

*Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю.,
Осипенко А.В., Макеев О.Г., Сазонов С.В.,
Мещанинов В.Н., Вечкаева И.В., Сырнев В.А.*

ОБ УЧАСТИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет»,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Проблема клеточного восстановления после воздействия экстремальных факторов является одной из ключевых и важнейших задач современной регенеративной медицины.

Исследования патофизиологов УГМУ в этом направлении объединяет то, что они были основаны на идеях чл.-корр. РАН проф. А.П. Ястребова и получили дальнейшее развитие в работах ряда теоретических кафедр нашего Университета.

Так, на кафедре патофизиологии под руководством А.П. Ястребова выполнен цикл фундаментальных работ (Д.Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова), посвященных изучению роли ММСК в регуляции регенераторных процессов и оценены возможности их клинического применения.

Проведена оценка влияния аллогенной сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), выделенных из плаценты, на регенерацию быстрообновляющихся тканей в физиологических условиях, а также после воздействия экстремальных факторов. Проведенные экспериментальные исследования позволили определить минимальную эффективную дозу ГСК при проведении сочетанной трансплантации с ММСК.

Было показано, что в физиологических условиях при старении организма сочетанная трансплантация ММСК и ГСК приводит к уменьшению содержания цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани, а также к снижению выраженности апоптоза в эпителии тощей кишки. Доказана способность сочетанной трансплантации активировать эритропоэз как в зрелом, так и в старом организме. Установлена способность сочетанной трансплантации ММСК и ГСК увеличивать количество клеток в криптах слизистой оболочки тощей кишки. При этом механизм данного увеличения у зрелых и старых животных существенно отличается. В зрелом организме увеличение количества эпителиоцитов крипт обусловлено стимуляцией пролиферативной активности, в то время как в старом организме — ингибированием выраженности апоптоза.

Получены оригинальные данные о влиянии сочетанной транспланта-

ции ММСК и ГСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей в условиях воздействия ионизирующего излучения, а также после острой кровопотери, что дало основание для получения соответствующих патентов (15 патентов). Показано, что уже в ранние сроки после воздействия экстремальных факторов сочетанная трансплантация ММСК и ГСК у старых и зрелых лабораторных животных вызывает снижение содержания цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани, а также приводит к активации эритропоэза и гранулоцитопоэза.

Такоже было доказано, что механизмы регенерации красной и белой пульпы селезенки у зрелых и старых животных после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК имеют свои особенности.

Проведенные исследования позволили установить, что в слизистой оболочке тощей кишки данная трансплантация клеток в условиях воздействия экстремальных факторов приводит к увеличению клеточной популяции крипт. Однако механизм этих изменений, как и в физиологических условиях, различный. У зрелых животных после воздействия ионизирующего излучения увеличение клеточной популяции крипт обусловлено стимуляцией пролиферативной активности клеток и угнетением выраженности апоптоза, в то время как в старом организме этот результат был достигнут за счет снижения апоптоза эпителиоцитов крипт.

Обнаружены различия в механизмах действия сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на регенерацию красной и белой пульпы селезенки обеих возрастных групп после острой кровопотери. У зрелых животных происходит восстановление лимфоидной ткани, а также клеточности красной пульпы за счет гранулоцитарных и эритроидных элементов. В то же время у старых животных в силу менее выраженной способности КОЕс к хоумингу в белой пульпе подобный эффект не развивается, а восстановление красной пульпы ограничено увеличением содержания эритроидных клеток.

Полученные данные о влиянии сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на быстрообновляющиеся ткани свидетельствуют о различном механизме восстановления регенерации в зависимости от возраста, а также вида воздействия.

Следующее направление исследований основано на патофизиологическом подходе к клеточно-метаболическим антивозрастным технологиям в геронтологии и гериатрии, разрабатываемым на кафедре биохимии под руководством профессора В.Н. Мещанинова.

