



1



2

Рис. 1. Результаты УЗИ-сканирования проблемной зоны кожи испытуемой Н. до (1) и через 6 месяцев после (2) трансплантации клеток. Зарегистрировано утолщение дермального слоя кожи в 2,2-2,5 раза.

Обсуждение результатов исследования

Практическое применение культур клеток для омоложения кожи в косметологии с использованием аутогенных фибробластов началось сравнительно недавно. Некоторым исключением можно считать американских патентообладателей технологии их применения, выполнивших несколько тысяч пересадок аутофибробластов пациентам и проследивших сохранение положительного эффекта на состоянии кожи пациентов в течение 4 - 8 лет после пересадки[2,3].

Стойкий клинический эффект наблюдали пользователи запатентованной Boss W. K. технологии, в частности Келлер Г., введивший аутогенные фибробласты кожи пациентам в возрасте 37-61 год, а так же Chernoff G. S., проследивший результаты применения аутофибробластов у 104 пациентов с эффективностью коррекции изменений кожи от 30 до 75% [1, 4].

Полученные нами результаты также продемонстрировали эффективность применения аутоклеток для улучшения состояния кожи взрослых пациентов, что согласуется с мировым опытом.

Положительный клинический эффект применения препаратов фибробластов у пациентов в возрасте 43 - 65 лет указывает на сохранение восстановительного потенциала аутофибробластов, что позволяет использовать их для коррекции изменений кожи. Предстоящие исследования в этом направлении должны быть нацелены на оптимизацию схем терапии, количества вводимых фибробластов и установление отдаленных результатов.

Выводы

1. В результате внутридермального введения культуры аутологичных фибробластов наблюдается исчезновение мелких и коррекция глубоких морщин, увеличение тургора и толщины кожи. Эффект носит нарастающий характер, достигает максимума через 15-21 месяцев после введения клеток и сохраняется в течение 3 лет. Осложнений после трансплантации аутофибробластов за период наблюдения не зарегистрировано.

2. Полученные результаты открывают возможность практического применения данного метода в терапевтической косметологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомб Ю., Тофт К., Ласк Г., Ревазова Е. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов // Бюл. эксп. биол. мед. - 2000. - том 130(8). - с. 203-206.
2. Boss W.K. Autologous dermal fibroblasts for the repair of skin and soft tissue defects // United States Patent 5,665,372. - September 9. - 1997.
3. Boss W.K. Jr. Use of autologous undifferentiated mesenchymal cells for the repair of skin and soft tissue defects // United States Patent 5,858,390. -January 12. - 1999.
4. Boss W.K., Usal H., Chernoff G.S., Lask G.P., Fodor P.B. Autologous cultured fibroblasts as cellular therapy in plastic surgery // Clinics in Plastic Surgery. - 2000. - vol. 27. - № 4. - p. 613 - 626.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОБЛАСТИ ЭКСПЛАНТАЦИИ КОЖИ КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ПОСТНАТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Улыбин А.И., Шуман А.Е., Коротков А.В.

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

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрав»

ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Положительный эффект, достигаемый после трансплантации постнатальных аутологичных фибробластов при лечении ряда заболеваний, до сих пор оставляет нерешенными многие вопросы. Прежде всего это относится к представлению об ограниченном восстановительном потенциале клеток стареющего

организма, целесообразность трансплантации которых с целью заместительной терапии по меньшей мере небесспорна.

Однако уже сейчас накапливаются сведения о том, что процесс старения в организме идет неравномерно и часть собственных клеток сохраняет способность к активному делению. Последнее относится к клеткам, прошедшим относительно меньшее число делений, то есть отстоящим от «барьера Хейфлика» на большую дистанцию, чем клетки, пережившие периоды интенсивного роста. Старение кожи в различных участках тела так же протекает с разной скоростью - особенно быстро стареют открытые участки и кожа в местах естественных складок.

Важное ограничение на выбор места взятия эксплантата накладывают данные о роли стромы в организации и поддержании архитектоники и функции органов тела. Показано, что фибробласты, в зависимости от места расположения, продуцируют различные факторы, определяющие направление дифференцировки и функцию мезенхимы органов, в том числе кожных покровов. В частности, это относится к наличию и плотности сальных, потовых желез, волосных фолликулов и пр. Кроме того, показано, что фибробласты даже после многочисленных пассажей в условия культуры «помнят» свое месторасположение в организме и сохраняют характер факторсекреторной активности.

