ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРЕПАРАТА ДИПЛОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

А.А. Бахарев, Н.А. Шмелева, Т.Л. Бахарева, Ю.А. Михайлова,
О.В. Ладыгин, О.Ю. Гоголева
ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций»
Роспотребнадзора, г. Екатеринбург

Попытки использовать культивируемые вне организма фибробласты для терапевтических целей начали предприниматься вскоре после установления фактов, свидетельствующих о том, что нормальные фибробласты в культуре сохраняют диплоидный кариотип и имеют ограниченную продолжительность жизни, низкую экспрессию антигенов гистосовместимости, отсутствие онкогенных потенций. Аллогенные фибробласты оказывают непосредственное влияние на заживление ран и их эпителизацию, что показало возможность использования культивируемых вне организма фибробластов человека для терапевтических целей. Научные исследования и клинические разработки в данном направлении протекают очень интенсивно, что связано с общим подъемом клеточных технологий на основе стволовых клеток. В России начало работам по использованию клеточных культур для лечения поражений кожи было положено работами Саркисова и Алексеева в начале 90-х годов. В 1998 году в Екатеринбурге была внедрена программа «Разработка и внедрение новых биомедицинских методов». В процессе работы по программе была подобрана и исследована, прежде всего на животных, клеточная ЛЭЧ-4(81). Практика ее применения выявила высокую эффективность данного метода для лечения ожогов III степени, обморожений, длительно незаживающих язв, некоторых поражений кости и других травм, а также полное отсутствие нежелательных эффектов.

Однако в ходе работ были установлены и определенные недостатки живой культуры: малый срок хранения, сложности в транспортировке и применении, невозможность осуществить качественный контроль продукта. В то же время эксперименты, проведенные на животных, позволили сделать вывод, что основным фактором влияния культивированных клеток на процессы заживления ран

являются не сами клетки, а выделяемые ими биологически активные вещества (БАВ-ДК) (Ронь, Новикова). Это было подтверждено исследованием, проведенным С.Ю. Ковалевым по «стандартному методу идентификации личности», которое показало, что уже через 3 суток ДНК донора в ране реципиента не обнаруживается, что свидетельствует о биохимическом влиянии на течение процесса заживления.

Предпосылкой к разработке нового препарата стали предшествовавшие фундаментальные исследования регенераторного процесса, показавшие ключевую роль в нем фибробластов. Имеющиеся данные указывают, что фибробласты могут продуцировать коллагены I и II типов (Varga et al., 1987) и компоненты внеклеточного матрикса: ламинин, нидоген, тинасцин, хондроитин-4-сульфат, протеогликан (Halfter et al., 1990), фибронектин, некоторые факторы роста, а также другие вещества. В настоящее время имеется значительное число работ, свидетельствующих о большой роли факторов роста в эпителизации кожи. Факторы роста — это регуляторные пептиды (цитокины), вырабатываемые клетками различных типов, в значительной степени ускоряющие регенеративный процесс. Цитокины – это, как правило, гликозилированные полипептиды средней молекулярной массы (менее 30 кD).

Цитокины вырабатываются клетками иммунной системы и другими клетками (например, эндотелием, фибробластами и др.) в ответ на активирующий стимул (патогенассоциированные молекулярные структуры, антигены, цитокины и др.) и участвуют в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета, регулируя их силу и продолжительность. Некоторые цитокины синтезируются конститутивно. В большинстве случаев цитокины продуцируются и действуют на клетки-мишени, находящиеся в непосредственной близости (короткодистантное действие). Основное место действия цитокинов – межклеточный синапс. Цитокины различаются по строению, биологической активности и другим свойствам. Однако наряду с различиями цитокины обладают общими свойствами, характерными для данного класса биорегуляторных молекул. Для всех цитокинов характерна плейотропность, или полифункциональность действия. Так, проявление признаков воспаления обусловлено

влиянием ИЛ-1, ФНОα, ИЛ-6, ИЛ-8. Дублирование функций обеспечивает надежность работы системы цитокинов.

Фибробластами продуцируются многие факторы роста, такие как ФРФ, колониеобразующий, ТФР и целый ряд других цитокинов.

