

содержании общего белка не отмечено. Однако у опытных животных обеих групп произошло достоверное повышение уровня альбуминов. В контрольной группе в ходе опыта повысилось содержание β -глобулинов, что может отмечаться при токсических гепатитах. В опытных группах достоверных различий по содержанию β -глобулинов не выявлено.

Для токсикологического анализа ежемесячно проводили контрольный убой 5 бычков из каждой группы. Как показали исследования, дополнительное введение в рацион ферроцина и БИФЕЖ^к оказало положительное влияние на продуктивность бычков. У опытных животных отмечено улучшение поедаемости кормов. Уже через 10 дней после введения в рацион ферроцианидосодержащих препаратов улучшилось состояние шерстного покрова, животные были гладкие, блестящие. У животных, получавших БИФЕЖ^к, прирост живой массы был на 18,8 % выше, чем у контрольных. Установлено, что больший эффект дает применение данных препаратов на заключительной стадии откорма.

МЕХАНИЗМЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ФИБРОБЛАСТИЧЕСКОГО ДИФФЕРОНА, ОБОГАЩЕННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, НА ТЕМПЫ ЗАЖИВЛЕНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

Зверева А.Е., Васильева М.С., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Каракина Ю.В., Васьков В.Н.

Научный руководитель – д.м.н., профессор Макеев О.Г.

ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрава
ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий» ГКБ №40

В мире насчитывается более 250 млн. больных сахарным диабетом (СД), у которых в течение жизни в 15% случаев образуются нейротрофические язвы нижних конечностей (диабетическая стопа). Из их общего числа до 24% подвергаются ампутации. Таким образом, более 9 млн. человек в мире ежегодно становятся инвалидами.

Наличие нейротрофических язв у больных СД проявляется постоянным или периодически возникающим болевым синдромом, ограничением подвижности и при инфицировании – воспалением, являющимся основным показанием для ампутации [2].

Необходимость поиска новых методов лечения объясняется, с одной стороны, неуклонным ростом численности больных сахарным диабетом, их пожилым возрастом, и, как правило, наличием сопутствующей патологии. С другой стороны, у пациентов на момент обращения уже имеются глубокие склеротические изменения сосудов, обширные язвенные поражения с явлениями экзематизации и дерматита, при которых оперативное лечение противопоказано, а патогенетическая терапия сосудистых нарушений неэффективна.

Культивирование и трансплантация клеток – активно развивающаяся область биомедицины. В настоящее время можно выделить два основных подхода к лечению дефектов кожи с помощью препаратов, содержащих нативные фибробласты. Широко распространены получили технологии лечения дефектов кожи раневого и ожогового характера с использованием культур аллогенных фибробластов. Этот метод достаточно удобен, поскольку при лечении обширных ожоговых повреждений важно получить необходимое пациенту количество живых клеток за короткий период времени. Однако применение аллогенных фибробластов, как правило, сопровождается распадом генетически чужеродных клеток и отсроченной реакцией отторжения трансплантата. В США данная технология разрешена FDA и реализуется в виде коммерческих продуктов Apligraf (Organogenesis Inc.) и Dermagraft (Adv. Bioh. Inc.) с объявленной эффективностью лечения язв нижних конечностей при СД от 56 до 71% в течение 12 недель [8]. Альтернативой этого подхода является использование собственных фибробластов человека, способных встраиваться в кожную рану, для заместительной терапии дефектов кожных покровов. В свою очередь, проблема энграфмента аутогенных клеток в лишенную адекватного кровоснабжения нейротрофическую язву должна быть обеспечена высоким пролиферативным потенциалом трансплантируемых клеток и трофической подложкой, обеспечивающей его поддержание.

Цель исследования: разработать эффективную технологию лечения нейротрофических язв у больных СД с использованием аутогенных культивированных клеток.

Материалы и методы.

Основанием для проведения испытания явилось одобрение протоколов локальным этическим комитетом ГКБ № 40 г. Екатеринбурга.

Отбор пациентов проводился при наличии добровольного информированного согласия, подписанного пациентом, на основании анамнестических данных, результатов врачебного осмотра, лабораторных исследований на предмет контаминации инфекционными агентами (ВИЧ, СМВ, гепатиты, мико- и токсоплазма (AxSYM, Abbott laboratories)).

Испытание технологии проведено у 10 пациентов с СД II типа тяжелой степени. Средний возраст пациентов составил 65,16 лет (от 50 до 79 лет). Стаж СД – 8,16 лет (2 - 25 лет). При обследовании у всех пациентов были выявлены осложнения СД – диабетическая микроангиопатия нижних конечностей и

выраженная полинейропатия.