В настоящее время очерчены 9 участков тела, фибробласты которых значимо отличаются по экспрессии 347 генов, определяющих структурно-функциональные особенности мезенхимы. Это покровы волосистой части головы, лица, корпуса тела, верхних и нижних конечностей, область промежности, наружных половых органов и стромы внутренних органов [1, 2]. По-видимому, на границах соприкасающихся участков наблюдается взаимопроникновение фибробластов, свойства которых характерны как для одного, так и другого региона.

Изложенное позволило сформулировать цель работы - определение области взятия эксплантата кожи для повышения эффективности заместительной терапии с использованием культивированных фибробластов в аутогенном варианте.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено с учетом международных норм GLP (кодекс правил для лабораторных исследований) и GCP (кодекс правил для клинических испытаний). Протокол испытаний одобрен этическим комитетом и утвержден Ученым советом ГОУ ВПО УГМА Росздрава.

При проведении доклинического этапа работы использовали образцы (эксплантаты) кожи 12 пациентов-мужчин в возрасте от 55 до 70 лет. В качестве контроля исследовали культуры клеток кожи предплечья 5 пациентов в возрасте 20-24 лет.

Образцы кожи для всех исследований отбирали при отсутствии противопоказаний и местном обезболивании. Эксплантаты помещали в солевой буферный раствор PBS (MP Biomedicals, США), содержащий двукратные культуральные концентрации пенициллина, стрептомицина, тилозина (Sigma, Германия) и амфотерицина В (MP Biomedicals, США) и сохраняли при 4 °С не более 12 часов. Среда для культивирования фибробластов включала: среды D-MEM (Sigma) - 60%, Ham's F-10 (MP Biomedicals) - 30% и фетальную бычью сыворотку степени очистки defined (HyClone, США) - 10%. Полученную смесь титровали до pH 7.3 при 5% CO₂ и фильтровали через стерилизующий ацетат-целлюлозный фильтр (диаметр пор - 0.2 мкм; Sarstedt, Германия). На начальном этапе культивирования в среду добавляли антибиотики в концентрациях: пенициллин - 100 ЕД/мл, стрептомицин - 100 мкг/мл, тилозин - 10 мкг/мл, амфотерицин-В - 2.5 мкг/мл (Sigma, MP Biomedicals, все антибиотики относятся к категории «для клеточных культур»).

Культивирование фибробластов проводили в инкубаторе Sanyo (Япония) при 37°С, 5% CO₂ и 95% влажности. Культуральную среду меняли 1 раз в 3 дня. Ежедневно производили микроскопический контроль за состоянием культуры с использованием темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.

После подсчета взвесь клеток заливали в вентилируемые культуральные матрасы (Sarstedt, Германия) из расчета 3 x 10⁷/см² культуральной поверхности/100 мкл. среды, и помещали в CO₂-инкубатор. Дальнейшее культивирование проводили при тех же условиях (смена среды, визуальный контроль) с пассажами клеток на матрасы, имеющие большую площадь. Культуру фибробластов выращивали до получения требуемой клеточной массы. По завершении культивирования клетки трипсинизировали, отмывали и использовали для исследования.

Подсчет клеток производили на гематологическом анализаторе Cobas Micros OT. Специфическую функцию фибробластов оценивали по включению в макромолекулы меченых селективных предшественников синтеза ДНК (2³С-тимидин), коллагена (L-U¹⁴С-пролин) и кислых ГАГов (D-6³Н-глюкозамин гидрохлорид). Для оценки количества теломер использовали сайтспецифичный олигонуклеотидный зонд (СССТАА)₃ с включением в структуру зонда меченого по тритию дезоксицитидина (все радиофармпрепараты Amersham Pharmacia Biotech). Радионуклиды с активностью 37 кБк/мл среды вносили на 75 см² матрасы одновременно с 0.5x10⁶ фибробластов из вторичной 30-ти суточной культуры. Эксперимент прерывали через трое суток культивирования, фибробласты снимали с матрасов раствором трипсина-версена по стандартной методике и подсчитывали на гематологическом анализаторе. Оценку количества теломер методом гибридизации проводили после выделения ДНК культивированных клеток и отжига цепей. Полученные комплексы осаждали на нитроцеллюлозных фильтрах (Sartorius, Германия). Подсчет радиоактивности производили в спиртолуоловом сцинтилятором на жидкостном сцинтиляционном счетчике Бета-2 (эффективность счета по углероду - 98%, по тритию - 56%). Результаты выражали в беккерелях на 10⁶ клеток.