В то же время имеются работы, указывающие на аналогичность процессов, происходящих при репарационных процессах в организме и процессов, регулирующих рост клеток в культуре. Также отмечается идентичность веществ их контролирующих. Поведение клетки в организме определяется средой, непосредственно окружающей эту клетку. Такая микросреда состоит из компонентов трех типов: а) соседних клеток; б) внеклеточных поверхностей, с которыми контактирует клетка, например, поверхностей коллагеновых волокон и других волокон, выделяемых клеткой (так называемого внеклеточного матрикса) и в) жидкой среды: тканевой жидкости, крови и лимфы. В упрощенных условиях культуры клетки также окружены трехкомпонентной микросредой: жидким компонентом здесь является питательная среда, а среди внеклеточных поверхностей, наряду с волокнами матрикса, имеется внутренняя поверхность культурального сосуда – подложка культуры. Все поведение нормальной клетки определяется сигналами, получаемыми из микросреды (Васильев Ю.М.)

Проведенные ранее на животных исследования показали возможность эффективного применения препарата биологически активных веществ для лечения поверхностных поражений кожи, а также некоторых заболеваний вирусной этиологии. В связи с этим нами были предприняты исследования некоторых биологических свойств и белкового состава препарата биологически активных веществ, продуцируемых диплоидными клетками.

В этих условиях рассмотрение некоторых вопросов биохимического состава разрабатываемого препарата представляет определенный интерес для его последующего совершенствования.

Материалы и методы.

Использована клеточная линия ЛЭЧ-4 (81), ранее зарегистрированная как основа иммунобиологического препарата «Культуры клеток диплоидные человека для заместительной терапии». Клетки разрушали путем двукратного замораживания-оттаивания и ли-

офильно высушивали по методике, разработанной в институте на аппарате LZ-9.

Рассматривали 3 варианта высушенного препарата: клетки в ростовой среде, культуральная жидкость, клетки в среде Игла МЕМ.

Анализ уровня экспрессии генов цитокинов проводили методом электрофореза. Разделение исходного материала на фракции проводили методом хроматографии на оборудовании LKB с использованием Сефадекс А-100. Картины белковых спектров снимали на спектрофотометре Ultraspec-2100 с использованием УФ-проницаемых кювет.

Статистическую обработку проводили с помощью общепринятых программ.

Результаты и обсуждение.

Для общей оценки содержания ряда интерлейкинов в различных (вариантах) препарата был проведен их электофоретический анализ. Его результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Распределение показателей содержания интерлейкинов в различных фракциях препарата биологически активных веществ, продуцируемых диплоидными клетками

Интерлейкины / Серии препарата	Ифн α	Иф 1β	Ил 1β	Ил 2	Ил 4	Ил 6	Ил 8	Ил 10	Ил 12	Ил 18	α ФНО	β актин (контроль)
1. полный препарат	+++	+++	+++	+++	+++++	+++	+++++	++++	++++	+++	+++	++++
2. клеточный лизат	++++	+++	+	+	+	++	±	+++	++	+++	++++	++++
3. культуральная жидкость	+++	+	-	++++	++++	+++	++++	++++	+++	++	++	++++

Из таблицы видно, что часть интерлейкинов распределяется преимущественно либо внутриклеточно (ИФНα Ил1β,), либо внеклеточно (Ил2, Ил4, Ил6, Ил8, Ил12). Таким образом, применение каких-либо фракций по отдельности не обеспечивает полного

спектра веществ, регулирующих клеточные репаративные процессы. Наиболее предпочтительным в данном случае является смесь клеток со средой роста, где присутствует полный комплект интерлейкинов, выделяемых клетками в процессе активного роста. В то же время, вероятно, максимальное воздействие на соседние клетки обеспечивают интерлейкины внеклеточной локализации, как наиболее подвижные.

В связи с тем, что при лиофилизации возможно изменение белкового состава препарата, в первую очередь были проведены исследования возможных различий в белковых спектрах препарата клеток, разрушенных замораживанием-оттаиванием и лиофилизированного препарата.



Рис.1. Сравнение лизата клеток с лиофилизированным препаратом.

