

Хадарцев А.А., Субботина Т.И.,
Иванов Д.В., Гонтарев С.Н.

**МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ КЛЕТОЧНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ**

Тула – Белгород, 2013

Министерство образования и науки Российской Федерации

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«ТУЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Федеральное государственное автономное образовательное
Учреждение высшего профессионального образования
«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Хадарцев А.А., Субботина Т.И., Иванов Д.В.,
Гонтарев С.Н.**

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Монография

Под редакцией А.А. Хадарцева

Тула – Белгород, 2013

УДК 611-013.11; 616-003.9

Хадарцев А.А., Субботина Т.И., Иванов Д.В., Гонтарев С.Н. Медико-биологические аспекты клеточных технологий: Монография / Под ред. А.А. Хадарцева – Тула: Изд-во ТулГУ – Белгород: ЗАО «Белгородская областная типография», 2013.– 288 с.

Авторский коллектив:

Засл. деятель науки РФ, д.м.н., проф. Хадарцев А.А.; Засл. деят. науки РФ, д.т.н., д.б.н., проф. Яшин А.А.; д.м.н., проф. Гонтарев С.Н.; д.м.н. Субботина Т.И.; д.м.н. Иванов Д.В.; к.м.н. Савин Е.И.; Митюшкина О.А.

В монографии даны основные сведения о современном взгляде на клеточные технологии с позиций восстановительной медицины. Изложены основные понятия, применяемые в клеточной биологии. Осуществлён экскурс в историю развития клеточных технологий. Описаны разработки авторов по получению и использованию эндометриальных стволовых клеток в восстановительной медицине. Представлен опыт по применению клеточных технологий в лечении поражений сердечно-сосудистой системы, заболеваний печени, метаболических нарушениях и использовании клеточных технологий у спортсменов. Рассмотрены основные законодательные моменты, оказывающие влияние на развитие клеточных технологий. Представлены результаты исследований по влиянию комбинированного воздействия модулирующих факторов (стволовые клетки, электромагнитное излучение крайне высокой частоты и фитомеланин) на патологические процессы, обусловленные введением в организм цитостатиков. Разработанные математические модели отражают достоверность полученных результатов. Практические рекомендации, приводимые в монографии, направлены на то, чтобы помочь использовать результаты данного исследования в практической медицине.

Издание рассчитано как на специалистов широкого профиля (биологов, биофизиков, врачей разных специальностей), так и на не подготовленного читателя.

Рецензенты:

Академик РАМН, д.м.н., профессор

В.Г. Зилов

Член-корр. РАМН, д.б.н., профессор

Н.А. Фудин

ISBN

© Хадарцев А.А., Субботина Т.И., Иванов Д.В., Гонтарев С.Н., 2013

© Издательство ТулГУ, 2013

© ЗАО «Белгородская областная типография», 2013

ВВЕДЕНИЕ

Впервые в отечественной науке использовал термин «стволовая клетка» (СК) профессор кафедры гистологии и эмбриологии Императорской Военно-медицинской академии А.А. Максимов в 1909 г., который выдвинул положение о СК во взрослом организме, в частности, о СК крови.

А.Я. Фриденштейн, анализируя работы А.А. Максимова, сопоставляя их с результатами, полученными на моделях селезёночных и агаровых колоний, сформировал у своих современников интерес к кругу этих проблем, а понятие СК широко вошло в научную терминологию. Полученные данные о пролиферативных и дифференцировочных потенциях впервые выявленной категории стромальных клеток-предшественников позволили сформулировать понятие о стволовых стромальных клетках кроветворной и лимфоидной тканей (Фриденштейн А.Я., Кураесова А.И., 1971; Friedenstein A.J., 1980).

В 1667 году J.-B. Denis была выполнена трансплантация ксеногенных клеток. На самом деле попытки использования клеток крови были известны намного раньше. Ещё в 12 веке монахи с целью омоложения вводили себе кровь молодых послушников, получая при этом «омолаживающий эффект».

В 1884 году Вильяме подкожно имплантировал больному сахарным диабетом фрагменты ткани поджелудочной железы овцы.

1889 год – Чарльз Эдуард Броун-Секар (1817–1894) предположил, что «слабость пожилых мужчин обусловлена снижением функции яичек». Он активно развивал свою идею и в возрасте 72 лет как истинный исследователь сделал себе подкожную инъекцию экстракта из тестикул собаки и морской свинки, после чего на заседании Французского научного общества сообщил о значительном улучшении физического самочувствия.

В 1890 году Томсон в Нью-Йоркском университете провёл эксперименты по пересадке клеток головного мозга от кошки собаке.

В 1906 году была выполнена первая успешная пересадка роговицы.

В 1907 – первое успешное переливание АВО-совместимой крови.

В 1922 году в США надпочечники плода были пересажены двум пациентам с болезнью Аддисона, после чего наблюдался длительный терапевтический эффект (пересадки фетальной абортной ткани).

Во Франции в 20-х годах прошлого века врач С. А. Воронов использовал в этих целях экстракты яичек шимпанзе. Существует версия, что именно С.А. Воронов послужил прототипом профессора Преображенского в известном романе М.А. Булгакова «Собачье сердце». Ещё одной интересной деталью в «Собачьем сердце» являются операции по омоложению. Анализ научно-популярной и общественно-политической литературы 1920-х годов показал, что операции по омоложению – это не фантастика, а одна из самых ярких примет того времени (Мягков Б., 1957).

В 1928 году в Италии была произведена первая безуспешная пересадка поджелудочной железы пациенту с инсулинозависимым сахарным диабетом. Начавшаяся в середине XX века эра успешной пересадки органов надолго приостановила фундаментальные и прикладные разработки с трансплантацией соматических клеток.

В 1931 году П. Ниханс в Швейцарии спас от смерти пациентку, которая после ошибочного удаления околощитовидной железы находилась в коматозном состоянии. Он получил патент на заморозку функционально полноценных клеток животных. В дальнейшем терапия с помощью замороженных клеток животных получила его имя. В тот же промежуток времени П. Ниханс разрабатывал метод получения растворимого кофе из замороженного сырья для компании «Nestle».

Приказ Министра Здравоохранения СССР Смирнова С.А. «О широком внедрении в клиническую практику метода академика Филатова, разработанного в 1932 году» датируется 1 февраля 1951 года. Известен этот приказ тем, что является одним из первых и единственным приказом, в котором было чётко прописан алгоритм получения фетальных тканей и их применения в клинике.

В 1951 году – первая демонстрация выживаемости летально облучённых животных после трансплантации костного мозга, которую выполнила группа учёных под руководством Logenz (*Cell Therapy-Technologies, Markets and Companies*. «JainPharmaBiotech», 2005).

В середине 50-х годов E. Thomas сделал пересадку костного мозга после радиационного лечения острой лейкемии. Донором костного мозга выступила сестра-близнец. В это же время разрабатывается метод криопрезервации костного мозга человека.

1958 год – G. Mathe произвёл трансплантацию костного мозга облучённым физикам-ядерщикам. Она потерпела фиаско из-за отсутствия иммуносупрессии, а совместимость определялась только по группам крови.

В 1961 году выполнена первая пересадка фетальных гематогенных предшественников двум пациентам с апластической анемией.

В 60–70-х годах разработаны методы криопрезервации спермы и опубликованы первые положительные результаты искусственного осеменения (Edwards R.G., Brody S.A., 1995).

С 1966 – волна операций по пересадке поджелудочной железы, предпочтение отдавалась фетальной поджелудочной железе из-за большого количества эндокринной ткани. В это же время начинаются попытки трансплантации изолированной эндокринной ткани, как более эффективной технологии лечения больных диабетом (Шумаков В.И. и соавт., 1995).

В 1965–1970 гг. сразу в нескольких лабораториях научились выделять островки Лангерганса грызунов.

В 1968 году группой профессора E.D. Thomas выполнена первая успешная трансплантация HLA-совместимого костного мозга больному лейкемией (Buckner C.D. et al., 1970).

В 1972 году W.F. Ballinger и P.E. Lacy экспериментально обосновали эффективность трансплантации островковых клеток поджелудочной железы для лечения сахарного диабета.

В последующие 10 лет в США, СССР, Канаде и Европе стали чаще появляться сообщения об успешной пересадке островковых клеток пациентам, приводящей к временной, а иногда и к устойчивой ремиссии (Шумаков В.И. и соавт., 1995).

В 1975 году была осуществлена первая успешная пересадка стволовых гемопоэтических клеток фетальной печени при наследственном ADA-дефиците – отсутствии фермента аденозиндезаминазы в клетках иммунной системы (Репин В.С., Сухих Г.Т., 1998).

В 1981 году M.J. Evans и M.H. Kaufman выделили эмбриональные СК из бластоцисты мыши. G.R. Martin вводит понятие «эмбриональная СК». Дальше в многочисленных работах демонстрируются плюрипотентные возможности дифференцировки обнаруженных клеток и возможности их применения для клеточной трансплантологии (Evans M.J., Kaufman M.H., 1981).

В 1985 году шведские неврологи опубликовали первые положительные результаты лечения болезни Паркинсона пересадкой хромоаффинной ткани фетальных надпочечников в стриатум (Backlund E.O. et al., 1985). Оказалось, что донорские ДОФА-продуцирующие клетки способны контролировать гиперкинез и другую симптоматику заболевания у пациентов, не реагирующих на лекарственную терапию. Пересадки гематогенных и мезенхимальных СК стали регулярной медицинской услугой в гематологии, онкологии, в случае некоторых иммунодефицитов (Репин В.С. и соавт., 2007).

В 1986 году проходит первое клиническое испытание трансплантации островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом (*Cell Therapy-Technologies, Markets and Companies*. «JainPharmaBiotech», 2005). Руководитель группы Paul Lacy становится основателем Общества Клеточной Трансплантации (*Cell Transplant Society*).

В 1988 году во Франции проведена первая успешная трансплантация клеток пуповинной крови 5-летнему мальчику, страдающему от анемии Фанкони (Gluckman E. et al., 1989).

В 1989 году J. Touraine совместно с коллегами осуществили внутриматочную трансплантацию СК фетальной печени в развивающейся зародыш человека, имплантированный в матку. В результате предотвратили развитие семейной талассемии у детей.

В 1991 году опубликованы данные о лечении 28 пациентов с наследственными дефектами метаболизма (болезнь Гоше, Фабри, Нимана-Пика, болезни «накопления» и др.) путем транс-

плантации фетальных донорских клеток печени в зародыш *in utero* (Репин В.С., Сухих Г.Т., 1998).

В 1992 году – первые трансплантации гепатоцитов больным с печеночной недостаточностью (Mito M. et al., 1992).

В 1996 году – первая клеточная генотерапия в клинике – трансплантация аутологичных гепатоцитов, трансфецированных геном рецептора липопротеидов низкой плотности детям с семейной гиперхолестеринемией (Raper S.E. et al., 1996). В этом же году начинаются клинические испытания по лечению рассеянного склероза аутологичными гемопоэтическими клетками (Fassas A. et al., 1997).

В 1998 году J.A. Thomson et al. описали алгоритм выделения эмбриональных СК из бластоцисты человека (Thomson J.A. et al., 1998). В этом же году осуществлена первая в мире трансплантация клеток аутологичной пуповинной крови из частного банка (Ferreira E. et al., 1999).