Критерием включения в испытание являлось наличие язвенного дефекта площадью не менее 35x10 мм (на стопе) и 65x50 мм (на голени) в течение 6 и более месяцев, и безуспешность консервативного лечения.

Забор эксплантата выполняли независимо от стадии раневого процесса под проводниковой анестезией. Эксплантацию кожи и подлежащей подкожно-жировой клетчатки производили с ягодичной области на 7-8 см ниже крыла подвздошной кости, эксплантат помещали в раствор PBS, содержащий двукратные концентрации культуральных антибиотиков, хранили при температуре 4°C не более 12 часов.

Клетки культивировали при 37°C, концентрации CO₂ 5% и 95% влажности по оригинальной методике [4]. Кроме культивирования клеток кожи из незначительного количества подкожно-жировой ткани (ЖТ) ферментативным способом извлекали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) с целью получения воспроизводимой клеточной линии. Ограниченный объем ЖТ обеспечил возможность получения трех таких линий: испытуемых №№ 2, 4 и 5. Принадлежность ММСК к стволовому пулу была подтверждена дифференцировкой клеток в фиброгенном, хондрогенном и остеогенном направлениях [5].

В период культивирования и наращивания клеточной массы (в среднем 37,6 суток) рану санировали с использованием стандартного перевязочного материала и атравматических повязок. В одном случае в клеточной культуре испытуемого была выявлена ДНК микоплазмы, в связи с чем, данная культура была выбракована, а культивирование повторно изъятых эксплантатов осуществлялось с добавлением в среду 20-кратной (от культуральной) концентрации противопаразитарного антибиотика тилозина (Sigma), что привело к деконтаминации культуры к третьему пассажу.

Всем пациентам до трансплантации клеток проведена коррекция сахароснижающей терапии для достижения субкомпенсированного состояния по углеводному обмену. Необходимым условием для трансплантации клеток являлось наличие «чистого» язвенного дефекта (количество микробных тел не более 150 на см²) и активных грануляций. Пациентам с локализацией язвы на стопе осуществлялась иммобилизация конечности с использованием разгрузочной повязки.

Для определения площади раневого дефекта использовали формулу вычисления площади круга: $S = \pi R^2$. При неровности краев раны за радиус принимали среднее значение, получаемое путем сложения самого большого и самого малого радиусов дефекта с последующим делением полученного значения на два.

В рамках реализации программы безопасности перед клеточной терапией выполняли трехэтапный контроль полученных клеточных линий на вероятность наличия мутаций генов p53, k-ras, b-raf [6]. Одновременно, среди клеток, собранных с культуральных поверхностей, определяли долю Stro-1 позитивных клеток иммунофлуоресцентным методом.

С целью обеспечения возможности повторного терапевтического применения полученных клеточных линий часть клеток криоконсервировали по стандартной методике [3].

При проведении испытаний было предпринято обогащение культур дермальных фибробластов линиями ММСК в аутогенном варианте. При этом доля Stro-1-позитивных клеток в культурах пациентов №№ 2, 4, 5 возросла десятикратно – до 0,6%. Трансплантация обогащенных культур в клинике ГКБ № 40 производилась «слепым» методом с обязательным прохождением всех этапов предтрансплантационного контроля.

Для однократного нанесения на раневую поверхность использовали клеточную суспензию, содержащую не менее $8 \cdot 10^6$ живых клеток. Количество наносимых клеток варьировало в зависимости от величины язвенного дефекта. Для фиксации клеток на поверхности язвы использовали аутологичную фибриновую подложку, обогащенную тромбоцитами, и специальную повязку, обеспечивающую «влажное» заживление раны. Изготовление аутологичной фибриновой подложки производилось непосредственно перед трансплантацией посредством центрифугирования крови пациента с последующим нагреванием сгустка до образования пленки.

Заживление язвы отслеживали в динамике на протяжении 26 недель.

Результаты и их обсуждение

По прошествии первой недели после клеточной трансплантации сокращение язвенной поверхности более чем на 50% наблюдалось у половины пациентов (среднее арифметическое сокращения язвенного дефекта составило 45,5%). При этом у пациентов с трансплантацией культур, обогащенных ММСК, через семь дней зафиксировано уменьшение площади язвы на 75% (испытуемый № 2), 50% (№ 4) и 85% (№ 5). К концу третьей недели у пациента № 4 зафиксировано полное заживление язвы, а у восьми – сокращение язвенной поверхности более чем на 60%. Спустя шесть недель у испытуемого № 5 была отмечена полная эпителизация раны, у № 2 – закрытие площади язвы на 98%, а у остальных пациентов – от 58 до 80%. К концу второго месяца у пациента № 2 наблюдалось полное заживление. К одиннадцатой неделе у 7 из 10 пациентов зафиксировано полное закрытие раневых дефектов, еще 2 находились на завершающем этапе заживления. Окончательная эпителизация у 9 пациентов была подтверждена к 21 неделе наблюдения. У одной пациентки на этом сроке наблюдалось 75% заживления. Полная эпителизация язвенного дефекта у данной испытуемой не была достигнута в связи с нарушением рекомендованной методики (использование для закрытия раневой поверхности сорбирующей марлевой повязки).