В связи с тем, что готовый препарат содержит компоненты питательной среды, содержащие в том числе ряд аминокислот и эмбриональную телячью сыворотку, возникла необходимость сравнения белковых спектров изучаемых субстанций для выявления отличий в белковом составе исходных веществ и препарата. Исследования показали, что его белковый спектр значительно отличается от таковых всех использованных питательных сред. Различия значительно ме-

нее выражены при сравнении со средой с эмбриональной телячьей сывороткой. Это обусловлено тем, что сама сыворотка является по своей природе близкой по составу к исследуемому материалу и на ее основе изготавливают близкий по действию препарат «Актовегин». В то же время в белковых спектрах имеется ряд серьезных отличий, связанных с различиями в биохимии человека и животных (так, например, α-фетопротеин человека у животных заменяется на фетуин, белок сходный по действию, но другого состава и конфигурации.

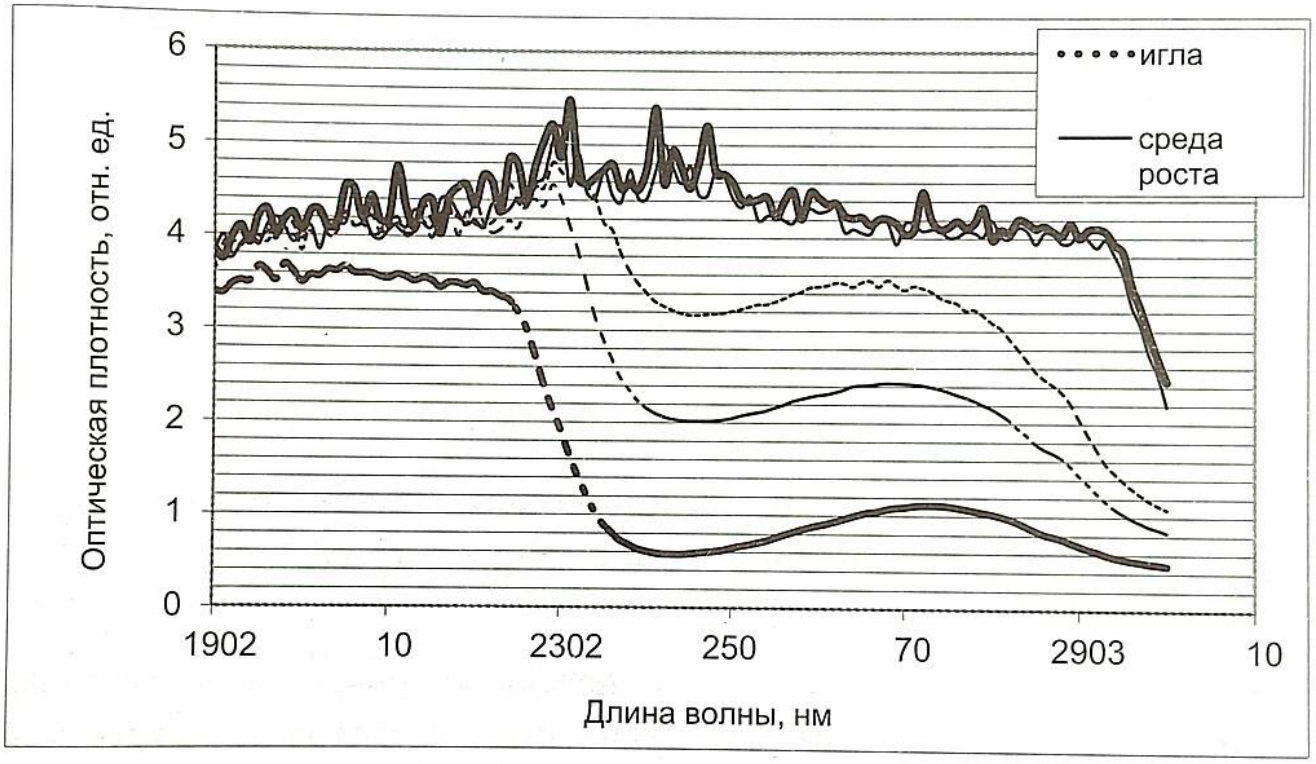


Рис.2. Белковый спектр препарата биологически активных веществ, продуцируемых диплоидными клетками в сравнении с исходными материалами.