В 2001 году впервые опубликованы данные по введению клеток в сердце человека для лечения сердечной недостаточности после инфаркта миокарда (Menasche P. et al., 2001).

В 2001 году Джорж Буш накладывает запрет на исследование в области эмбриональных СК в США по политическим и религиозным соображениям.

В 2002 году опубликованы результаты лечения детей с нарушенным остеогенезом с помощью аллогенных мезенхимальных (стромальных) клеток костного мозга (Horwitz E.M. et al., 2002).

В России в 2000-2004 годах – бурный расцвет применения различных видов клеток в клинической практике. Появляется большое количество публикаций в прессе противоречивого характера о результатах применения клеток.

В 2004 году корейский учёный W.S. Hwang (2004) получил линию аутологичных эмбриональных СК человека с помощью переноса ядра соматической клетки.

31 декабря 2004 года Приказ Минздравсоцразвития от 31 декабря 2004 г. № 346 «Об организации выдачи разрешений на применение медицинских технологий». Данный приказ сделал практически невозможным получение лицензии на применение клеточных технологий в клинике.

В 2005 году – создание индивидуальных линий эмбриональных СК методом переноса ядра соматической клетки пациента (Hwang W.S., Poh S.I. et al., 2005).

В 2005 году в России начинаются массовые проверки всех медицинских учреждений, в которых выполнялись клеточные трансплантации. Возбуждаются уголовные дела, накладываются административные взыскания за нарушения в работе медицинских учреждений с использованием клеточных технологий.

В 2008 году A.J. French et al. впервые воспроизвели начальные этапы клонирования человека с использованием метода SCNT (перенос ядра соматической клетки).

В марте 2009 года президент США Барак Обама объявил об отмене запрета на финансирование из федерального бюджета исследований эмбриональных СК.

В апреле 2009 года в России сформирована рабочая группа по доработке проекта и концепции технического задания проекта Федерального закона «О применении биомедицинских технологий в медицинской практике», согласно Приказу №80 Министерства здравоохранения и социального развития РФ.

В 2010 году появляются несколько законопроектов о регламенте применения клеточных технологий в РФ (Иванов Д.В. и соавт., 2010).

Кратко описанные в хронологическом порядке события, так или иначе, повлияли на развитие клеточных технологий в мире и в России. Сейчас можно говорить о новом витке развития событий с позитивной тенденцией. Лауреатами Нобелевской премии по физиологии и медицине за 2012 г. стали Джон Би Гордон из Великобритании и Синъя Яманака из Японии, разработавших методику перепрограммирования фибробластов в недифференцированные индуцированно-плюрипотентные стволовые клетки.

Математическое моделирование как нормальных физиологических, так и патологических процессов является в настоящее время одним из самых актуальных направлений в медицинских научных исследованиях.

Анализ многочисленных источников отечественной и зарубежной литературы, описывающих действие на организм ЭМИ КВЧ, позволяет сделать вывод о том, что ЭМИ КВЧ обладает

мощным модулирующим эффектом как на саногенные реакции, так и на возникновение и развитие патологии в различных органах и системах. Исследования по влиянию ЭМИ КВЧ на систему РАСК и процессы СРО показывают, что при воздействии ЭМИ КВЧ на здоровый организм происходит усиление активности коагулянтов и оксидантов и снижение активности антикоагулянтов и антиоксидантов, что приводит к развитию гиперкоагуляции и интенсификации ПОЛ. При воздействии ЭМИ КВЧ на пациентов со стенокардией, напротив, происходят усиление активности антикоагулянтов, что приводит к снижению уровня свертываемости крови, а в работах Чуян Е.Н. и соавторов (2006-2008 гг.) указывается на увеличение активности антиоксидантной системы организма.

Сочетанное воздействие двух модулирующих факторов – СК и ЭМИ КВЧ – в настоящее время является малоизученным. В работе Иванова Д.В. с соавторами описывается теоретическая возможность управления дифференцировкой СК воздействием ЭМИ КВЧ. В работе Игнашевой Л.П. приводятся результаты исследований, согласно которым ЭМИ КВЧ может оказывать модулирующее воздействие на пролиферацию СК нативного и криоконсервированного костного мозга. Вместе с тем изучение сочетанного, в различных комбинациях, воздействия СК, ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм, подверженный введению цитостатиков, до настоящего времени не проводилось.

ГЛАВА I

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Клеточная терапия только сейчас начинается выделяться в самостоятельную науку, которую пока ещё не преподают в медицинских образовательных учреждениях России. Как наука, клеточная терапия замыкает на себе сразу несколько больших разделов медицины: гистологию, физиологию, иммунологию, хирургию, терапию, эндокринологию и, естественно, биологию развития. Большое количество новых терминов и понятий, возникающих с развитием клеточных технологий, начинает вводить в затруднение даже врачей, которые общаются с биологами, работающими с культурами клеток. Чётко прописанные понятия и определения дают возможность легко и быстро разобраться в данной ситуации и играют важную роль в понимании происходящих процессов. Можно привести несколько достаточно устоявшихся основных терминов клеточной терапии.

В настоящей монографии, если по контексту не требуется иного значения, приведённые ниже термины имеют значение, указанное напротив каждого из них:

Клетка (англ. – *cell*) – основная структурно-функциональная единица всех живых организмов, окружённая мембраной. Клетка является элементарной (простейшей) живой системой, которая (в отличие от вирусов) способна самостоятельно воспроизводиться.

Стволовые клетки, СК (англ. – *stem cells*) – группа клеток-предшественников, обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке в специализированные ткани.

Эмбриональные СК, ЭСК (англ. – *embryonic stem sells*) – а) плюрипотентные – клетки эмбрионов и веззародышевых оболочек до имплантации (с 11 дня после оплодотворения); б) клетки эмбриона с постимплантационного периода до 9 недели, способные дифференцироваться в целостный орган или тканевую структуру.

Эмбриогенез (англ. – *embryogenesis*) – 1) в эмбриологии – развитие организма от оплодотворения до рождения; 2) в акушерстве – период внутриутробного развития (первые 8 недель),

в течение которого преобладают процессы формирования основ организации и закладки органов.

Постнатальные СК (англ. – *postnatal stem cells*) – обозначаются клетки, находящиеся в организме после родов. Они локализируются в костном мозге, пуповинной крови, а также в других органах и тканях, способные трансформироваться в разные типы клеток (мультипотентные клетки).

Гемопоэтические СК (англ. – *hemopoietic stem cells*) – находящиеся в кроветворных органах и крови, способные давать начало различным росткам кроветворения.

Мезенхимальные (стромальные) СК, МСК (англ. – *stromal stem cells*) – СК, находящиеся в костном мозге, жировой ткани, обладающие способностью к дифференцировке в остеобласты, хондроциты, теноциты, адипоциты, миобласты, фибробласты.

Репродуктивное клонирование (англ. – *reproductive cloning*) – клонирование с целью создания нового организма, генетически идентичного исходному.

Клонирование (англ. – *cloning*) – искусственное создание копий, генетически идентичных исходным: ДНК, клеток, тканей, организмов.

Клон (англ. – *clon*) – линия клеток, генетически идентичных клетке, от которой они происходят.

Аллогенные клетки (англ. – *allogenic cells*) – клетки, относящиеся к другой особи того же биологического вида. Например: клетки от человека к человеку.

Аутологичные клетки (англ. – *autologous cells*) – собственные клетки пациента.

Ксеногенные клетки (англ. – *xenogenic cells*) – гетерологичные клетки, полученные от представителя иного, чем реципиент вида; (*прим.авторов* к примеру, для человека это клетки свиньи).

Индукцированные плюрипотентные СК (на английской аббревиатуре «iPS») репрограммированные с помощью четырёх транскрипционных факторов дифференцированные клетки.

Зигота (англ. – *zygote*) – диплоидная клетка, образующаяся при слиянии мужской и женской гамет.

Бластоциста (англ. – *blastocyst*) – ранняя стадия развития зародыша, предшествующая гастрوله, имеет форму пузырька.

Внутренняя клеточная масса (англ. – *inner cell mass, ICM*) – скопление истинно СК в бластоцисте, ранней стадии развития эмбриона.

Фетус (англ. – *fetus*) – плод, нерожденный организм. У человека, называется с 9 недели после зачатия и до момента рождения.

Фетальные СК (англ. – *fetal stem cells*) – клетки полученные из фетуса.

Ткани (англ. – *tissue*) – совокупность гистологических элементов (клеток и элементов межклеточного вещества).

Орган (англ. – *organ*) – любая часть тела выполняющая специфическую функцию.

Клеточные технологии (англ. – *cell technology*) – биомедицинские технологии с использованием клеток и клеточно-инженерных конструкций.

Клеточная терапия (англ. – *cell therapy*) – применение различных видов клеток в лечении заболеваний человека.

Соматические клетки (англ. – *somatic cells*) – все клетки организма, формирующие тело и не являющиеся половыми клетками.

1. Эмбриогенез

Формирование пространственной организации эмбриона в основном изучалось на шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*, зародыши которой являются удобными объектами для экспериментов. Процесс эмбриогенеза позвоночных разделяют на три периода:

1. *Дробление* оплодотворённого яйца на множество мелких клеток, которые формируют слой наподобие эпителия.

2. *Гастрюляция* и *нейруляция*, последовательные взаимосвязанные процессы в результате которых происходит образование полости первичной кишки и нервной трубки. В результате гастрюляции полая сферическая бластула превращается в трёхслойную структуру: внутренний слой, т.е. стенку первичной кишки,

называют энтодермой, наружный слой, который так и остался снаружи – эктодермой, а между ними промежуточный рыхлый слой ткани, состоящей из первичной и вторичной мезенхимы – мезодермой. Эти три первичных зародышевых листка, характерные для всех высших животных. Организация трёхслойного эмбриона в общих чертах соответствует организации взрослого животного с пищеварительной трубкой внутри, эпидермисом снаружи и органами соединительнотканного происхождения между ними. Процесс образования нервной системы из эктодермы называется нейруляцией. Трубка, образовавшаяся из эктодермы, называется нервной трубкой, из которой в процессе дальнейшего развития возникает спинной и головной мозг.

3. *Органогенез*, в результате которого возникают различные органы и части тела. В процессе пространственной организации зародыша, клетки перемещаются, принимают определённые позиционные значения, определяемые адгезионными свойствами их поверхности, а также их внутренним химизмом. Клетки одного типа стремятся взаимодействовать между собой и отделяются от иных, отличающихся от них клеток. Таким образом происходит стабилизация пространственной организации и обеспечивается способность клеток к спонтанной сортировке при их искусственном смешивании. Изменение характера адгезионных свойств лежит в основе морфогенетических процессов. Поскольку характер позиционных значений данного класса клеток проявляется через изменение свойств клеточной поверхности, он может управлять миграцией других популяций эмбриональных клеток в процессе сборки сложных тканей или органов.

Эти периоды не имеют чётких границ и могут в значительной степени перекрываться.

2. Классификация клеток

В связи с увеличивающимся интересом к клиническому применению СК, практикующим врачам необходимо знать, при каких заболеваниях эти клетки могут быть использованы, поэтому нами была разработана собственная классификация раз-

личных видов клеток, ориентированная на практическое применение в клинической практике (Иванов Д.В., 2011).