Он предполагает использование комплекса морфо-функциональных и биохимических методов для изучения процесса старения в условиях нормы и при моделировании патологии в эксперименте, ускоряющей процессы старения, а также исследования на пациентах с характерной для

ускоренного старения полиморбидностью и в условиях коррекции этих возраст-зависимых патологических состояний, процессов и заболеваний.

Так, при иммобилизационном стресс-воздействии обнаружены фазные изменения процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в системе крови лабораторных крыс: с увеличением возраста у старых крыс происходит более ранняя активация процессов перекисного окисления липидов. Выявлено, что нейромедиаторы вегетативной нервной системы участвуют в изменениях интенсивности перекисного окисления липидов: с возрастом в системе крови крыс наблюдалось ослабление влияния парасимпатической нервной системы и усиливалось – симпатической. Коррекция сочетанным введением L-триптофана и никотиновой кислоты при стресс-воздействии у зрелых и старых крыс проявляется в виде антиоксидантного эффекта; у старых крыс - введение сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты нормализует липопротеидный состав крови, демонстрируя гиполипидемический геропрофилактический эффект.

При введении мезенхимальных полипотентных стволовых клеток лабораторным животным увеличивается продолжительность их жизни на 8%, ($p < 0,05$).

Применение неспецифических индукторов стволовых клеток, таких как L- аргинин, интерлейкин-2 у животных и человека при патологии нормализует метаболизм, активизирует клеточную пролиферацию, а у пациентов с полиморбидной патологией снижает биологический возраст, что сопровождается увеличением содержания гемопоэтических стволовых полипотентных клеток в периферической крови (по маркеру CD34+).

Коррекция пациентам зрелого возраста клеточно-оринтированными олигопептидами клеток сосудов головного мозга (лиз-глу-асп, БАД «везу-ген») и нейроцитов ЦНС (глу-асп-арг, БАД «пинеалон», характеризуется анаболическим эффектом, улучшает деятельность ЦНС и других жизненно важных органов и может реализоваться через цито-протекторные (CD34+), а также метаболические механизмы. Наибольшую геропрофилактическую эффективность выявило комплексное использование одновременно обоих олигопептидов по разработанной нами схеме с чередующимся приемом, они могут применяться как геропрофилактические средства норадренергического нейро-вазо-протекторного типа у пациентов с полиморбидной ЦНС-акцентированной патологией в стадии ремиссии, желательно в сочетании с гипохолестеринемической терапией. Нами в значительной степени обоснован механизм геропрофилактического действия олигопептидов, который, вероятно, включает в себя не только влияние на геном стволовых клеток, нейронов, клеток сосудов головного мозга, но и сопровождается метаболическими адаптивными перестройками в организме белково-липидного анаболического и аэробно-катаболического характера, непо-

средственным или опосредованным транс-гематоэнцефалическим ангио-, нейронально-клеточным воздействием стволовых гемопоэтических клеток на ЦНС.

В исследованиях на лабораторных животных и человеке зрелого и старого возраста также установлено, что возраст-зависимые показатели (концентрация основных метаболитов и активность регуляторных клеточных ферментов углеводного, белкового, липидного обмена, содержание форменных элементов в крови, маркеров стволовых полипотентных мезенхимальных и гемопоэтических клеток периферической крови CD34+, CD45+, психофизиологические тесты) демонстрируют несколько типов изменений при действии экстремальных факторов, преморбидной патологии, а также корригирующее влияние геропротекторов.

Лабораторные животные и пациенты с полиморбидной патологией зрелого возраста лучше поддаются геропротекторным воздействиям, чем в аналогичных условиях - пожилого и старого возраста. У геропротекторов и геропрофилактических воздействий обнаружены общие и специфические клеточные, метаболические и клеточно-метаболические механизмы действия.