Приведенные спектры показывают, что состав препарата отличается как от исходных питательных сред, так и от ростовой среды, содержащей эмбриональную телячью сыворотку как по общему белковому профилю, так и по количеству содержащихся в нем компонентов. Данные свидетельствуют о том, что в препарате присутствует ряд белковых соединений, характерных только для диплоидных клеток человека, часть их которых отвечает за контроль размножения клеток в культуре и, соответственно, за регенеративные процессы в организме.

В связи с тем, что в исходном препарате присутствуют различные белковые фракции, оставшиеся от разрушенных клеток и сред, начиная от «клеточных теней» и заканчивая солевыми компонентами сред, было проведено его фракционное разделение хроматографическим методом. Результаты представлены на рис.3

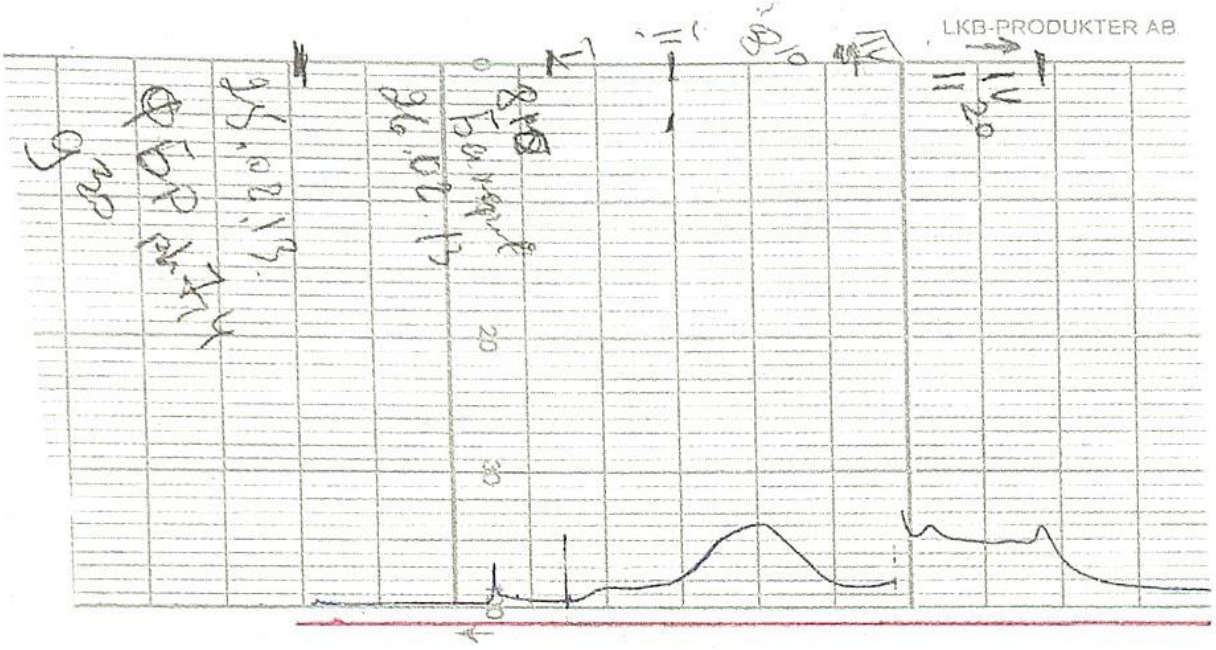


Рис. 3 Хроматограмма фракционного разделения лиофилизированного препарата биологически активных веществ продуцируемых диплоидными клетками

Первый пик соответствует наиболее тяжелым клеточным осколкам и «теням», часть их видна даже в световой микроскоп. Второй пик соответствует белкам в тысячи килодальтон. Второй пик также растянут, что является следствием содержания большого количества разнообразных по молекулярной клеточных массе белков.

В связи с тем, что основная масса цитокинов имеет массы в 20-200 КД, наибольший интерес представляют 3 и 4 пики. Наибольшее разнообразие белковых спектров представлено в 3 фракции. В то же время пик очень узкий, что свидетельствует о сравнительно малом разбросе молекулярных весов исследуемого материала, что позволяет предположить, что основная масса цитокинов содержится именно в этой фракции. Четвертая фракция также может включать в себя определенное количество цитокинов, но основная масса представляет собой аминокислоты из использованных питательных сред.