Вид клеток:

1. По срокам развития:
 - a. Эмбриональные
 - b. Фетальные
 - c. Постнатальные
 - i. Пуповинная кровь
 - ii. Клетки взрослого организма
2. По отношению к реципиенту
 - a. Собственные (аутологичные)
 - b. Донорские
 - i. Аллогенные (фетальные, пуповинной крови и др.)
 - ii. Ксеногенные
3. По фенотипу
 - a. Гемопоэтические
 - b. Мезенхимальные (стромальные)
 - c. Нейрональные

При написании работы мы опирались на данную классификацию.

3. Эмбриональные клетки

Эмбриональные клетки – клетки, получаемые из эмбриона. У человека эмбриональный период длится до конца 8-ой недели внутриутробного развития. С 9-ой недели, когда уже все главные органы и структуры сформированы, начинается фетальный период, т.е. эмбрион считается *фетусом*. Наибольшим вниманием у исследователей пользуются *эмбриональные СК (ЭСК)*, которые получают из внутренней клеточной массы бластоцисты. Именно на ЭСК возлагается мечта человечества о неисчерпаемом источнике жизни. Человеческие ЭСК были выделены в 1998 году, что окончательно сделало регенеративную медицину и конструирование тканей реальной возможностью для лечения заболеваний человека в будущем. ЭСК обладают *тотипотентностью* – способностью дифференцироваться в любые клетки

организма. Самое понятие СК подразумевают такой вид клеток, при делении которых возникает точно такая же СК и вторая клетка, способная к дифференцировке в специализированную клетку.

Фетальные клетки – клетки, получаемые на определённом этапе развития организма, в частности у человека в период с 9-ой до рождения. *Фетальные клетки* на этапах развития проходят от плюрипотентных способных давать множество разных типов дифференцированных клеток в определённом типе ткани до унипотентных клеток, т.е. способных давать строго определённые типы конечных дифференцированных клеток.

Постнатальные клетки – клетки, получаемые после рождения организма. Сюда относятся клетки пуповинной крови, которые получают из пуповинного канатика, соединяющего мать с ребёнком. Также к *постнатальным клеткам* относятся все клетки взрослого организма, которых в настоящее время насчитывается более 225 видов. Для примера, специализированные клетки кожи – фибробласты, клетки печени – гепатоциты, клетки сердца – кардиомиоциты и т.д.

По отношению к реципиенту клетки разделяются на аутологичные, т.е. собственные клетки, и донорские. *Аутологичные* клетки получают из собственных тканей реципиента, например крови, жира, кожи и обладают антигенами соответствующими антигенам реципиента, что позволяет им преодолевать процесс отторжения.

Донорские клетки подразделяются на аллогенные и ксеногенные. *Аллогенные* – клетки относящиеся к другой особи того же биологического вида. Т.е. в отношении человека это клетки от другого человеческого органа или ткани. К данному типу клеток относятся фетальные клетки, клетки пуповинной крови, донорская кровь. *Ксеногенные клетки* – клетки, получают от представителя иного, чем реципиент, вида. Для человека *ксеногенные клетки* – это клетки от свиньи, кроликов, овцы и т.п. Они несут на себе большое количество чужеродных белков, что приводит к выраженным иммунологическим реакциям, в частности отторжения.

4. Гемopoэтические СК

Гемopoэтические стволовые клетки (ГСК) дают начало гранулоцитарным, моноцитарным, эритроидным, мегакариоцитарным и лимфоидным колониям. Однако наибольший интерес представляют ГСК, которые развиваются следующим образом. У эмбриона гемопоэз начинается в желточном мешке, но по мере развития эта функция переходит к печени плода и, наконец (после 20-ой недели внутриутробного развития у человека), к костному мозгу, где и продолжается в течение всей жизни. ГСК, дающая начало всем элементам крови, *плюрипотентна* и заселяет другие гемо- и лимфопоэтические органы и самовоспроизводится, превращаясь в новые СК. ГСК характеризуются экспрессией *CD34* и *Thy1(CD90)* и отсутствием *CD38*, *CD33*, и *HLA-DR* (Baum C.M. et al., 1982; Craig W. et al., 1993; Sutherland H.J. et al., 1989). ГСК также не имеют экспрессии большого количества маркеров характерных для зрелых клеток крови и это важный фактор, благодаря которому идентифицируют и изолируют клетки. *CD34* – это трансмембранный гликопротеин, экспрессируемый не только юными гемопоэтическими клетками, но и фибробластами и сосудистым эндотелием. У человека *CD34* является маркером стволовых и прогениторных клеток. Необходимо отметить, что ГСК экспрессируют адгезионные молекулы такие как *L*-селектин (Sackstein R., 1997) и интегрин (Coulombel L. et al., 1997), а также *хоумингассоциированную молекулу клеточной адгезии (H-CAM)* (Deguchi T. et al., 1999). В последнее время ГСК изолируют с помощью *эндоглина (CD150)*.

5. Мезенхимальные СК

Мезенхимальные СК (МСК) – это прогениторные клетки, способные дифференцироваться в мезодермальные ткани, включая остеобласты, хондроциты, адипоциты. В большинстве случаев их получают из костного мозга, а также из большого разнообразия взрослых и фетальных тканей.

Фенотипически МСК экспрессируют маркеры, некоторые из которых, к сожалению, не являются специфическими марке-

рами. Общепринято, что взрослые человеческие МСК не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток, такие как *CD45*, *CD34*, *CD14*, или *CD11*. Они также не экспрессируют костимулирующие молекулы, такие как *CD80*, *CD86*, или *CD40* или молекулы адгезии *CD31* (тромбоцит/эндотелиальной клетки молекула адгезии [PECAM]-1), *CD18* (лейкоцит функционально-ассоциированный антиген-1 [LFA-1]), или *CD56* (молекула адгезии нейрональной клетки-1), но они могут экспрессировать *CD105* (SH2), *CD73* (SH3/4), *CD44*, *CD90* (Thy-1), *CD71*, и *Stro-1* а также хорошо известные адгезионные молекулы *CD106* (молекула адгезии сосудистой клетки [VCAM]-1), *CD166* (молекула адгезии активированного лейкоцита [ALCAM]), межклеточные адгезионные молекулы (ICAM)-1, и *CD29* (Haynesworth S.E. et al., 1992; Galmiche M.C. et al., 1993; Pittenger M.F. et al., 1999; Conget P.A., Minguell J.J., 1999; Sordi V. et al., 2005; Le Blanc K. et al., 2003). Существуют работы, которые описывают изоляцию МСК, как человеческих, так и от грызунов (крысы, мыши) используя отбор антител основанный на фенотипе МСК.

Некоторые исследователи используют метод негативной селекции для обогащения фракции МСК, когда удаляются гемопоэтические клетки (Baddoo M. et al., 2003); другая часть исследователей наоборот используют антитела для позитивного выделения МСК (Jones E.A. et al., 2002; Gindraux F. et al., 2007). МСК из разных источников не экспрессируют одинаковых молекул, как на человеческих клетках, т.е., несмотря на то, что человеческие и крысиные МСК экспрессируют *CD34*-, имеются работы, в которых доказана вариабельность экспрессии *CD34* на мышинных МСК (Peister A. et al., 2004). В основном считается, что все МСК лишены маркера ГСК *CD45* и маркера эндотелиальных клеток *CD31*. Однако, важно отметить, что различия в экспрессии большинства поверхностных маркеров может изменяться из-за секреции дополнительных факторов дополнительными клетками при начальных пассажах и в результате экспрессия *in vitro* некоторых маркеров МСК может не всегда коррелировать с их экспрессией *in vivo* (Gronthos S. et al., 2001). Открытие МСК прославило нашего учёного А.Я. Фриденштейна. Через некоторое время Pittenger совместно с коллегами описал

возможность дифференцировки в трёх направлениях мезенхимальных клеток.

Прошло 40 лет, и в настоящее время накоплен значительный опыт в исследовании уникальных свойств МСК. Их научились извлекать из множества тканей, обнаружили мультипотентные свойства и способность создавать ткани, т.е. способность к тканевой инженерии, что делает МСК чрезвычайно перспективными для клинического применения. Поэтому клиницистам важно знать основные характеристики и свойства этой популяции клеток.

Маркеры МСК. У МСК есть отличительные особенности, в частности, они хорошо прикрепляются к пластику, способны дифференцироваться в костную, хрящевую и жировую ткани и могут быть выделены из большинства взрослых типов тканей пациента. Однако, даже если их выделять при градиенте плотности, они все равно остаются гетерогенной культурой клеток с разнообразным пролиферативным и дифференцировочным потенциалом. Для применения клеточных технологий в клинике необходима чёткая характеристика маркеров клеток и поэтому делались и продолжают выполняться исследования для идентификации МСК и, соответственно, лучшего выделения их, что особенно важно при выделении клеток из различных тканей. Большинство работ выполнены на МСК полученных из человеческого и мышинного костного мозга, но постепенно увеличивается число работ по исследованию мезенхимальных клеток из других органов и тканей. Отмечено, что имеется небольшое количество вариаций между популяциями клеток, полученных из разных источников.

При определении характеристик клеток есть понятие негативных и позитивных маркеров. Если белковая молекула не определяется на поверхности клетки, то данный маркер считается негативным для клетки и, если происходит экспрессия маркера, то он считается позитивным или положительным.

Негативные маркеры. Принято, что МСК не экспрессируют *CD11b* (маркер иммунных клеток), гликофорин-А (маркер эритроидной линии клеток) и *CD45* (основной маркер гемопоэтических клеток). *CD34* (примитивный маркер ГСК) практи-

чески не экспрессируется на человеческих МСК, зато на мышинных – всегда. *CD31* (маркер эндотелиальных и гемопоэтических клеток) и *CD117* (маркер гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток) почти всегда отсутствуют и на человеческих и на мышинных клетках. У биологов, изучающих свойства МСК, нет категоричного позитивного маркера. Обилие сообщений от научных групп об идентификации и характеристиках клеток основывается на использовании различных субпопуляций маркеров. В клинике без чёткой характеристики клеток интерпретация результатов крайне трудна.

Позитивные маркеры. *Stro-1* – хорошо и давно известный маркер МСК. Клеточная популяция негативная по маркеру *Stro-1* не способна к формированию колоний (Simmons P.J., Torok-Storb B., 1991). Негативная селекция против гликофорина-А совместно с селекцией *Stro-1*+ (позитивных) клеток резко увеличивает получение клеток из костного мозга – в 10 раз (Gronthos S. et al., 2003). Клетки *Stro-1*+ могут стать фибробластами, поддерживающими ГСК, гладкомышечными клетками, адипоцитами, хондроцитами и остеобластами (Dennis J.E. et al., 2002). Кроме того, экспрессия *Stro-1* различается между двумя популяциями культивированных МСК, которые имели различное происхождение и способность поддерживать ГСК (Bensidhoum M. et al., 2004). Однако указанные выше свойства не делают маркер *Stro-1* основным маркером МСК. В частности, он экспрессируется не только МСК, неизвестен также аналог у лабораторных животных (мышей) и, наконец, его экспрессия уменьшается во время культуральных работ, а также использование *Stro-1* ограничено в маркировании для изоляции МСК, или идентификации во время ранних пассажей (Gronthos S. et al., 2003). До конца функции антигена *Stro-1* ещё не изучены, но использование его с другими МСК-маркерами является тем не менее лучшим вариантом для идентификации.