В одном случае через 6 дней после нанесения клеток у пациента отмечалось повышение температуры до фебрильных цифр. При проведении посевов раневого отделяемого выявлен рост *Staphylococcus aureus*, что потребовало назначения антибиотиков широкого спектра действия. Других осложнений у испытуемых не выявлено. Аллергических реакций за время исследования отмечено не было.

Средняя продолжительность лечения (с момента трансплантации аутофибробластов до эпителизации раны) при локализации язвы на стопе составила 9,5 недель, при локализации на голени – 19,3 недели. При этом средние сроки заживления при использовании обогащенных ММСК культур в аутогенном варианте, составили $4,5 \pm 1,5$ недели.

После эпителизации язвы проводился ежемесячный контроль состояния рубца в течение 6 месяцев. Рецидивов заболевания за период наблюдения не отмечено.

При разработке технологии лечения язвенных дефектов нижних конечностей при СД принципиальным вопросом является механизм ускорения репарации кожного дефекта под влиянием наносимых на рану клеток – за счет продуктов распада или посредством встраивания в область повреждения.

Активация заживления по первому механизму характерна для использования генетически чужеродных клеток фибробластического дифферона с результативностью по данным литературы от 56 до 71% к двенадцатой неделе. Сопоставимой по срокам заживления являются технологии с применением аутогенных клеток, подвергающихся деградации в условиях агрессивной раневой среды. Триггерный эффект трансплантированных клеток может быть выраженным и достаточным для активации собственных клеток реципиента за счет высокого пролиферативного потенциала клеточного пула, и связанных с клетками гуморальных факторов культуральной среды. В свою очередь, применение клеток со свойствами стволовости способно обеспечить существенно большую эффективность репарации за счет встраивания в раневую поверхность и замещения поврежденных клеточных структур посредством дифференцировки, направление которой определяется превалирующими элементами культуры – клетками фибробластического дифферона [9, 11, 12, 13].

Более ярко выраженный репаративный эффект может быть объяснен Дифференцировкой ММСК в клетки эктодермального происхождения благодаря наличию полного внутриклеточного резерва мРНК, у стволовых клеток, обеспечивающего проявление их эпителиального фенотипа в зависимости от клеточного микроокружения [1, 7, 10]. Этот механизм позволяет объяснить не только ускоренное формирование дермального слоя кожи, а также эндотелиальной, соединительной и мышечной тканей питающих сосудов (в рамках направления органогенеза), но и эпителия (в обход органогенеза), что должно сопровождаться ускорением эпителизации раны.

Поддержание высокой пролиферативной активности ММСК с сохранением постоянства их пула при асимметричном делении и используемая нами аутогенная трофическая подложка (кровяной сгусток, служащий средой кондиционирования клеток), обогащенная тромбоцитами, увеличивает способность к репарации. При этом выделение тромбоцитарных факторов роста, активирующих ММСК, обеспечивает высокий пролиферативный потенциал клеточного трансплантата.

Полученные результаты по лечению нейротрофических язв у больных СД II типа тяжелой степени свидетельствуют о том, что обогащение ММСК культивируемых фибробластов и их применение в аутогенном варианте, по сравнению с использованием клеток фибробластического дифферона, сопровождается двукратным ускорением процесса заживления раны. Это подтверждает предположение об участии ММСК в формировании дермального и эпителиального слоев кожи, а также сосудистого русла, предупреждающего повторное язвообразование.