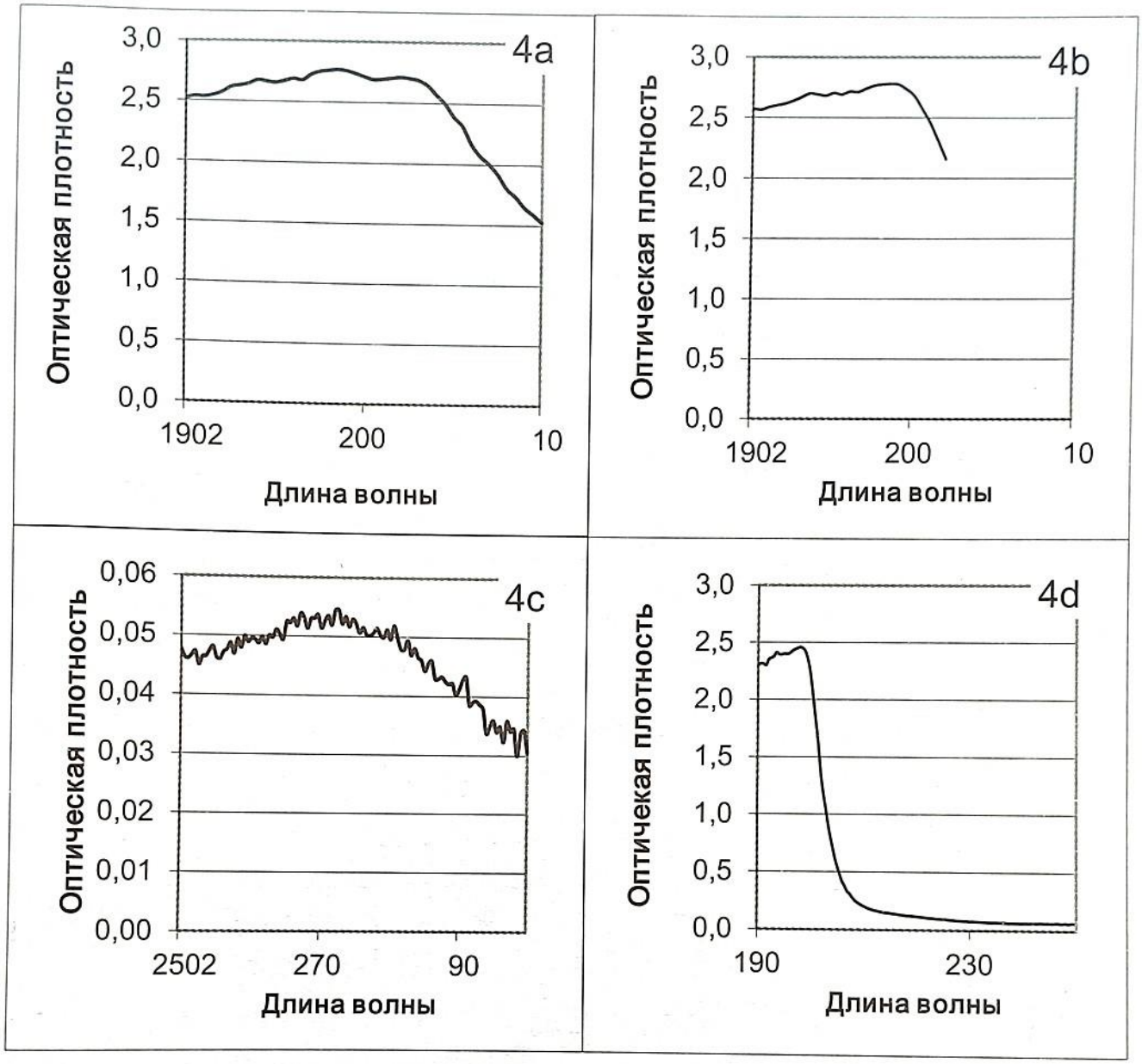


Рис.4. Спектральные характеристики фракций препарата БАВ- ДК.

Таким образом, проведенные хроматографические исследования позволили выделить наиболее перспективные для продолжения работ фракции и предложить возможные варианты совершенствования препарата.