В ранних работах, выполненных на кафедре гистологии под руководством проф. С.В. Сазонова, показана важная роль лимфоцитов в регуляции регенераторных процессов. Так, после выполнения односторонней нефрэктомии в почечной ткани коллатеральной почки перед стимуляцией регенераторных процессов достоверно увеличивается число лимфоидных клеток. Максимальное увеличение числа межэпителиальных лимфоцитов обнаружено через 32 часа после выполнения операции, непосредственно перед развитием пролиферативного ответа в клетках почечного эпителия оставшегося органа. В ранние сроки увеличивается доля клеток с низким содержанием в них РНК. Лимфоциты с такими цитохимическими характеристиками проявляют повышенную тропность к активно регенерирующим тканям и принимают участие в стимуляции пролиферативных процессов. Одновременно с инфильтрацией ткани почки количество лимфоидных клеток с таким же цитохимическим профилем увеличивается в селезенке. При этом изменения в содержании РНК в них обусловлено не уровнем ее биосинтеза в клетках, а изменением баланса функционально различных субпопуляций лимфоцитов.

При электронно-микроскопическом исследовании в оставшемся органе в ранние сроки после выполнения нефрэктомии определяется большое число межклеточных контактов между лимфоидными клетками и эпителиальными клетками почечных канальцев. Взаимодействие лимфоцитов наблюдается в основном с теми клетками, в которых затем выявляется всплеск пролиферативных процессов — клетки эпителия проксимальных почечных канальцев и подоцитах. При электронно-микроскопическом

исследовании остатка печени после выполнения ЧГЭ через 17 часов после операции также обнаружен тесный контакт лимфоцитов с гепатоцитами: сначала сливаются гликокалексы клеток, затем фрагментируются плазматические мембраны, которые в некоторых участках сливаются и образуют микротоннели. Подобные же межклеточные контакты обнаружены и между лимфоидными клетками и ретикулоэндотелиальными клетками (клетки Купфера). В то же время до сих пор не показано наличие обмена биологически активными веществами между контактирующими клетками и не установлена их природа. На фоне увеличения митотической активности в ткани печени число межэпителиальных лимфоцитов продолжает увеличиваться, а в более поздние сроки (через 72 часа после ЧГЭ) — начинает снижаться и в дальнейшем постепенно уменьшается до исходных величин. В это же время на фоне уменьшения митотического индекса в печеночной ткани практически отсутствуют межклеточные контакты между лимфоцитами и гепатоцитами, также как и в печени контрольных (интактных) и ложнооперированных животных. Подобные же межклеточные контакты обнаруживаются между лимфоцитами и эпителиальными клетками при язве желудка в процессе регенерации ее слизистой.

В более поздних исследованиях, выполненных в иммуногистохимической лаборатории (зав. проф. С.В. Сазонов) показано, что миелолейкоз человека переносит лишь небольшая часть клеток со свойствами ОСК. Эти клетки были охарактеризованы по поверхностным антигенам как CD34+ /CD38-. В общей популяции опухолевых клеток доля клеток с таким фенотипом составляла лишь 0,1 %, но именно эти клетки при введении NOD/SCID мышам размножались и дифференцировались с образованием лейкозных клеток разных типов (разной стадии дифференцировки), соответствующих исходному лейкозу. В то же время введение NOD/SCID мышам опухолевых клеток с другим фенотипом к развитию заболевания не приводило. Таким образом, опухолевые клетки CD34+ /CD38- обладали всеми уникальными свойствами, присущими нормальным кроветворным СК.

При использовании той же методологии при раке молочной железы показано существование опухолевых стволовых клеток и в солидных опухолях. В этом исследовании доказано, что только клетки с определенным фенотипом — CD44+ CD24-/low ESA+ (ESA — epithelial-specific antigen — специфический для эпителиальных клеток антиген) — были способны индуцировать рак молочной железы человека у иммунодефицитных мышей. При этом развитие опухоли наблюдали при введении всего лишь единичных (до 200) таких клеток, в то время как введение даже нескольких десятков тысяч клеток рака молочной железы, не обладающих таким фенотипом, не индуцировало развитие опухоли.

Кроме этого, определяется цитокератиновый спектр клеток опухоли

для определения направления дифференцировки опухолевых стволовых клеток в основную массу клеток опухоли.

