденко Т.Г., Гуллер А.Е., Абоянц Р.К., Тимашев П.С., Бутнару Д.В. Биорезорбируемые коллагеновые материалы в хирургии: 50 лет успеха. Сеченовский вестник. 2020; 11(1): 59–70. doi:10.47093/2218-7332.2020.11.1.59-70
2. Bian D., Wu Y., Song G., Azizi R., Zamani A. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):1-17. doi:10.1186/s13287-021-02697-9
3. Heldring N., Mäger I., Wood M.J.A., Le Blanc K., Andaloussi S.E.L. Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Hum Gene Ther.* 2015;26(8):506-517. doi:10.1089/hum.2015.072
4. Gomzikova M.O., James V., Rizvanov A. A. Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells Derived Extracellular Vesicles for Immunomodulation. *Front Immunol.* 2019;10(November):1-9. doi:10.3389/fimmu.2019.02663
5. Dedier M., Magne B., Nivet M., Banzet S., Trouillas M. Anti-inflammatory effect of interleukin-6 highly enriched in secretome of two clinically relevant sources of mesenchymal stromal cells. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11(September):1-8. doi:10.3389/fcell.2023.1244120
6. Mendt M., Rezvani K., Shpall E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54:789-792. doi:10.1038/s41409-019-0616-z
7. Lotfy A., AboQuella N.M., Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):1-18. doi:10.1186/s13287-023-03287-7
8. Lin Y., Marin-Argany M., Dick C.J., Redhage K.R., Blancas-Mejia L.M., Bulur P., Butler G.W., Deeds M.C., Madden B.J., Williams A., Wall J.S., Dietz A., Ramirez-Alvarado M. Mesenchymal stromal cells protect human cardiomyocytes from amyloid fibril damage. *Cytotherapy.* 2017;19(12). doi:10.1016/j.jcyt.2017.08.021
9. Hashemi S.S., Pourfath M.R., Derakhshanfar A., Behzad-Behbahani A., Moayedi J. The role of labeled cell therapy with and without scaffold in early excision burn wounds in a rat animal model. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23(5):673-679. doi:10.22038/ijbms.2020.34324.8156
10. Marino G., Moraci M., Armenia E., Orabona C., Sergio R., De Sena G., Capuozzo V., Barbarisi M., Rosso F., Giordano G., Iovino F., Barbarisi A. Therapy with autologous adipose-derived regenerative cells for the care of chronic ulcer of lower limbs in patients with peripheral arterial disease. *J Surg Res.* 2013 Nov;185(1):36-44. doi: 10.1016/j.jss.2013.05.024
11. Зиновьев Е.В., Крайников П.Е., Асадулаев М.С., Костяков Д.В., Вагнер Д.О., Крылов П.К., Османов К.Ф. Клиническая оценка эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток при термических ожогах Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова 2018;13(4): 62-67. doi:10.25881/bpnmisc.2018.88.91.011
12. Еремеев А.В., Пикина А.С., Владимирова Т.В., Богомазова А.Н. Методы оценки жизнеспособности клеток, культивируемых in vitro в 2D- и 3D-структурах. *Гены и клетки.* 2023;18(1):5-21. doi:10.23868/gc312198
13. Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front.* 2020;1(3):332-349. doi:10.1002/fft2.44
14. Debruyne A.C., Okkelman I.A., Dmitriev R.I. Balance between the cell viability and death in 3D. *Semin Cell Dev Biol.* 2023;144:55-66. doi:10.1016/J.SEMCDB.2022.09.005
15. Gantenbein-Ritter B., Potier E., Zeiter S., van der Werf M., Sprecher C.M., Ito K. Accuracy of three techniques to determine cell viability in 3D tissues or scaffolds. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2008;14(4):353-358. doi:10.1089/ten.tec.2008.0313
16. Dominijanni A.J., Devarasetty M., Forsythe S.D., Votanopoulos K.I., Soker S. Cell Viability Assays in Three-Dimensional Hydrogels: A Comparative Study of Accuracy. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2021;27(7):401-410. doi:10.1089/ten.tec.2021.0060
17. Dittmar R., Potier E., van Zandvoort M., Ito K. Assessment of cell viability in three-dimensional scaffolds using cellular autofluorescence. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2012;18(3):198-204. doi:10.1089/ten.tec.2011.0334
18. Bonnier F., Keating M.E., Wróbel T.P., Majzner K., Baranska M., Garcia-Munoz A., Blanco A., Byrne H.J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol In vitro.* 2015 Feb;29(1):124-31. doi: 10.1016/j.tiv.2014.09.014
19. Семеньчева Л.Л., Кузнецова Ю.Л., Валетова, Н.Б., Гераськина Е.В., Таранкова О.А. Способ получения уксусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена. Патент RU2567171C1, 2015; Бюл. №31
20. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Практическое руководство. СПб: СпецЛит; 2010. 95 с.
21. Guo S., Dipietro L.A. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-229. doi:10.1177/0022034509359125
22. Gonzalez A.C., Costa T.F., Andrade Z.A., Medrado A.R. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016 Sep-Oct;91(5):614-620. doi: 10.1590/abd1806-4841.20164741
23. Юрова К.А., Мелашенко Е.С., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Мелашенко О.Б., Шунькин Е.О., Норкин И.К., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Мезенхимные стволовые клетки: краткий обзор классических представлений и новых факторово-стеогенной дифференцировки (PDF) Мезенхимальные стволовые клетки: краткий обзор концепций классификации и новых факторов остеогенной дифференцировки. Медицинская иммунология, 2021;23(2):207-222. doi:10.15789/1563-0625-MS-2128 (In Russ.)
24. Макаревич П.И. Клеточные пласты из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток как платформа для тканевой инженерии в регенеративной медицине. Диссертация на соискание учёной степени доктора медицинских наук. М: 2024.
25. Nourian Dehkordi A., Mirahmadi Babaheydari F,