В связи с тем, что для препарата заявлен длительный срок хранения с использованием белковых спектров, были исследованы партии перпарата сразу после изготовления и через год хранения при +4°С. Сравнение выявило минимальные различия показателей. Аналогичное исследование, проведенное с препаратом с двухгодичным сроком хранения показало значительные отличия белковых спектров свежего и иследуемого препаратов.

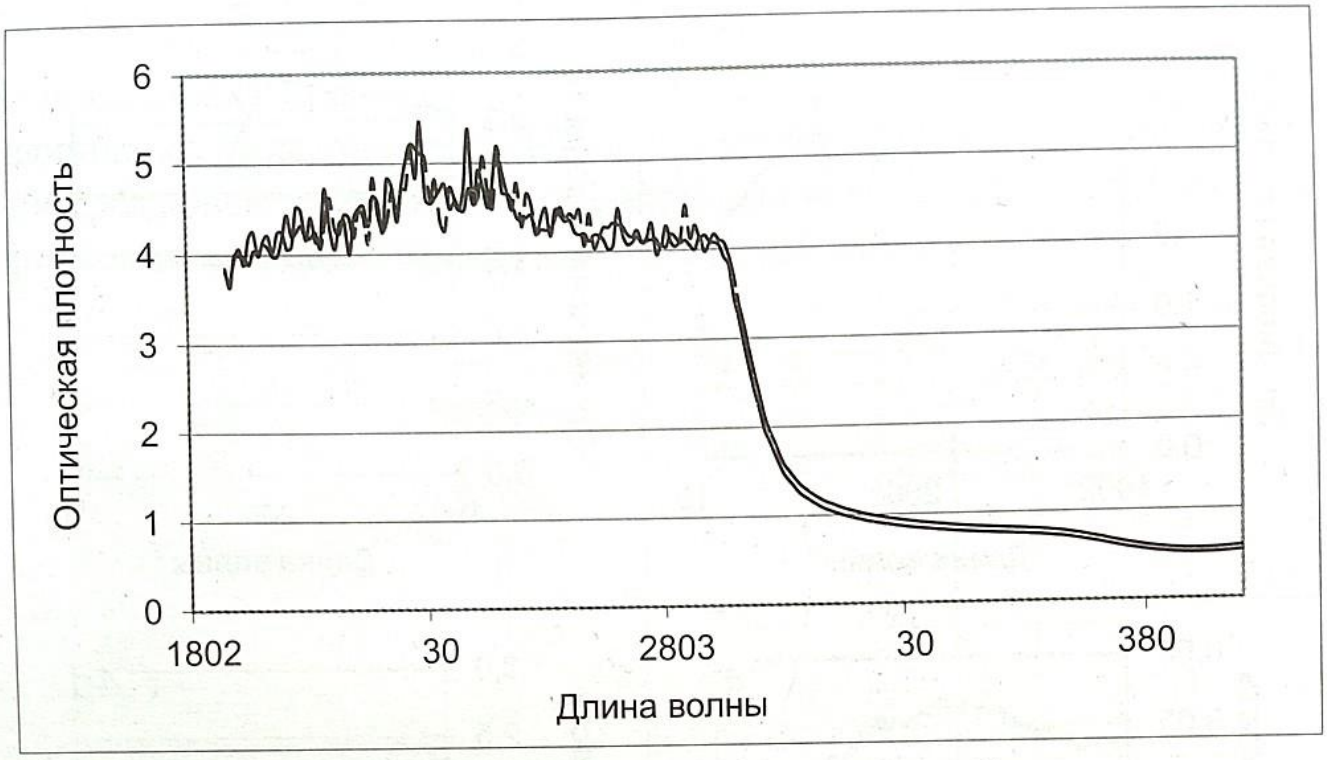


Рис.5. Сравнение свежеприготовленного препарата и со сроком хранения 1 год.