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 3.04. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование параметров культур 30-суточных фибробластов свидетельствует о том, что в наших экспериментах получена популяция клеток, сохраняющая высокие потенции при длительном культивировании (таб. 1). Все исследованные культуры к 30 суткам находились в интенсивной фазе роста (увеличение количества клеток за 72 часа в 2-2,5 раза) и, независимо от возраста пациентов-доноров, активно синтезировали ДНК, коллагеновые волокна и высокомолекулярные ГАГи.

Таблица 1

Функциональные показатели функциональных параметров культивируемых клеток

Показатели	контроль	Области взятия эксплантатов								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Число исследованных образцов	5	10	8	7	4	9	6	15	6	5
Кол-во клеток, снятых с культуры (10^6 кл.)	$5,7 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,3$
Включение (СССТАА) ₃ в ДНК, (Бк/ 10^6 кл.)	$18,4 \pm 1,1$	$10,1 \pm 0,8^*$	$10,9 \pm 0,9^*$	$12,5 \pm 1,2^*$	$11,4 \pm 1,1^*$	$15,7 \pm 1,1^*$	$14,9 \pm 0,8^*$	$16,6 \pm 0,9$	$13,7 \pm 0,9^*$	$13,3 \pm 0,7^*$
Включение 2^{14} С-тимидина в ДНК (Бк/ 10^6 кл.)	$71,1 \pm 1,4$	$46,0 \pm 5,1^*$	$58,2 \pm 4,6^*$	$65,5 \pm 3,8^*$	$49,6 \pm 5,3^*$	$69,7 \pm 6,1^*$	$62,4 \pm 3,2^*$	$70,6 \pm 4,9$	$63,7 \pm 2,9^*$	$56,6 \pm 6,3^*$
Включение L- U^{14} С-пролина в коллаген (Бк/ 10^6 кл.)	$83,9 \pm 5,2$	$44,3 \pm 6,2^*$	$73,2 \pm 3,8$	$76,5 \pm 5,7$	$46,3 \pm 6,4^*$	$69,3 \pm 5,1^*$	$66,3 \pm 5,6^*$	$72,1 \pm 3,4$	$61,7 \pm 5,6^*$	$52,7 \pm 6,5^*$
Включение D- 6^3 Н-глюкозамина в ГАГи (Бк/ 10^6 кл.)	$4,9 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,2^*$	$4,1 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,2^*$	$4,8 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,2^*$	$3,8 \pm 0,1^*$

* - $p < 0,05$

1 – кисть, 2 – предплечье, 3 – плечо, 4 – голова, 5 – передняя брюшная стенка, 6 – спина, 7 – ягодичная область, 8 – бедро, 9 – голень.

Анализ результатов продемонстрировал выраженную зависимость активности фибробластов от области взятия биоптата. Так, клетки из биоптатов с кисти (тыльная, боковая и ладонная поверхности) отличаются достоверно меньшей синтетической активностью, низкими темпами образования коллагена и ГАГов. Повидимому, в основе различия показателей лежит возрастание в культивируемой популяции доли дегенеративных форм (до 18,4%), в частности фиброцитов, утрачивающих часть функций. Вероятно, наблюдаемые дегенеративные проявления связаны с ускоренным достижением клетками с открытых участков кожи лимита делений.

В отличие от образцов с открытых участков тела, параметры синтеза коллагена и ГАГов клетками, полученными с плеча, передней брюшной стенки и ягодичной области пациентов в возрасте 55-70 лет, существенно не отличались от свойств клеток пациентов в возрасте 20-24 лет. Однако клетки эксплантатов кожи плеча и передней брюшной стенки отличались от фибробластов контрольной группы достоверно меньшей синтетической активностью ДНК и гибридизации со свободными участками теломер. Так, длина теломер у фибробластов плеча был ниже контрольных значений на 23%, у клеток передней брюшной стенки – на 15%.

Одновременно функциональные параметры культивированных фибробластов из эксплантатов с ягодичной области соответствовали показателям контрольной группы практически по всем исследованным параметрам.

Следует отметить, что фибробласты ягодичной области в значительно большей степени, чем клетки других участков кожи экспрессируют ген Coll₁₁A₁. Синтезируемый коллаген данного типа играет роль своеобразного пептидного скелета дермы и определяет ее механическую прочность и упругость [2], что принципиально важно для обеспечения эффективности заместительной терапии возрастных изменений кожи с использованием клеток самого организма.