Другие маркеры МСК – *CD106* или *VCAM-1* (сосудистая молекула клеточной адгезии) экспрессируются клетками эндотелия сосудов и прилежащими плотными периваскулярными клетками. Считается, что *CD106* (*VCAM-1*) совместно с *Stro-1* представляют собой отличные маркеры человеческих МСК. *CD73* является 5^л-

нуклеозидазой и стимулируют адгезию лимфоцитов к эндотелию. Способность данной молекулы долго экспрессироваться в культуре относит его к маркеру МСК (Haynesworth S.E. et al., 1992). Имеется много других маркеров, которые экспрессируются МСК, однако они не выносятся на первое место из-за недостаточного постоянства экспрессии. К ним относят *CD105*, *CD90(Thy-1)*, *CD44*, *CD29*, *CD13*, *Flk-1(CD309)*, *Sca-1*, and *CD10*.

Таким образом, можно сказать, что МСК типично негативны, т.е. не экспрессируют *CD34*, *CD45*, *CD14*, *CD11b*, *CD19*, *CD79a*, and *HLA-DR* и, наоборот, позитивны, т.е. экспрессируют *Stro-1*, *CD29*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *CD166*, и *CD44* (Abdallah B.M. et al., 2005; Foster L.J. et al., 2005; Dominici M. et al., 2006; Keating A., 2006).

При анализе дифференцировки СК очень важную роль играет их тканевое происхождение. В настоящее время уже стала рутинной методика получения МСК из костного мозга, а также из тканей мезодермального происхождения, т.е. жира, мышц, костей и сухожилий. Недавно мультипотентные клетки изолировали и из других тканей не мезодермального происхождения. В частности, проведены работы по получению пластик-адгерентных МСК-подобных колоний клеток из головного мозга, селезёнки, печени, почек, лёгких, тимуса и поджелудочной железы у мышей с похожими морфологическими свойствами и иммунофенотипом после нескольких пассажей (Silva Meirelles L., 2006). А в другом исследовании мышинные МСК были получены из свежеизолированных клеток сердца, печени, почек, яичников, кожи на основании *CD45- / CD31- / Sca-1+ / Thy-1+* фенотипа (Blashki D. et al., 2006). Естественно возник вопрос – во всех тканях существуют специфические ниши для МСК, или они существуют автономно и не зависят от микроокружения. Ответ на данный вопрос появился достаточно быстро. С момента как Schofield в 1978 выдвинул концепцию «ниш» для СК, идея была широко поддержана и получила окончательное подтверждение в последние годы. Ниша представляет собой место или комплекс специфических условий обитания, в котором есть все необходимые элементы окружающие СК, когда они находятся в неактивном состоянии. К этим элементам относятся неСК, которые

находятся с СК в контакте, благодаря экстрацеллюлярному матриксу и растворимым в нем молекулам. Из-за такого микроокружения СК находятся в неактивном состоянии, т.е. не дифференцируются. Считается, что определённые сигналы должны дойти до ниш СК и сообщить о необходимости дифференцировки СК для регенерации или репопуляции повреждённой ткани.

Где же располагаются ниши? Одним из мест их расположения является периваскулярное пространство, что было определено благодаря экспрессии у МСК, полученных из периваскулярного пространства, гладкомышечного актина (α SMA) и установлении их фенотипа как $CD45- / CD31- / Sca-1+ / Thy-1+$ клетки (Blashki D. et al., 2006). В пользу существования данной ниши, благодаря маркерам *Stro-1* и *CD146*, МСК были обнаружены в выстилке кровеносных сосудов костного мозга и дентальной пульпы (Shi S., Gronthos S., 2003). Эти клетки также экспрессировали α SMA, а некоторые – даже *3G5* маркер, который ассоциирован с клеточной поверхностью перицитов, т.е. экспрессируется перицитами. Некоторые учёные сразу же предположили, что перициты в действительности являются МСК, потому они легко могут дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты. Расположение МСК в периваскулярных нишах по всему телу даёт им возможность лёгкого доступа ко всем тканям и уверенность в том, что МСК интегрированы в процессы восстановления большинства различных тканей. Белки трансмембранной клеточной адгезии, кадхерины, функция межклеточной адгезии, миграция, дифференцировка – являются очень важными в биологии МСК. Все это тесно связано с биологией ниш других СК (Grayson W.L. et al., 2006). Продолжает оставаться в зоне научного интереса исследование молекулярных основ взаимодействия между МСК и их «соседями». Важно отметить, что никаких специфических компонентов экстрацеллюлярного матрикса, позволяющего поддерживать МСК в неактивном состоянии, в нишах не выявлено. Однако имеются чёткие доказательства того, что сам по себе экстрацеллюлярный матрикс может регулировать дифференцировку МСК, что имеет потенциал для применения в тканевой инженерии. Например, если удалить все клетки из экстрацеллюлярного матрикса, который образовался на титановой

подложке после культивирования остеобластов, то при размещении в нем МСК, увеличивается количество остеогенных маркеров, таких как щелочная фосфатаза и отложения кальция (Datta N. et al., 2005). Создание искусственного матрикса, который может мимикрировать микроокружение *in vivo* и регулировать нужную дифференцировку СК, наверное, самый многообещающий метод для терапевтического применения. Крайне необходима молекулярная информация о взаимодействии матрикса и МСК, наиболее вероятно с использованием интегринов, которая уже применяется в биологии ниш других систем (Campos L.S., 2005).

У всех СК и, мезенхимальных, в частности, есть особенность или даже явление, которое называется *хоуминг*. Они приходят в место повреждения и начинают процессы восстановления повреждённых тканей, часть которых имеет способность восстанавливаться некоторое время местными дифференцированными клетками. Как правило, такие клетки находятся в постмитотическом состоянии. Поэтому для прихода стволовых или прогениторных клеток необходимы стимулирующие сигналы. Изучение биологии ниш СК необходимо не только для выявления того, что позволяет долго сохранять СК, но также и причин заставляющих их эмигрировать. Даже у здоровых животных МСК способны к *хоумингу* не только в костный мозг, но и в лёгкие и мышцы (Francois S. et al., 2006). Способность МСК кажется связанной с возможностью экспрессировать *Stro-1*, что позволяет позитивным по данному маркеру клеткам мигрировать и приживаться в большинстве изучаемых тканей. Считается также, что зрелые клетки, которые были повреждены в организме, способны секретировать не только сигналы для *хоуминга* (миграции), но и сигналы дифференцировки. К примеру, МСК из костного мозга мышей начинали миогенную дифференцировку в среде из повреждённой мышечной ткани скелетной мускулатуры и оставались неактивными в среде с неповреждёнными скелетными мышцами (Santa Maria L. et al., 2004). Проведённые работы *in vitro* подтвердили, что некоторые неповреждённые клетки могут индуцировать дифференцировку МСК, когда с ними осуществляется непосредственный контакт. К примеру, клетки печени способны индуцировать гепатогенез (Lange C. et

al., 2005). Важно заметить, что зрелые клетки не всегда индуцируют дифференцировку МСК в своём собственном направлении. Так – непосредственный контакт с хондроцитами индуцирует остеогенез, но не хондрогенез (Gerstenfeld L.C. et al., 2003). Ясно, что окружение вокруг МСК является крайне важным определяющим фактором их идентичности.

Зная основные направления и суть происходящих изменений, клиницисту становится более понятен алгоритм применения МСК в лечении различных заболеваний. Сейчас продолжается разработка и поиск основных сигнальных путей и основного регуляторного гена, стимулирующего дифференцировку МСК. Возможность создать биологические стимуляторы для получения желаемой дифференцировочной программы клеток, или возможность блокировать побочные направления дифференцировки, или нежелательные направления – крайне важны в клиническом применении, особенно когда поднимается вопрос о тканевой инженерии или регенерации ткани. Так перестройка рубцово-изменённой ткани миокарда после инфаркта в костном направлении крайне нежелательна, зато необходимо получение кардиомиоцитоподобных клеток для восстановления сократимости повреждённой ткани.

Рассмотрим основные направления и регулирующие факторы *хондрогенеза* (образования хрящевой ткани). Хондрогенная дифференцировка МСК в лабораторных условиях (при культивировании) воспроизводит механизм образования хряща *in vivo*. Маркеры, экспрессируемые при *хондрогенезе*, позитивно характеризуют хондроциты, полученные из МСК, включая транскрипционные факторы (*sox-9*, *scleraxis*) и гены экстрацеллюлярного матрикса – *коллаген 2 и 9 типа*, *агрекан*, *декорин* и др. (Baksh D. et al., 2004; Tuan R.S. et al., 2003). Несмотря на полученные данные, специфические сигнальные пути, по которым проходит информация о запуске экспрессии, остаются до сих пор неизвестны. Изучение естественных мутаций в человеческом организме и генетические исследования на молекулярном уровне идентифицировали несколько важных сигнальных молекул, включая *трансформирующий фактор роста β (TGF- β)* (Massague J. et al., 2000), *костный морфогенетический белок (BMP)*, *фактор роста и*

дифференцировки (GDF) (Chen D. et al., 2004). Выполненные работы с использованием рекомбинантных протеинов и аденовирусным инфицированием МСК совместно культивированные с факторами *TGF-β1*, *TGF-β3*, *BMP-2*, *BMP-4*, *BMP-6*, *BMP-12*, *BMP-13*, и *GDF-5* достоверно доказали быструю дифференцировку в хондрогенном направлении МСК, полученных из разнообразных источников мезодермального происхождения (Tuan R.S. et al., 2003). Получается, что используя данное свойство МСК, дифференцировку в хондрогенном направлении их можно применять при восстановлении повреждённой структуры хрящей суставных поверхностей. Данное направление клеточных технологий, используемое в ревматологии совместно с противовоспалительной терапией, благоприятно будет воздействовать на клинические результаты лечения больных с артрозами.

При *остеогенезе* или формировании костной ткани, главенствующую роль играет белок *BMP* и, в особенности, *BMP-2* и *BMP-6*, которые очень сильно стимулируют МСК в остеогенном направлении (Friedman M.S. et al., 2006). Каскад реакций, происходящих с участием генов *Runx2*, *Smurf1*, *Smurf2* приводит к формированию костной ткани (Jeon E.J. et al., 2006). Ещё одним из важных цитокинов, играющих важную роль в дифференцировке МСК в остеогенном направлении, играет *Wnts*. В научных работах было доказано, что высокий уровень *эндогенного цитокина Wnts* ускоряет *остеогенез* и наоборот, низкий уровень данного цитокина приводит к ингибированию процесса формирования костной ткани (Gaspar C., Fodde R., 2004). Множественные совместные взаимодействия между *BMP* белками, *цитокинами (Wnts, TNF-α)* и генами приводят к стимулированию или угнетению дифференцировки МСК в остеогенном направлении. Поиск новых механизмов и транскрипционных факторов, приводящих к формированию костной ткани из МСК, позволит найти новые программы дифференцировки клеток, что позволит более эффективно использовать их в травматологии.

Адипогенез, или образование жировой ткани. Процесс дифференцировки МСК в адипогенном направлении происходит, когда блокируется остеогенная дифференцировка. Важную роль в данном процессе играет *PPARγ* (Nuttall M.E., Gimble J.M., 2004).