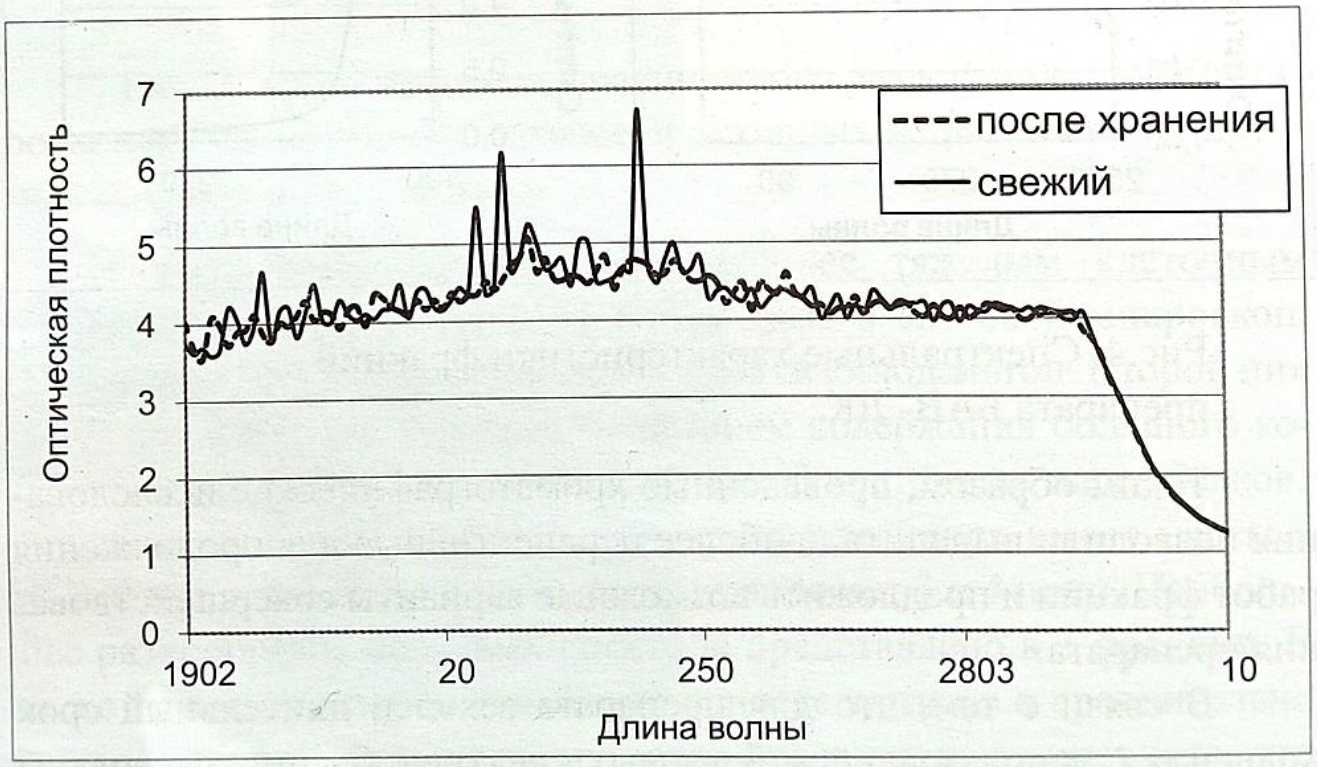


Рис. 6. Сравнение лиофилизированного препарата и препарата со сроком хранения 2 года.

Проведенные сравнения дают возможность определить срок годности препарата в 1 год.

Выводы:

1. Изучение цитокинового состава лиофилизированного препарата БАВ-ДК показало, что он содержит агенты как способствующие ранозаживлению, так и ряд интерферонов, что может обуславливать его противовирусное действие.

2. Высокая степень совпадения белковых спектров лизата клеток и лиофилизированного препарата позволяет считать их идентичными.

3. Практическое совпадение белковых спектров препаратов со сроком хранения до одного года позволило определить срок его годности.

4. Возможность разделения препарата на определенные фракции указывает на перспективы его дальнейшего совершенствования.

Авторы выражают благодарность В.М. Собенину за проведение работ по хроматографическому разделению препарата.

Список литературы:

1. Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans / B. Coulomb et al. // Plast Reconstr Surg. – 1998. – Vol. 101, № 7. – P. 1891-1903.

2. Szebenyi G. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors / G. Szebenyi, J. F. Fallon // Int. Rev. Cytol. – 1999. – Vol. 185. – P. 45-106.

3. Алексеев А. А. Восстановление кожного покрова у обожженных с использованием культивированных фибробластов / А. А. Алексеев [и др.] // Вестн. новых мед. технологий. – 1995. – Т. 2, № 1. – С. 96-98.