Выводы

Нанесение на поверхность язв при диабетической стопе культивированных дермальных фибробластов, обогащенных ММСК, в аутогенном варианте, сопровождается значительным усилением эпителизации ран по сравнению с использованием небогатых культур. Это позволяет предполагать ММСК-опосредованную активацию энтрафмента трансплантированных клеток и дифференцировки в области повреждения, их пролиферацию с ускоренным замещением зоны тканевой деструкции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бозо И.Я.. Паравульнарные ткани – новый источник ММСК? //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2008. - Том III. - № 4. - с. 17-19.
2. Васютков В.Я. Проценко Н.В. Трофические язвы стопы и голени //Медицина. - 1993. - с. 160.
3. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. с соавт. Перспективы применения аутогенных клеток для коррекции изменений кожи //Вестник УГМА. - 2006. - № 15. - с. 22-38.
4. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. Патент № 2345781 «Способ получения культуры клеток кожи». //Бюллетень изобретений №4, 10.02.2009.
5. Макеев О.Г., Зубанов П.С., Улыбин А.И., Медведева С.Ю. Возможность получения трехмерной конструкции хряща из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. (статья) / Вестник Уральской академической Науки. – Екатеринбург, 2008. С. 70-73.
6. Макеев О.Г., Буханцев В.А., Е.С.Куликов, И.Х. Измайлов, С.В. Костоюкова, А.И. Улыбин, П.С. Зубанов, А.А. Тарасевич. Мониторинг мутаций генов-супрессоров и протоонкогенов в структуре безопасности применения клеточных технологий. (статья) / Вестник Уральской медицинской академической науки. – Екатеринбург, 2006. №2. С. 15-22.
7. Репин В.С., Сабурин И.Н.. Обратимые эпителио-мезенхимальные трансформации клеток в эмбриогенезе и постнатальном обновлении тканей //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2006. - № 3(5). - с. 64-72.

8. Batoool Kazmi, PhD; Christopher J. Inglefield, FRCS (Plast); Mark P. Lewis, PhD Autologous Cell Therapy: Current Treatments and Future Prospects //Wounds. 2009 VOLUME: 21 PUBLICATION DATE: Sep 15 2009 pp234-242
9. Prockop S.J., Gregory C.A., Spees J.L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2003. - vol. 100. - p. 11917-23.
10. Seshi B., Kumar S., King D. et al. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells a evidenced by single-cell microarray analysis //Blood Cells Mol. Dis. - 2003. - vol. 31. p. 268-85.
11. Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J. Et al. Differentiation. cell fusion and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2003. - vol. 100. - p. 2397-402.
12. Wang G., Bunnell B., Painter R.G. et al. Potential of BM-MSC for cystic fibrosis therapy //Mol. Therapy - 2004. - vol. 9. - Suppl. 1. - p. 195-205.
13. Wang G., Bunnell B., Painter R.G. et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2005. - vol. 102. - p. 188-91.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Зорников Д. Л.

Научный руководитель - д.м.н., профессор Сергеев А. Г.

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО УГМА Росздрава

Актуальность проблемы развития устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) к антиретровирусным препаратам обусловлена постоянно возрастающим количеством ВИЧ-инфицированных пациентов, нуждающихся в лекарственной помощи. Особую группу составляют ВИЧ-инфицированные беременные женщины, которым антиретровирусная терапия (АРТ) показана для снижения риска внутриутробного инфицирования плода.

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции используются препараты, которые подавляют репликацию ВИЧ в организме, ингибируя различные стадии цикла репродукции. В зависимости от точки приложения, данные препараты делятся на четыре класса: ингибиторы слияния вируса и клетки, ингибиторы обратной транскриптазы (ОТ), ингибиторы интегразы и ингибиторы протеазы. Наиболее широкое применение в практике получили два класса препаратов – ингибиторы ОТ и ингибиторы протеазы. Для эффективного подавления репродукции ВИЧ используют схемы лечения, включающие 2-3 препарата, как правило, из разных классов. В Свердловской области наиболее часто назначаются стандартные схемы из двух нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы и ингибитора протеазы или из двух нуклеозидных и одного нунуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы. Показателями эффективности лечения являются снижение «вирусной нагрузки» и стабилизация концентрации CD4 лимфоцитов в крови которая определяется через 6 месяцев после начала терапии.

Одной из особенностей ВИЧ, снижающей эффективность антивирусной терапии, является его высокая изменчивость. В настоящее время обнаружены многочисленные мутации в генах обратной транскриптазы и протеазы, приводящие к аминокислотным заменам, и изменяющие чувствительность вируса к антиретровирусным препаратам (табл. 1).

Таблица 1

Аминокислотные замены, ассоциированные с устойчивостью ВИЧ к антиретровирусным препаратам [3]

Препарат/комбинация	Мутация в гене	Аминокислотные замены
Zidovudine	ОТ	T21Y/F, Q151M, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V
Zidovudine	ОТ	Комбинация 3-х и более из перечисленных мутаций: M41L, D676N, K70R, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V, K219Q/E
Didanosine	ОТ	Q151M; L74V без любой из перечисленных далее мутаций: M41L, T69D, K70R, M184V/I, T215Y/F, K219Q/E; Вставка в 69 кодоне; K65R
Stavudine	ОТ	Q151M; V75M/S/A/T, T215Y/F; T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V; комбинация 3-х и более из перечисленных замен: M41L, D67N, K70R, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V, K219Q/E; Вставка в 69 кодоне