Chehelgerdi M., Raesi Dehkordi S. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Mar 29;10(1):111. doi: 10.1186/s13287-019-1212-2

26. Воротников А.В., Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Аниол Н.В., Горюнов К.В., Кудряшова Т.В., Тюрин-Кузьмин П.А., Ткачук В.А. Направленная миграция и мезенхимальные прогениторные клетки: участие в воспалении, репарации и регенерации тканей. В сборнике: Стволовые клетки и регенеративная медицина /ред. Проф. В.А Ткачука. М: Макс-пресс; 2012.

27. Бехало В.А., Горская Ю.Ф., Нестеренко В.Г. Иммунорегуляторный и иммунотерапевтический потенциал мезенхимальных стволовых/стромальных клеток: перспективы и проблемы. *Иммунология.* 2024; 45 (3): 385–395. DOI: <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2024-45-3-385-395>

## REFERENCES

- Fayzullin A.L., Shekhter A.B., Istranov L.P., Istranova E.V., Rudenko T.G., Guller A.E., Aboyants R.K., Timashev P.S., Butnaru D.V. Bioresorbable collagen materials in surgery: 50 years of success. *Sechenov Medical Journal.* 2020;11(1): 59–70. doi: [10.47093/2218-7332.2020.11.1.59-70](https://doi.org/10.47093/2218-7332.2020.11.1.59-70) (In Russ.)
- Bian D., Wu Y., Song G., Azizi R., Zamani A. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):1-17. doi: [10.1186/s13287-021-02697-9](https://doi.org/10.1186/s13287-021-02697-9)
- Heldring N., Mäger I., Wood M.J.A., Le Blanc K, Andaloussi S.E.L. Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Hum Gene Ther.* 2015;26(8):506-517. doi: [10.1089/hum.2015.072](https://doi.org/10.1089/hum.2015.072)
- Gomzikova M.O., James V., Rizvanov A. A. Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells Derived Extracellular Vesicles for Immunomodulation. *Front Immunol.* 2019;10(November):1-9. doi: [10.3389/fimmu.2019.02663](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02663)
- Dedier M., Magne B., Nivet M., Banzet S., Trouillas M. Anti-inflammatory effect of interleukin-6 highly enriched in secretome of two clinically relevant sources of mesenchymal stromal cells. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11(September):1-8. doi: [10.3389/fcell.2023.1244120](https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1244120)
- Mendt M., Rezvani K., Shpall E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54:789-792. doi: [10.1038/s41409-019-0616-z](https://doi.org/10.1038/s41409-019-0616-z)
- Lotfy A., AboQuella N.M., Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):1-18. doi: [10.1186/s13287-023-03287-7](https://doi.org/10.1186/s13287-023-03287-7)
- Lin Y., Marin-Argany M., Dick C.J., Redhage K.R., Blancas-Mejia L.M., Bulur P., Butler G.W., Deeds M.C., Madden B.J., Williams A., Wall J.S., Dietz A., Ramirez-Alvarado M. Mesenchymal stromal cells protect human cardiomyocytes from amyloid fibril damage. *Cytotherapy.* 2017;19(12). doi: [10.1016/j.jcyt.2017.08.021](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.08.021)