При недостаточной стимуляции МСК в остеогенном направлении можно получить адипогенную дифференцировку, что клинически будет выражаться в отсутствии эффекта от проводимой клеточной терапии. С другой стороны при блокировании адипогенной дифференцировки можно получить уже костную ткань.

Миогенез, или образование мышечной ткани, является крайне важным и перспективным направлением в дифференцировке МСК. В настоящее время большинство исследований миогенеза из взрослых СК основываются на получении клеток из скелетной мышечной ткани или сателлитных клеток. Однако уже продемонстрирован эффект стимулирования *миогенеза* из взрослых МСК после трансфекции активированным *Notch 1* (Dezawa M. et al., 2005), правда, не ясен механизм данного эффекта. Существует группа исследователей, которые сфокусированы сугубо на *кардиомиогенезе*. В своих работах они демонстрируют важность межклеточного взаимодействия при сокультивировании МСК и кардиомиоцитов и стимулировании МСК *кардиомиогенеза* на моделях инфаркта миокарда в лабораторных условиях (Li H. et al., 2006). Более глубокие исследования по данному направлению свойств дифференцировки МСК проходят в клинике и лабораториях и их актуальность продолжает оставаться на самом высоком уровне, потому что количество пациентов с поражением миокарда увеличивается год от года.

Теногенез или формирование ткани сухожилий и связок из МСК активно изучается, хотя и является менее значимым по сравнению с кардиомиогенезом. В формировании сухожилий *in vivo* играют важную роль белок *GDF*, а также некоторые белки семейства *TGF- β* (Wolfman N.M. et al., 1997). Зато при культивировании в лаборатории для получения *теноцитов* из МСК необходимы не только специфические ростовые факторы, но и дозированная механическая нагрузка, которая играет крайне важную роль в получении направленных нитей сухожилия (Altman G.H. et al., 2002). Пока остаются неидентифицированными специфические маркеры дифференцировки, приводящие к *теногенезу* из МСК. В настоящее время более менее определена роль белка *scleraxis* (Brown D. et al., 1999) и *R-Smad8* (Hoffmann A. et al., 2006) в теногенной дифференцировке МСК.

Таким образом, взрослые МСК являются самым перспективным кандидатом из всех клеток для восстановительной медицины. Основное требование – это идентификация МСК *in vivo*. На моделях с мышами мечение происходит благодаря генетическим маркерам (Tumbar T. et al., 2004). Асимметричное деление показало способность клеток к самообновлению. Это уникальное свойство СК эксплуатируется для идентификации сателлитных мышечных клеток и может быть использовано для идентификации МСК *in vivo* при изучении их делений. При использовании профиля поверхностных антигенов и генных наборов достаточно один раз чётко выделить и идентифицировать популяцию МСК. Роль каждого компонента системы МСК должна быть чётко проанализирована. Основное направление включает идентификацию сигнальных факторов, которые ускоряют самообновление МСК, а также сигнальные пути, позволяющие запускать линейную дифференцировку. Все последующие исследования будут направлены на изучение систем экспрессии и взаимосвязи между семействами белков, например, *TGF-β* и *Wnt*. Идентификация специфических рецепторов на клеточной поверхности, которые активируются сигнальными молекулами, например белками семейства *TGF-β* (BMP) и *Wnt*, во время самообновления и цитодифференцировки крайне важны для понимания и, самое главное, для связывания взаимодействия между сигнальными сетями как внутри, так и снаружи клетки. Понимание данных механизмов позволит стимулировать взрослые МСК для восстановления после повреждения.

6. Эндометриальные СК

Несмотря на наличие доступа к ЭСК, многие лаборатории выбрали изучение взрослых СК не столько по этическим соображениям, сколько из-за практических аспектов и требований повседневного прогресса, необходимого для развития клеточной терапии. Исходя из относительной простоты изоляции, потенциала экспансии, стабильного фенотипа, транспортабельности, предпочтительными для использования в регенеративной медицине оказались МСК. Это ускорило изучение взаимодействия аллогенных МСК с иммунной системой хозяина, а также воз-

возможностей использования МСК в клинической практике (Bobis S. et al., 2006).

К значимым ограничениям широкого использования МСК можно отнести необходимость получения для нужд терапии значительного числа клеток, и желательность их получения как можно менее инвазивным способом. Оба препятствия казались практически непреодолимыми до тех пор, пока сразу несколько групп исследователей не обратило внимания на возможность получения СК из менструальной крови.

Открытие было основано на предположении, что СК могут присутствовать в менструальной крови, так как они были ранее обнаружены в эндометрии (Spencer J.A. et al., 2005; Chiba T. et al., 2007). Эндометрий матки человека содержит эндометриальный слизистый слой, который относится к высоко регенерирующим тканям, и располагается на плотном миометрии. Эндометриально-миометриальное сочленение достаточно неравномерное и не имеет подслизистого слоя, отделяющего эндометриальную железистую ткань от находящихся ниже гладкомышечных клеток миометрия (Umezawa A., Makino H., 2008). Эндометрий и субэндометриальный миометрий происходят из Мюллеровских желёз во время эмбриогенеза, в то время как слои миометрия происходят во время фетального периода и развиваются из других источников (Okulicz W.C. et al., 1997; Umezawa A., Makino H., 2008). Эндометрий подразделяется структурно и функционально на две главные зоны, где *верхняя*, или *функциональная*, содержит железы, распространяющиеся от поверхности эпителия и поддерживающиеся стромой, и *нижняя* или *базальная*, состоящая из базального слоя желёз, плотной стромы и лимфоидных агрегатов (Padykula H.A., 1991; Tabibzadeh S., 1991; Patel A.N. et al., 2008; Umezawa A., Makino H., 2008). Обе зоны как функциональная, так и базальная в дальнейшем подразделяются на два морфологически разных слоя (Biervliet et al., 2004; Kim Y.J. et al., 2007; Meng X. et al., 2007; Patel A.N. et al., 2008), хотя другие исследователи считают различие между 4 слоями менее очевидным и предпочитают концепцию поляризации микроокружения (Thomson J.A. et al., 1998; Umezawa A., Makino H., 2008). Клеточный состав эндометрия включает в себя

люминальный и железистый эпителий, стромальные фибробласты, эндотелиоциты и лейкоциты. Эндометрий человека проходит более чем 400 циклов регенерации, дифференциации и отторжения за время репродуктивного периода (Kaiserman-Abramof I.R., Padykula H.A., 1998; Meng X. et al., 2007; Han X. et al., 2009). Каждый месяц 4–7 мм слизистой ткани вырастает в течение 4–10 дней в первой половине пролиферативной стадии менструального цикла (Meng X. et al., 2007). Важно отметить, что концепция регенерации эндометрия подтверждается расположением СК именно в базальном эндометрии, что было установлено много лет назад (Roth E., Taylor H.B., 1966; Padykula H.A. et al., 1989; Patel A.N. et al., 2008). При изучении пролиферации эндометриальных клеток были обнаружены зональные различия, которые показали постепенное замещение эпителиальных и стромальных клеток – *прогениторными* СК, располагающимися в базальном эпителии в области эндометриально-миометриального соединения (Padykula H.A. et al., 1984; 1989; Fuchs E., Segre J.A., 2000; Cui C.H. et al., 2007). Позже был установлен дисбаланс между индексом пролиферации эндометриальных желёз в базальном и функциональном слоях во время пролиферативной и секреторной фаз цикла у макак при использовании фосфорилированного гистона H3, как пролиферирующего маркера (Cervello I. et al., 2007). Такой уровень тканевого новообразования сопоставим с клеточным возобновлением в высокорегенерирующих тканях, таких как кроветворные ткани костного мозга, эпидермис, эпителий кишечника, где взрослые СК замещают выбывающие клетки для сохранения тканевого гомеостаза (Matthai C. et al., 2006; Gargett C.E. et al., 2009). Дальнейшие косвенные доказательства существования *эндометриальных стволовых/прогениторных клеток* представлены в результатах экспериментальных исследований приматов, и в клинических исследованиях, когда эндометрий полностью восстанавливался и функционировал во время беременности после почти полностью удалённого эндометриального слоя (Yuan H. et al., 1995; Hida N. et al., 2008). В других клинических исследованиях установлено наличие регенерирующих эндометриальных слоёв у женщин после электрохирургической абляции, применявшейся для лече-

ния меноррагии (Uduwela A.S. et al., 2000), и даже возникновение беременности (Abbott J.A., Garry R., 2002). Клинические исследования подтверждают присутствие взрослых СК в эндометрии. Эти утверждения основаны на получении оссификатов после беременности, источником которых являются не фетальные ткани, а хроническое воспаление и травма. Именно воспаление и травма активизируют включение МСК в регенерацию тканей. Кроме того, такие ткани как гладкая мускулатура, кости и хрящи – также обнаруживаются в эндометрии (Schwab K.E. et al., 2005; Bobis S. et al., 2006).

Более поздние работы свидетельствуют о возможности изолировать из эндометрия и культивировать 2 типа клеток: эпителиальные прогениторы и МСК (Gargett C.E., 2006). Также сообщается о *маркере плюрипотентности Oct-4 (POU5F1)*, обнаруженном в некоторых клетках стромы человеческого эндометрия (Matthai C. et al., 2006). Поскольку СК были обнаружены в эндометрии, возникло предположение, что они также могут быть обнаружены в отторгаемом вместе с менструальной кровью эндометрии. Но при изучении *СК выделенных из менструальной крови* (МенСК), оказалось, что они представляют собой неоднородную группу клеток, и некоторые субпопуляции, по видимому, отличающиеся от СК, полученных из интактного эндометрия, а также от МСК. Работы Cui et al. (2007), Meng et al. (2007), Patel et al. (2008), Р.А. Мусина и соавт. (2008), А. Umezawa, Н. Makino (2008), N. Hida et al. (2008) положили начало новому перспективному направлению в получении и использовании МенСК в терапевтических целях.

Ещё 2004 году заявку на выданный в 2006 году патент «СК, полученные из отслоившегося при менструации эндометрия, способ их получения и применение» подала группа российских учёных (Мусина Р.А. и соавт., 2006). Изобретение предусматривает применение отслоившегося при менструации эндометрия для получения СК, т.е. описывает новый источник и способ получения СК из отслоившегося при менструации эндометрия. Согласно изобретению, СК «полученные из отслоившегося при менструации эндометрия, могут быть использованы в косметологии, например для общего омоложения организма, омоложения кожи,

лечения и/или укрепления волос; в стоматологии, например для лечения и/или укрепления дёсен и/или лечения и/или коррекции зубов; в травматологии, например в терапии ожогов, ран, повреждений кожи и/или переломов; и в терапии дегенеративных заболеваний, например невралгии, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, ишемической болезни сердца или конечностей, воспалительных заболеваний и заболеваний кожи, а также для создания банка СК».

Но текст данного документа в широкой печати не публиковался. Первыми представили работу, описывающую выделение клеток эндометрия из менструальной крови, Cui et al. (2007). Причём в этом исследовании процедура получения МенСК носила сугубо прикладной характер: авторы просто использовали этот метод для получения МСК эндометрия, опираясь на общеизвестный факт, что в менструальной крови содержатся клетки отторгающегося эндометрия. Сама работа посвящалась изучению возможности экспрессии человеческого дистрофина. Они успешно культивировали множество первичных клеток, изолированных из менструальной крови, и обнаружили как минимум 2 морфологически разные группы: маленькие веретенообразные клетки и большие палочкообразные.