Исследования различных опухолей человека, проведенные с использованием описанного подхода, позволили сделать следующие важные выводы:

1) В каждой опухоли присутствует лишь очень небольшая доля опухолевых стволовых клеток, то есть клеток, способных индуцировать опухоли человека при введении иммунодефицитным мышам.

2) Опухолевые стволовые клетки имеют определенные поверхностные маркеры, что позволяет успешно и воспроизводимо выделять их из общей массы опухолевых клеток с помощью проточной цитофлуориметрии или с помощью различных вариантов иммуногистохимии.

3) Опухоли, развивающиеся из опухолевых стволовых клеток, содержат смешанную популяцию туморогенных и нетуморогенных клеток, соответствующую гетерогенному клеточному составу исходной опухоли.

Результаты выполненных научно-исследовательских работ в 2015 г. вошли в клинические рекомендации Российского общества онкомаммологов по диагностике и лечению рака молочной железы.

В лаборатории технологий клеточной и генной терапии (зав. гл.н.с., проф. О.Г. Макеев) ряд инновационных технологий проходят доклиническую или клиническую фазы испытаний. Это клеточные и генные технологии, разрабатываемые для заместительной терапии заболеваний, плохо поддающихся или не поддающихся лечению общепринятыми методами (нейротрофические язвы при сахарном диабете, коррекция возрастных изменений кожи, создание кожных эквивалентов в комбустологии, лечение рубцовых изменений соединительной ткани). Основная цель этих разработок — завершение инновационных циклов создания готовой высокотехнологичной продукции.

Новому перспективному направлению фундаментальных исследований лаборатории положило начало установление договорных отношений с ведущими зарубежными научно-практическими центрами: Институтом рака Дана-Фабера (Бостон), Медицинским институтом Говарда Хьюза (Нью-Йорк), Университетом Джона Хопкинса (Мериленд), Центром Диабета Джослин (Бостон), Национальным институтом рака (NCI), Национальным институтом заболеваний сердца, легких и крови (NHLBI, Вашингтон), Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID), Рокфеллеровским университетом (Нью-Йорк), Медицинской школой Гарварда, Кембриджским институтом биомедицинских исследований, Университетским медицинским центром Гронингена (Нидерланды).

Научное направление инициировало исследования в области генотерапии сосудистой недостаточности, недостаточности функций печени, создания противоопухолевых препаратов нового поколения, репрограммирова-

ния дифференцированных человеческих клеток в тотипотентные стволовые клетки, получение их в достаточном количестве и применение для восстановления любой из 350 тканей нашего организма в аутогенном варианте, исключаящем отторжение.

В заключение следует отметить, что комплексный подход в исследовании роли стволовых клеток и лимфоцитов позволил получить принципиально новые экспериментальные данные об их эффективности в качестве регуляторов регенераторных процессов и открывает перспективы для применения в клинической практике.

*Владимиров А.П.^{1,2}, Бахарев А.А.¹, Михайлова Ю.А.^{1,2},
Алимов А.В.¹, Артемкина И.Ю.¹*

АКТУАЛЬНОСТЬ ИННОВАЦИОННОГО РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕТОДА ПРЯМОГО НЕРАЗРУШАЮЩЕГО КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

¹ ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,

² ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
Екатеринбург, Российская Федерация

На современном этапе чрезвычайно актуальной задачей для Российской Федерации является формирование инновационной политики в области разработки передовых технических решений и технологий, позволяющих применять их в различных сферах деятельности, в том числе и в решении вопросов эпидемиологической безопасности страны. При этом немаловажным является создание условий для поиска инновационной продукции и технологий и определение возможности их последующего практического внедрения и применения.

Одним из активных инструментов в данном направлении можно отметить проведение ежегодной международной выставки «День инноваций Министерства обороны Российской Федерации», одновременно, начиная с 2013 года, в четырех регионах России — Москва, Ростов-на-Дону, Екатеринбург и Хабаровск.

Включение в список тематических разделов дополнительно направления «Медицина. Биотехнологии» позволило принять участие в выставке научным сотрудникам ФБУН «Екатеринбургский научно-