- Hashemi S.S., Pourfath M.R., Derakhshanfar A., Behzad-Behbahani A., Moayedi J. The role of labeled cell therapy with and without scaffold in early excision burn wounds in a rat animal model. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23(5):673-679. doi: [10.22038/ijbms.2020.34324.8156](https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.34324.8156)
- Marino G., Moraci M., Armenia E., Orabona C., Sergio R., De Sena G., Capuzzo V., Barbarisi M., Rosso F., Giordano G., Iovino F., Barbarisi A. Therapy with autologous adipose-derived regenerative cells for the care of chronic ulcer of lower limbs in patients with peripheral arterial disease. *J Surg Res.* 2013 Nov;185(1):36-44. doi: [10.1016/j.jss.2013.05.024](https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.05.024)
- Zinovev E.V., Krajnjukov P.E., Asadulaev M.S., Kostyakov D.V., Wagner D.O., Krylov P.K., Osmanov K.F. Clinical Assessment of the Efficiency of the Use of Mesenchymal Stem Cells in Thermal Burns. *Bull Pirogov Natl Med Surg Cent.* 2018;13(4):62-67. doi: [10.25881/bpnm.2018.88.91.011](https://doi.org/10.25881/bpnm.2018.88.91.011) (In Russ.)
- Eremeev A.V., Pikina A.S., Vladimirova T.V., Bogomazova A.N. Methods for assessing the viability of cells cultured in vitro in 2D and 3D structures *Genes & cells* 2023;18(1):5-21. doi: [10.23868/gc312198](https://doi.org/10.23868/gc312198) (In Russ.)
- Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front.* 2020;1(3):332-349. doi: [10.1002/fft.44](https://doi.org/10.1002/fft.44)
- Debruyne A.C., Okkelman I.A., Dmitriev R.I. Balance between the cell viability and death in 3D. *Semin Cell Dev Biol.* 2023;144:55-66. doi: [10.1016/J.SEMCDB.2022.09.005](https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2022.09.005)
- Gantenbein-Ritter B., Potier E., Zeiter S., van der Werf M., Sprecher C.M., Ito K. Accuracy of three techniques to determine cell viability in 3D tissues or scaffolds. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2008;14(4):353-358. doi: [10.1089/ten.tec.2008.0313](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0313)
- Dominijanni A.J., Devarasetty M., Forsythe S.D., Votanopoulos K.I., Soker S. Cell Viability Assays in Three-Dimensional Hydrogels: A Comparative Study of Accuracy. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2021;27(7):401-410. doi: [10.1089/ten.tec.2021.0060](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2021.0060)
- Dittmar R., Potier E., van Zandvoort M., Ito K. Assessment of cell viability in three-dimensional scaffolds using cellular autofluorescence. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2012;18(3):198-204. doi: [10.1089/ten.tec.2011.0334](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0334)
- Bonnier F., Keating M.E., Wróbel T.P., Majzner K., Baranska M., Garcia-Munoz A., Blanco A., Byrne H.J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol In vitro.* 2015 Feb;29(1):124-31. doi: [10.1016/j.tiv.2014.09.014](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014)
- Semenycheva, L.L.; Kuznetsova, J.L.; Valetova, N.B.; Geras'kina, E.V.; Tarankova, O.A. Patent. RU2567171 Int. Cl. C08H 1/06, A23J 1/04 Method for production of acetic dispersion of high molecular fish collagen 2015; Bull. №31 (In Russ.)