Уникальный фенотип МенСК был связан с гистологическими и эмбриологическими отличиями эндометрия (Du H., Taylor H.S., 2007).

Meng et al. (2007) выделяли из менструальной крови мононуклеарные клетки, и изучали субпопуляцию прилипающих клеток. Выделенные клетки оказались способны выдерживать в тканевой культуре более 68 удвоений без нарушений кариотипа. Индекс пролиферации был значительно выше, чем у контрольной культуры МСК пуповинной крови, удвоение после 20 удвоений наступало каждые 19,4 часа, в сравнении с 1,5–2 сутками у двух контрольных линий пуповинной крови. Была обнаружена способность выделенных СК дифференцироваться в клетки 9 линий всех трёх зародышевых листков: *мезодермальные* – миоциты, остеоциты, эндотелий, адипоциты, кардиомиоциты; *эктодермальные* – нейрональные клетки; и *эндодермальные* – гепатоциты, панкреатические клетки, клетки дыхательного эпите-

лия. Дифференцировка была подтверждена иммуногистохимически: образовавшиеся тканевые клетки экспрессировали соответствующие этим тканям маркеры. Клетки, находившиеся в контрольной среде, без дополнительной стимуляции, не экспрессировали маркеры дифференциации. После 68 удвоений клетки сохраняли способность продуцировать присущий им ряд маркеров. Кроме этого, полученные клетки продуцировали *MMP3*, *MMP10*, *GM-CSF*, *angiopoietin-2*, и *PDGF-BB* в 10 раз больше, чем 2 контрольные линии МСК пуповинной крови.

Обнаружены следующие особенности СК, выделенных из менструальной крови:

- 1) высокий индекс пролиферации в сравнении с контрольными линиями МСК пуповинной крови
- 2) отсутствие способности экспрессии маркера МСК *STRO-1*
- 3) способность к экспрессии маркера ЭСК *Oct-4*
- 4) высокая экспрессия матричных металлопротеаз

Выделенные клетки не экспрессируют свойственные эндометриальным СК маркеры *CD34* и *CD45*.

Patel et al. (2008) также обнаружили высокую скорость удвоения МенСК, которая составляла 24–36 часов. Из начальных 50000 клеток за 26 дней было получено 48000000 клеток. Клетки оставались диплоидными, без хромосомных aberrаций, как было установлено при определении кариотипа на 12 пассаже. Более того, *RT-PCR* анализ показал, что МенСК на 12 пассаже экспрессируют мультитипотентный маркер *Oct-4*, но не *SOX-2* или *Nanog*.

Полученные группой Patel данные об экспрессии маркеров принципиально различаются от данных, опубликованными группами Cui и Meng по позитивной реакции на экспрессию плюрипотентного маркера *SSEA-4* и *c-kit (CD117)*, которые также были колокализированы на изолированном клоне МенСК. Была обнаружена экспрессия маркеров *CD166*, *CD49f*, *MHCI*, и умеренная экспрессия *CXCR4*, ответственного за хоуминг СК. Негативная реакция отмечена на маркеры *MHC II* и *LIN*.

МенСК, исследованные группой Patel, дифференцировались в клеточные линии: мезодермальные – адипоциты, хондроциты,

остеоциты, кардиомиоциты; *эктодермальные* – олигодендроциты, астроциты.

МенСК сохраняли более чем 50 % теломеразной активности даже на 12 пассаже при сравнении с ЭСК, что намного выше, чем у МСК дериватов костного мозга. Группой Meng теломеразная активность не изучалась.

МенСК, выделенные группой Patel, имели сходные характеристики с СК человеческого эндометрия по ряду показателей: экспрессии *c-kit* (*CD117*) (Conti C.J. et al., 1984), по экспрессии *Oct-4* (Matthai C. et al., 2006), по клональному размножению (Gargett C.E., 2007), а также с СК эндометрия мышей по *c-kit* (*CD117*) и *Oct-4* (Chambers I. et al., 2003). Исходя из этого, авторы придерживаются версии о происхождении МенСК из СК эндометрия. Наличие эмбриональных маркеров *SSEA-4* и *Oct-4* объясняет высокую скорость размножения этих клеток.

Р.А. Мусина и соавт. (2008) отнесли выделенные МенСК по экспрессируемым маркерам, потенциалу дифференциации и морфологическим признакам к МСК, отметив при этом в качестве особенных признаков высокую клоногенную активность и низкую способность к дифференцировке в адипоциты.

А. Umezawa и Н. Makino (2008) на основании собственных исследований относят менструальную кровь к источникам получения МСК.

Несмотря на относительно недавнюю историю обнаружения МенСК, уже появились попытки изучения их практического использования.

Так, Cui et al. (2007) в той же публикации, которая открыла тему изучения менструальной крови как источника СК, исследовали предполагаемые эндометриальные прогениторы, полученные из образцов эндометриальной ткани, на предмет восполнения мышечной дегенерации у мышей с *mdx*-моделью миопатии Дюшенна. По замыслу авторов, имплантированные клетки должны были предоставлять человеческий дистрофин в дегенеративные мышцы иммунодефицитных *mdx*-мышей. Авторы изучили извлечённые из менструальной крови клетки, чтобы установить, могут ли первично культивированные нетрансформированные клетки также восполнить дистрофичные мышцы. *In vivo* перенос извле-

чѐнных из менструальной крови клеток в дистрофичные мышцы иммунодефицитных *mdx*-мышей восстанавливал экспрессию дистрофина сарколеммой. Имплантируемые клетки были помечены *enhanced-green*-флуоресцентным белком и раздельное состояние человеческих и мышинных ядер заставляло предположить, что человеческий дистрофин экспрессируется благодаря слиянию миоцитов хозяина и имплантированных клеток. Анализ *in vitro* показал, что эндометриальные прогениторные клетки и клетки, извлечѐнные из менструальной крови, могут эффективно трансдифференцировать в миобласты/миоциты, сливаясь с мышинными миобластами C2C12 при совместном культивировании *in vitro* и начинать экспрессировать дистрофин после слияния. На основании проведенного эксперимента авторы заключают, что эндометриальные прогениторные клетки и дериваты менструальной крови могут переносить дистрофин в дистрофичные миоциты через слияние и транс дифференциацию *in vitro* и *in vivo*.

Toyoda et al. (2007) также обратили внимание на миогенный потенциал клеток, извлечѐнных из менструальной крови, отметив её высокую репликативную активность и способность трансдифференцировать в миоциты с неожиданно высокой частотой. Это свойство МенСК позволяет спасти дистрофичные миоциты у мышей с *mdx*-моделью миопатии Дюшенна.

Murphy et al. (2008) считают аллогенные МенСК «лекарством с полки» для лечения критической ишемии нижних конечностей, опираясь на следующие свойства этих клеток: 1) высокий уровень продукции ростовых факторов и металлопротеаз 2) способность ингибировать воспалительный ответ и отсутствие иммуногенности 3) способность к размножению в большом количестве без утраты способности к дифференциации и нарушения кариотипа.

Hida et al. (2008) обнаружили, что МенСК после соответствующей индукции начинают спонтанно делиться, демонстрируя кардиомиоцит-специфичное действие. Кардиальные тропонин-1-позитивные кардиомиоциты образуются *in vitro* в 27–32 % случаев. МенСК пролиферируют в среднем 28 поколений без влияния на кардиомиогенную трансдифференцировочную способность, и экспрессируют м-РНК из *GATA-4* перед кардиомио-

генной индукцией. Авторы предполагают, что большая часть кардиомиогенных клеток МенСК происходит из отслоившихся маточных эндометриальных желёз, так как МСК, полученные из моноклональных эндометриальных желёз в 76–97 % случаев трансдифференцируют в кардиальные клетки *in vitro*. МенСК были позитивны по *CD29*, *CD105* и негативны по *CD34*, *CD45*. Трансплантированные МенСК значительно улучшали нарушенную функцию сердца, уменьшали площадь инфаркта миокарда на модели у бестимусных крыс, ткань из кардиомиоцитов МенСК наблюдалась в зоне инфаркта миокарда *in vivo*. Авторы делают вывод о МенСК как о новом, мощном и доступном источнике для кардиальной клеточной терапии.

Han et al. (2009) изучали способность неманипулированных МенСК изменять рост глиомы, с использованием агрессивной *C6/LacZ7 (C6)* модели у СД-крыс. В основе идеи эксперимента были положены результаты предыдущих исследований на животных, которые показали, что избирательный тропизм МСК к глиоме может быть использован в качестве средства селективной доставки цитотоксических средств. Эндометриальные регенеративные клетки являются популяцией клеток мезенхимального типа, которые обладают способностью к плюрипотентной дифференциации и характеризуется уникальными поверхностными маркерами и продукцией факторов роста. Эндометриальные регенеративные клетки вводили внутривенно, или внутрь опухоли. В результате показано значительное ингибирование глиомы: уменьшение объёма на 49 % после внутривенного введения ($p < 0,05$), и около 46 % после введения внутрь опухоли ($p < 0,05$). Редукция опухоли была связана с ингибированием ангиогенеза и сокращением числа *CD133* позитивных клеток в инкраниальной опухоли. Несмотря на ангиогенный потенциал МенСК в модели ишемии задней конечности, эти данные подтверждают парадоксальную способность МенСК ингибировать опухоли. Авторы считают необходимым провести дополнительные исследования для определения качественных различий между физиологическим ангиогенезом, который, как представляется, поддерживается МенСК, и ангиогенезом опухоли, который, как оказалось, ингибируется МенСК.

Наконец Zhong et al. (2009) описали 4 случая использования МенСК внутривенно и интратекально у пациентов с рассеянным склерозом. Донорами менструальной крови послужили здоровые, некурящие женщины-добровольцы 18–30 лет. Исследование проводилось в рамках начальной стадии изучения безопасности препарата. Исследование продолжалось более года, за это время не было отмечено иммунологических реакций и побочных эффектов связанных с лечением. Эти предварительные данные говорят о возможности клинического использования МенСК и являются основанием для дальнейшего изучения этого нового типа СК.

При анализе опубликованных материалов нам удалось выделить способы получения эндометриальных клеток. Так, группа австрийских учёных по руководством К.Е. Schwab получала клетки эндометрия после гистерэктомии у женщин в возрасте от 31 до 52 лет. Операцию выполняли в пролиферативной фазе эндометрия, 5 мм слой эндометрия впоследствии собирался в среду, содержащую раствор Дульбеко, набор антимикотических антибиотиков, ксеногенную сыворотку. Выделение клеток проходило с использованием коллагеназы, механического расщепления и применением магнитного сортирования.

L. Lynch и его коллеги из Университетского госпиталя в Дублине получали клеточный материал с помощью кюретажа при выскабливании матки и помещением клеточного материала в среду Хенкса с антибиотиками и ксеногенной сывороткой. В лаборатории материал отмывался от резидуальной крови и размещался в раствор с энзимами на 20 минут при температуре 37°C. В дальнейшем материал пропускали через марлевый фильтр и повторно отмывали, причём удалось добиться получения 1 млн клеток в мл.