4. Возможность использования лиофилизированного препарата на основе биологически активных веществ диплоидных клеток / А. А. Бахарев [и др.] // Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» : материалы науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2013. – С. 171.

5. Создание иммунобиологического препарата на основе активных веществ диплоидных клеток / А. А. Бахарев [и др.] // Международная конференция «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций (специальный выпуск)». – Санкт-Петербург, 2013.

6. Блинова М. И. Клеточная заместительная терапия / М. И. Блинова, Г. П. Пинаев // Инновация. – 2000. – № 1-2. – С. 94-96.

7. Бобров Л. И. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях / Л. И. Бобров // Арх. патологии. –1991. – Т. 52, №12. – С. 65-68.

8. Васильев Ю. М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток [Электронный ресурс] / Ю. М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 5. – С. 20-25. – Режим доступа : http://www.pereplet.ru/nauka/Soros/pdf/9705_020.pdf (дата обращения: 25.05.2016).

9. Использование лиофилизированного препарата аллофибробластов для лечения заболеваний, вызванных вирусом герпеса / Н. П. Глинских [и др.] // Аграрный вестник Урала. – 2012. – Т. 99, № 7. – С. 25-27.

10. Препараты «Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии» как продуценты цитокинов / Н. П. Глинских [и др.] // НИИЭМ им. Гамалеи «Интерферон-2011»: сб. научных трудов. – Москва, 2012. – С. 472-479.

11. Гончарова В. П. Факторы роста фибробластов (Краткий обзор) / В. П. Гончарова // физиол. журнал им. Сеченова. – 1994. – Т. 80, №9. – С. 163-173.

12. Результаты применения культивированных аллофибробластов у детей с глубокими ожогами / Л. И. Будкевич [и др.] // V Международный симпозиум по эстетической медицине: сборник тезисов. – Москва, 2006.

13. Методические указания по получению, аттестации и контролю линий диплоидных клеток, используемых в качестве субстрата для производства медицинских иммунобиологических препаратов. – Москва : Минздрав СССР, 1986.

14. Полежаев Л. В. Регенерация путем индукции / Л. В. Полежаев. – Москва : Медицина, 1997. – 184 с.

15. Использование культивированных фибробластов при лечении ожоговых ран / В. П. Туманов [и др.] // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1990. – №4. – С. 400-402.

16. Федоров В. Д. Метод хирургического лечения ожогов у детей с использованием культивированных аллофибробластов человека: методическое пособие / В. Д. Федоров, Д. С. Саркисов, В. П. Туманов. – Москва, 1997.

17. Шехтер А. Б. Грануляционная ткань: воспаление и регенерация / А. Б. Шехтер, Г. Н. Берченко // Архив патологии. – 1984. – №2. – С. 20-29.

18. Грин Г. Использование культур клеток для лечения болезней / Г. Грин // В мире науки. – 1992. – №1. – С. 52-59.

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ В КЛЕЩАХ IXODES PERSULCATUS АНТИГЕНА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И БОРРЕЛИЙ НА МНОГОЛЕТНЕМ СТАЦИОНАРЕ НАБЛЮДЕНИЙ В ЗОНЕ ОСИНОВО-БЕРЕЗОВЫХ ЛЕСОВ

С.А. Леонтьева, Е.А. Брагина, Т.Ф. Степанова
ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, г. Тюмень

Введение. Значительная часть территории Российской Федерации энзоотична по различным природно-очаговым болезням [4]. На территории Западной Сибири – это клещевой энцефалит (КЭ), иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ), клещевой риккетсиоз (КР), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) и др. [6]. Циркуляция возбудителей природно-очаговых инфекций обусловлена переносчиком возбудителей данных инфекций, в первую очередь – иксодовыми клещами. На территории Тюменской области основным переносчиком клещевых инфекций является таежный клещ. Ареал его распространения совпадает с границами зоны лесов, но северная граница ареала ограничена южной границей распространения вечной мерзлоты [3]. В Западной Сибири основными биотопами распространения Ixodes persulcatus являются смешанные хвойно-лиственные леса (подтайга, южная тайга) [5].

В Тюменской области ведущую роль среди возбудителей природно-очаговых инфекций играют клещевой энцефалит (КЭ) и иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ). Эпидемиологические иссле-