- Korzhhevskij D.Je., Giljarov A.V. Osnovy gistologicheskoy tehniki. Prakticheskoe rukovodstvo. SPb: SpecLit; 2010. 95 p (In Russ.)
- Guo S., Dipietro L.A. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-229. doi: [10.1177/0022034509359125](https://doi.org/10.1177/0022034509359125)
- Gonzalez A.C., Costa T.F., Andrade Z.A., Medrado A.R. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016 Sep-Oct;91(5):614-620. doi: [10.1590/abd1806-4841.20164741](https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741)
- Yurova K.A., Melashchenko E.S., Khasiakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Shunkin E.O., Norkin I.K., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Mesenchymal stem cells: A brief review of classic concepts and new factors of osteogenic differentiation. *Med Immunol.* 2021;23(2):207-222. doi: [10.15789/1563-0625-MSC-2128](https://doi.org/10.15789/1563-0625-MSC-2128) (In Russ.)
- Makarevich P.I. Kletochnye plasty iz multipotentnyh mezenhimnyh stromal'nyh kletok kak platforma dlja tkanevoj inzhenerii v regenerativnoj medicene. [dissertation]; Moscow; 2024 (In Russ.)
- Nourian Dehkordi A., Mirahmadi Babaheydari F., Chehelgerdi M., Raesi Dehkordi S. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Mar 29;10(1):111. doi: [10.1186/s13287-019-1212-2](https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2)
- Vorotnikov A. V., Suzdal'ceva Ju. G., Rubcov Ju. P., Aniol N. V., Gorjunov K. V., Kudryashova T. V., Tjurin-Kuz'min P. A., Tkachuk V. A. Napravlenaja migracija i mezenhimal'nye progenitornye kletki: uchastie v vospalenii, reparacii i regeneracii tkani. V sbornike: Stvolovye kletki i regenerativnaja medicina / red. Prof. V.A Tkachuka Moscow: Maks-press; 2012 (In Russ.)
- Bekhalo V.A., Gorskaya Yu.F., Nesterenko V.G. Immunoregulatory and immunotherapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cells: prospects and problems. *Immunologiya.* 2024;45(3):385-395. doi: [10.33029/1816-2134-2024-45-3-385-395](https://doi.org/10.33029/1816-2134-2024-45-3-385-395) (In Russ.)

**Для цитирования:** Егорихина М.Н., Рубцова Ю.П., Чарыкова И.Н., Линькова Д.Д., Фарафонтובה Е.А., Левичева Е.А., Алейник Д.Я. Способ определения жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток в составе тканеинженерных конструктов в процессе регенерации: экспериментальное обоснование эффективности. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2025;14(3): 51-61. DOI: [10.17802/2306-1278-2025-14-3-51-61](https://doi.org/10.17802/2306-1278-2025-14-3-51-61)

**To cite:** Egorikhina M.N., Rubtsova Yu.P., Charykova I.N., Linkova D.D., Farafontova E.A., Levicheva E.A., Aleinik D.Ya. Method for determining the viability of mesenchymal stem cells in tissue-engineered structures during regeneration – experimental substantiation of efficiency. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2025;14(3): 51-61. DOI: [10.17802/2306-1278-2025-14-3-51-61](https://doi.org/10.17802/2306-1278-2025-14-3-51-61)