Выводы

1. Оптимальной зоной взятия кожного эксплантата для обеспечения эффективности косметической коррекции возрастных изменений кожи является ягодичная область. Эксплантация кожи с ягодичной области имеет преимущество среди прочих «закрытых» зон в связи с наибольшей выраженностью дермального слоя, что позволяет минимизировать травматичность процедуры взятия эксплантата.
2. Старение фибробластов кожи происходит неравномерно. Наиболее высокий темп старения имеют фибробласты открытых участков кожи. Клетки закрытых участков кожи стареют медленнее, о чем свидетельствует большая длина сохранившихся теломер. Наименьшими темпами старения отличаются фибробласты кожи ягодичной области.
3. Фибробласты ягодичной области, в отличие от аналогичных клеток прочих участков тела, активно синтезируют коллаген XI, который обеспечивает механическую прочность и эластичность кожи, что принципиально важно для обеспечения эффективности заместительной терапии возрастных изменений кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, et al.* Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts //Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 2002 Oct. – vol. 1.99.(20). – p. 12877-12882
2. *Rinn J.L., Chanda Bondre, Hayes B Gladstone, Patrick O Brown, and Howard Y Chang.* Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs //PLoS Genet. - 2006 July. – vol. 2(7). – 119-124

ОРГАНИЗАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ ПРИ ИНСУЛЬТАХ НА ДОГОСПИТАЛЬНОМ ЭТАПЕ

Урюпин П.А.

Научный руководитель – к.м.н., доцент Ефимова О.С.

Кафедра эпидемиологии УГМА

Острые нарушения мозгового кровообращения являются не только актуальной проблемой медицины, но и общества: они занимают второе-третье место в мире в общей структуре смертности и являются ведущей причиной инвалидизации взрослого населения. По данным исследователей заболеваемость инсультом составляет 2,5-3,0 случая на 1000 населения в год. К 2020 году распространенность цереброваскулярных заболеваний может увеличиться на 75%, а заболеваемость инсультом поднимется с шестого места на четвертое. Научно-обоснованное планирование и организация системы оказания специализированной медицинской помощи больным с инсультом являются необходимыми условиями снижения заболеваемости, смертности и летальности при данной патологии.

Цель исследования - изучение качества оказания медицинской помощи больным с инсультами на догоспитальном этапе.

Материалы и методы исследования

При выполнении работы использован метод ретроспективного эпидемиологического анализа. В качестве первичных материалов использовались сведения базы данных МУ «Станция скорой медицинской помощи» г. Екатеринбурга. Объем исследования составил 10436 больных. Статистическая обработка результатов исследования проводилась при помощи программы «Statistica – 6.0». Различия значений между группами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В г. Екатеринбурге выявлен ежегодный высокий уровень заболеваемости – 2,3-2,5 на 1000 взрослого населения.

В 2008 году на станции Скорой Медицинской Помощи (СМП) г. Екатеринбурга было зафиксировано 10436 обращения по поводу острого нарушения кровообращения (ОНМК). В 98,3% случаев выездным медицинским персоналом был поставлен диагноз 164 «инсульт, неуточненный как кровоизлияние или инфаркт», остальные диагнозы – 163 ишемический инсульт, 161 геморрагический инсульт, 160 субарахноидальное кровоизлияние – устанавливались в единичных случаях (по 0,5 – 1,5%).

Для сравнения, в г. Москве на Станции скорой и неотложной медицинской помощи им. А.С. Пучкова диагноз 164 «инсульт, неуточненный как кровоизлияние или инфаркт» выставляли в 82,1% случаев ($p < 0,05$). Нозологические формы 160, 161, 163 диагностированы значительно чаще: в 11,5% - ишемический инсульт, в 4,2% - геморрагический инсульт, в 2,2% - субарахноидальное кровоизлияние, ($p < 0,05$) [3].

В г. Екатеринбурге госпитализировано всего 63,6% больных с инсультом (в РФ варьируют от 26 до 100%) [5]. Обращает на себя внимание высокий удельный вес лиц, отказавшихся от госпитализации – 20,0%, что свидетельствует о недостаточной информированности населения о последствиях инсульта.

Анализ обращений в СМП в зависимости от времени начала заболевания показал, что в течение первого часа от начала развития инсульта обратились 32,8% больных, от 2 до 3 часов – 25,8%, от 3 до 6 часов – 10,8%, т.е. в периоде терапевтического окна обращалось 70,4% от числа зарегистрированных больных с инсультом.