Японские исследователи из Университета Фукуока под руководством К. Като также получали материал из тканей матки после выполненной гистерэктомии у женщин в возрасте 37–49 лет. Клеточная суспензия была получена после механической и энзимной обработки тканей. В дальнейшем её пропускали через марлевый фильтр и культивировали.

В России группа учёных под руководством Р.А. Мусиной из НЦ акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, получила эндометриальные клетки инвазивным путём с помощью биопсии тканей матки. В дальнейшем выполнялись работы по культивированию клеток.

По сообщениям R. Dimitrov из института биологии и иммунологии репродукции Болгарской Академии наук совместно с коллегами получены эндометриальные ткани после гистерэктомий у женщин в возрасте 32–52 года, выполненных по поводу аденомиоза матки, во время пролиферативной и секреторной фазы. Образцы помещались в ксеногенную сыворотку с антибиотиками и доставлялись в лабораторию, где эндометрий бережно отделялся от миометрия и разделялся механическим путём на небольшие фрагменты, которые помещались в раствор коллагеназы и выдерживался при 37°C в течение 1 часа. В дальнейшем, после фильтрации и центрифугирования, начинали культуральные работы.

S. Matthai et al. получали клеточный материал из тканей матки после гистерэктомий, выполненных у женщин в возрасте 29–51 год, в независимости от дня менструального цикла.

В своих работах S. Куо и коллеги из Университета в Каназве (Япония), получали эндометриальные ткани у женщин в возрасте 42–52 лет также после экстирпаций матки по причине миоматозного поражения. Операция выполнялась в поздний период менструального цикла, ткани помещались в среду Дульбеко с коллагеназой и диоксирибонуклеазой.

X. Meng из института биокоммуникационных исследований (Wichita, USA) собирал у здоровых женщин во время менструального цикла эндометриальные клетки, используя урологические колпачки. Содержимое колпачка переливалось в пробирки объемом 5 мл, содержащие антибиотики, раствор фосфатного буфера и ЭДТА. В дальнейшем клетки разделялись с помощью градиента Фиколла, затем культуральные работы выполнялись на чашках Петри, содержащих среду ДМЕМ, антибиотики, ксеногенную сыворотку.

Подобную методику получения эндометриальных клеток описал и Z. Zhong из госпиталя в Changsha (Китай), у молодых здоровых женщин в возрасте 18–30 лет в условиях стационара. Специ-

ально разработанный стерильный колпачок вводился во влагалище и оставался там в течение 30–60 минут. После этого содержимое колпачка переливалось в специальный собирающий контейнер, который перемещался в стерильное помещение, где выполнялись работы по очистке и выделению клеток.

В своих исследованиях авторы отмечали, что существует определённая взаимосвязь между качеством, жизнеспособностью, активностью клеток, фазой менструального цикла и возрастом женщины.

7. Кластеры дифференцировки

Клиницисту приходится сталкиваться в практике с характеристикой клеток, поэтому целесообразно суммировать маркеры, по которым характеризуются клетки. На поверхности клетки имеются определённые белковые молекулы, которые позволяют оценить принадлежность клетки к тому или иному виду.

Маркер	Значимость
CD1a	Рецептор антигенов на лимфоцитах, клетках Лангенгарса
CD2	Рецептор на Т-клетках, натуральных киллерах, тимоцитах
CD4	Маркер Т-хелперов
CD6	Рецептор для активации Т-клеток
CD8	Маркер Т-клеток
CD9	Маркер МСК, ассоциированный с ангиогенезом (LiL.)
CD10	Маркер предшественников Т- и В-лимфоцитов
CD11	Маркер лейкоцитов, принадлежит к молекулам адгезии, представитель семейства интегринов
CD14	Маркер моноцитов
CD15 (SSEA-4)	Маркер эмбриональных стволовых клеток
CD17	Маркер нейтрофилов
CD18	β 2-интегрину участвуют в адгезии лейкоцитов к эндотелию или другим клеткам иммунной системы
CD21	Рецептор вируса Эпштейн-Барра
CD29	V1-интегрин молекула адгезии на мезенхимальных и стволовых клетках печени (ChoN.H.)
CD31	Является маркером ангиогенеза, экспрессируется на лейкоцитах и эпителиальных клетках

CD33	Антиген, свойственный клеткам миелоидного ряда
CD34	Маркер гемопоэтических стволовых клеток
CD38	Маркер дифференцирующихся гемопоэтических СК
CD41a	Рецептор для фибриногена обнаруженный на МСК и тромбоцитах
CD44	Рецептор гиалуроновой кислот обнаруженный на тканевых стволовых клетках и МСК
CD45	Маркер лейкоцитов
CD49	маркер МСК
CD54	Маркер моноцитов и эндотелия
CD56	Маркер нервных клеток
CD57	Маркер натуральных киллеров
CD59	Белок ингибирующий комплемент обнаруживается на МСК (Jabbour H.N.) и стволовых гемопоэтических клетках SP-популяции костного мозга (Pranishnikov V.A.)
CD65	Рецептор миелоидных линий клеток
CD69	Сигнальная молекула гемопоэтических клеток
CD70	Маркер активированных Т- и В-клеток
CD71	Маркер активированных лейкоцитов, обнаруживается на большинстве делящихся клеток
CD73	Экто-5'-нуклеотидаза, вовлечённая в миграцию МСК
CD79	Маркер В-клеток
CD81	Маркер мезенхимальных стволовых клеток
CD83	Маркер дендритных клеток
CD90	Маркер Т-клеток, гемопоэтических и МСК
CD93	Маркер эндотелиальных клеток
CD105	Маркер МСК
CD106	Рецептор VCAM-1 на МСК и эндотелиоцитах
CD111	Маркер нейрональных стволовых клеток и нейроэпителиальных клеток
CD112	Молекула адгезии между эпителиальными и эндотелиальными клетками
CD117 (c-KIT)	Маркер гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток
CD133	Гемопоэтический/ангиобластный маркер
CD139	Маркер кроветворных клеток
CD144	Маркер прогениторов эндотелиальных клеток
CD145	Маркер эндотелиальных и стромальных клеток
CD150	Маркер активированных лимфоцитов

CD166	Молекула клеточной адгезии, маркер МСК
CD175	Маркер стволовых клеток
CD235	Гликофорин А
Nectin-1 (CD111)	Маркер НСК
Nectin-2 (CD112)	Молекула адгезии между эпителиальными и эндотелиальными клетками
DAF (CD55)	Маркер гемопоэтических клеток
ICAM (CD54)	Маркер моноцитов и эндотелия
L-селектин	Экспрессируется на лейкоцитах и обеспечивает их адгезию к эндотелию в начальной фазе воспаления, а также участвует в хоуминге лимфоцитов
Oct-4	Маркер эмбриональных стволовых клеток
STRO-1	Маркер мезенхимальных стволовых клеток
Nanog	Маркер эмбриональных стволовых клеток

8. Криоконсервация

Криоконсервация – процесс замораживания и хранения биологических материалов и, в частности, клеток. В настоящее время, собранные и полученные клетки до момента использования в исследовательских целях сохраняются в жидком азоте. Сохранение при низкой температуре практически полностью блокирует все метаболические процессы в клетках (Makino S. et al., 1991).

Перед *криоконсервацией* клеток добавляют криоконсерванты для протекции от низких температур. Концентрация и соотношение с клетками криопротектора являются важными факторами, отвечающими за жизнеспособность клеток. Наиболее известный в настоящее время и более всего применимый криопротектор является *диметилсульфоксид* (ДМСО), который используется с 60-х годов прошлого столетия (Sputtek A., Köber C., 1991; Rowley S.D., 1992). Первые сообщения о лабораторных исследованиях ДМСО как криопротектора были выполнены на человеческих эритроцитах и сперматозоидах крупного рогатого скота.

ДМСО относительно свободно проникает внутрь клетки через мембраны и предотвращает формирование кристаллов льда внутри клетки, а также разрывы мембран во время замораживания. В доступной литературе описаны различные комбинации использования различных веществ с ДМСО (Halle P., 2001). Введение большого количества ДМСО в организм реципиента совместно с клетками часто приводит к различным токсическим реакциям, таким как тошнота, рвота, гипотензия, транзиторная гипертензия, нарушение ритма и более тяжелые, как анафилаксия и острая почечная недостаточность. Негативные эффекты от ДМСО зависят от количества погибших клеток, которые также могут вызывать побочные явления в виде лихорадки или схваткообразных болей в животе (Zambelli A. et al., 1998), поэтому у больных необходимо проводить превентивные мероприятия в виде введения антигистаминных или гормональных препаратов (Hermández-Navarro F. et al., 1995). У здоровых людей после введения значительного количества ДМСО могут возникать такие симптомы, как головная боль и различного рода реакции желудочно-кишечного тракта, не только от самого ДМСО, но и от его метаболита – *диметилсульфида*, который является более токсичным соединением и, в отличие от ДМСО, который выводится почками, в течение 2 суток продолжает выделяться через кожу, легкие и почки. Таким образом, попадание значительного количества ДМСО в организм может вызывать проблемы для здоровья в течение нескольких дней.

Замораживание клеток при низких температурах сохраняет их метаболические механизмы, но иногда приводит к повреждению клеточных мембран, потому что быстрое охлаждение в физиологическом растворе приводит к формированию кристаллов льда внутри клеток. Кристаллы льда разрушают мембранные барьеры клетки и клеточных органелл. Поэтому добавление различного рода криопротекторов просто необходимо. Раствор ДМСО – прозрачная, бесцветная жидкость, имеющая сильную связывающую способность для воды, поэтому он очень хорошо растворим в воде и спокойно проходит через клеточные мембраны, что создает прекрасные условия для поддержания постоянного осмотического градиента как внутри, так и снаружи клетки,

предохраняя от формирования кристаллов льда. К сожалению, выполняемые действия по криоконсервации для некоторых клеток являются губительными. Техника криоконсервации для СК и эритроцитов различна, чрезвычайно плохо криоконсервируются гранулоциты. В настоящее время поиск новых криопротекторов продолжается в основном в двух основных направлениях: 1) применение низкомолекулярных, хорошо проникающих в клетки соединений (в качестве таких соединений успешно апробированы димексид, диметилацетамид, 1,2-пропандиол и др.); 2) применение высокомолекулярных соединений, обеспечивающих криозащиту без проникновения в клетки.

Преимущества второго направления очевидны, однако существует много нерешенных проблем. В определенной мере обнадеживающие результаты получены при использовании в качестве криопротекторов *поливинилпирролидона* с молекулярной массой 12000–25000Д, *полиэтиленоксида* – с молекулярной массой 1500 и 4000Д (Иванов Д.В., 2000) и *оксиэтилкрахмала*.

Исторически сложилось так, что первое направление значительно опередило в своем развитии второе. Более того, проникновение криопротектора в клетки ранее считали необходимым условием их защиты. Действительно, присутствие криопротекторов внутри клеток снижает интенсивность процессов вымораживания воды из растворов, концентрирования внутриклеточных солей и величину возникающих на мембране градиентов концентраций. Тем не менее, после процедуры криоконсервирования внутриклеточный криопротектор может выступать в роли повреждающего фактора, если не приняты необходимые меры по его удалению из клеток до этапа их ресуспендирования в изотонической среде (Шахов В.П. и соавт., 2004).

Процедура удаления криопротектора из клеток (отмывание) требует соблюдения основного условия: осмотическое давление отмывающих растворов должно эффективно предотвращать набухание клеток до критических пределов, при которых возможны нарушения ионного баланса. Несмотря на трудоемкость процедуры отмывания, в настоящее время накоплен достаточно большой опыт длительного хранения замороженных тканей (в

том числе – клеток крови) с последующим клиническим применением.

С нашей точки зрения наиболее оптимальной является среда для криоконсервирования, когда используется заменитель эмбриональной телячьей сыворотки и криопротектор – ДМСО в соотношении 9:1. Криопробирки с суспензией клеток в среде для криоконсервирования постепенно охлаждают со скоростью $\sim 1^{\circ}\text{C}$ в минуту до -70°C и через 24 часа переносят на хранение в жидкий азот (-196°C). В этих условиях клетки могут храниться десятилетиями. В последующие годы они могут быть извлечены из криогенного хранилища, разморожены и использованы.

9. Реконсервация

Этап приготовления клеточного материала для последующих работ после длительного хранения в условиях низких температур – *реконсервация* – не менее важен, чем процесс *криоконсервации*. При заборе криопробирок из жидкого азота необходимо соблюдать технику безопасности (использовать защитные очки или маску, специальные перчатки и т.п.), так как при нарушении режима размораживания возможен взрыв криопробирок. После извлечения из сосуда Дьюара или криохранилища быстро помещают криопробирку с клетками в водяную баню ($37\text{--}38^{\circ}\text{C}$). Оставляют на несколько минут до оттаивания внутреннего содержимого. Проверку полного оттаивания внутреннего содержимого осуществляют плавным переворачиванием криопробирки до появления однородной клеточной массы без крупных конгломератов. Дальнейшие манипуляции проводят в стерильных условиях для снижения риска контаминации клеточного материала. Самый оптимальный вариант – это работа в ламинарных шкафах. После извлечения клеточного материала из криопробирок его откручивают в центрифугах при режимах $g = 600\text{--}1000\text{cm}^2/\text{c}$ в течении 7–10 минут для удаления супернатанта. Повторяют процедуру отмывания минимум 2 раза. После подготовки клеточного материала проверяют его жизнеспособность. В настоящее время появились автоматические счетчики, которые позволяют давать результаты в виде графиков и карти-

нок, на которых отражаются жизнеспособность клеток, их количество, размеры и многие другие параметры.

10. Фетальные клетки

Осуществлено изучение свойств и источников для получения *фетальных клеток*, под которыми понимаются клетки, которые получают с 9 недели развития человека. В последние 5 лет отмечен очевидный прогресс в описании базисных особенностей ЭСК и разнообразных типов взрослых СК, включая методы репрограммирования, определения сроков жизни СК и концепцию «ниш» нахождения (Klimanskaya I. et al., 2008). На *фетальные клетки* стали обращать больше внимания, что связано с получением результатов по применению взрослых СК. Их терапевтический потенциал был всегда высок, торможение развития в данной области связано с морально-этическими вопросами и отношением церкви. *Фетальные клетки* могут быть получены непосредственно из фетуса или же из поддерживающих структур фетуса (Nemberger M. et al., 2008). К ним относятся амниотическая жидкость, Вартонов студень, амниотическая мембрана, плацента, а также пуповинная кровь. Практически все эти источники после рождения ребенка утилизируются. Сейчас активно начинает использоваться пуповинная кровь. Все эти ткани содержат огромное количество клеток, причем легко получаемых для исследований особенностей популяций СК и, что самое главное, без каких либо морально-этических проблем по сравнению с ЭСК. Эти относительно новые источники дают также возможность проследить судьбу различных типов *фетальных клеток*. Особенно это может быть использовано для описания и прослеживания онтогенеза, т.е. развития определенного типа СК. Все выполненные до настоящего времени исследования показывают, что СК, полученные из фетальных источников, имеют схожие свойства с ЭСК по экспрессированию определенных маркеров (Guillot P.V. et al., 2007). Они обладают способностью к самообновлению, в то время как их спектр дифференцировочного потенциала, несмотря на место их локализации – *in vivo* или *in vitro*, размещается посередине между

плюрипотентными ЭСК и мультипотентными взрослыми СК. Рассмотрим более подробно каждый из источников.

10.1. Амниотическая жидкость

В рутинной медицинской практике амниотическая жидкость получается с помощью амниоцентеза для диагностических целей, однако совсем недавно появились работы, в которых имеются важные предположения о потенциале СК, полученных из амниотической жидкости и сделан акцент на возможность получения СК из альтернативного источника. Естественно, что популяция клеток в амниотической жидкости гетерогенна, в её состав входят клетки из всех трех зародышевых листков, и она содержит множество частично дифференцированных прогениторных клеток. Большинство из этих клеток имеют эпителиальное происхождение, т.е. происходят или из развивающегося фетуса или же из внутренней поверхности амниотической мембраны. Кстати, в отношении клеток, полученных из амниотической оболочки, идут оживленные дискуссии в отношении того, чтобы называть их «стволовыми клетками амниотической оболочки». Клетки амниотической жидкости на ранних этапах гестации экспрессируют большое количество эндодермальных и мезодермальных маркеров, по сравнению с более поздними сроками гестации, в тоже самое время различия по эктодермальным маркерам не отмечено вообще (Perin L. et al., 2008). Введение в практику двухстадийных культуральных протоколов позволило не только изолировать, но и клонально нарастить *мультипотентные мезенхимальные СК* (ММСК) из амниотической жидкости второго триместра беременности и получить их фенотипические характеристики (Tsai M.S. et al., 2004). Эти ММСК из амниотической жидкости экспрессировали маркеры типичные для мезенхимальных клеток, в частности *CD29*, *CD90*, *CD166*, *CD73*, *CD105*, *CD49e* (Bossolasco P. et al., 2006; De Coppi P. et al., 2007; Roubelakis M.G. et al., 2007; Kolambkar Y.M. et al., 2007). Они были позитивны для интегрина *VLA5*, эндотелиального маркера *CD44* (*HCAM-1 antigen*), *CD58* и, самое важное, были негативны на гемопоэтические маркеры *CD45*, *CD34* и *CD14*, а

также негативны для миогенных маркеров (Bossolasco P. et al., 2006). Была также отмечена важная особенность клеток из амниотической жидкости: после клональных методов культивирования они начинали экспрессировать маркеры нейтральных клеток (Prusa A.R. et al., 2004). Проведённые исследования независимыми группами исследователей доказали, что эти клетки могут проявлять характеристики мультипотентных СК благодаря обнаруженным у них маркерам СК таких как *Oct-4*, *Nanog*, *SSEA-4*. Устойчивая экспрессия маркера *Oct-4* в культуре МСК из амниотической жидкости по данным одних авторов (Roubelakis M.G. et al., 2007) составила 30 пассажей, других исследователей (Kim J. et al., 2007) только до 19 пассажа. И в первом, и во втором случае – это большое количество пассажей для «разгона» культуры. Более того эти клетки после методов клонального культивирования поддерживались в недифференцированном состоянии и сохраняли плюрипотентность, клонногенность и, особенно важно, геномную стабильность. Сохранение геномной стабильности говорит об отсутствии патологически изменённых популяций клеток, или, в клинической практике – отсутствие туморогенной трансформации введённого материала. Проверка геномной стабильности проводилась с помощью анализа кариотипа, и по данным клеткам одной группой учёных проверялась более чем на 250 популяциях, другой группой учёных (Roubelakis M.G. et al., 2007) проверялись более чем 20 пассажей. Проведён успешный опыт поддержания культуры мезенхимальных клеток из амниотической жидкости в течении 8 месяцев (Kim J. et al., 2007)! При этом сохранялся стабильный кариотип и высокая пролиферативная активность. Пролиферативная активность по одним данным составила 36 часов, когда количество клеток увеличивается в 2 раза, по данным других исследователей (Roubelakis M.G. et al., 2007) составила 18 часов. Систематическое изучение популяции мезенхимальных клеток из амниотической жидкости показало, что данные клетки очень быстро пролиферируют. Наблюдалось более чем 9-ти кратное логарифмическое увеличение со средним периодом 32,9 дня независимо от гестационного срока (Kunisaki S.M. et al., 2007). Этот пример наглядно говорит о том, что для получения 100×10^6

клеток необходимо всего лишь 5 мл амниотической жидкости. Другие работы зафиксировали достоверную корреляцию между получением МСК и плотностью посева при культивировании при низкой плотности (400 клеток на см²). В результате увеличение дублирования популяции происходило в 21 раз (Sessarego N. et al., 2008). Количество МСК из амниотической жидкости оценивается от 0,9 до 1,5 %, в то время, как приблизительно 2,7x10⁵ МСК из амниотической жидкости может быть получено при начале культивирования из каждого образца. Наконец, клонально увеличенные МСК из амниотической жидкости показывают широкий спектр дифференцировочного потенциала, давая линии таких клеток, как адипоциты, хондроциты, остециты, гепатоциты, нейральные клетки и кардиомиоциты (Tsai M.S. et al., 2006; De Coppi P. et al., 2007). Достоверно доказано присутствие плюрипотентных клеток в амниотической жидкости, благодаря использованию позитивной иммуноселекции с применением поверхностного антигена *CD117* (*c-kit* рецептор) и тирозинкиназного фактора специфичного для СК, которые первично присутствуют на ЭСК и первичных зародышевых клетках. Прямое доказательство плюрипотентности этой *CD117*⁺ популяции СК было получено впервые с помощью изящного метода, тестирующего клональные линии, и подтверждённого потом с помощью мечения ретровирусами. Установлена способность клеток *in vivo* дифференцироваться в функциональные клетки всех трёх зародышевых ростков. Эти *c-kit*⁺ клетки могут представлять те же самые плюрипотентные СК, которые были получены из культуры МСК из одной амниотической клетки и описаны ранее. Важно отметить, что ни одна из описанных выше клеточных линий после результатов тестирования не привела к тератомам, что крайне важно для дальнейшего безопасного использования СК, полученных из амниотической жидкости, в клинических целях. Хотя метод оценки туморогенности в данных исследованиях выполнялся при жёстких условиях и адекватном контроле, должно быть отмечено, что отсутствие формирования тератомы просто говорит о низкой скорости роста и незначительной степени спонтанной пролиферативной способности и дифференцировки этих СК. Главные шаги вперёд для углублён-

ного понимания функциональных клеточных взаимодействий *фетальных* СК по сравнению с взрослыми СК были сделаны совсем недавно как на *транскриптомном*, так и на *протеомном* уровнях. Эти работы показали не только наличие в ядре клеток целого ряда белков и генов транскрипции, которые присутствуют в МСК из разнообразных источников, но также и зафиксировали уникальные особенности, опосредованные транскриптами и белками, связанными с пролиферацией и примитивным фенотипированием СК как в амниотической жидкости, так и в амниотической оболочке, пуповинной крови и костном мозге. Остаётся проверить предположение: действительно ли это протеины и какова их значимость в придании индивидуальных особенностей различным типам *фетальных клеток*. Применение *in vivo* МСК из амниотической жидкости сейчас только начинается. Это несмотря на то, что данные клетки проявляют характеристики *кардиомиоцитов* (Zhao P. et al., 2005). Использование их на моделях ишемии не привело к дифференцировке в *кардиомиоциты*, однако резко усилило процессы неоваскуляризации (Sartore S. et al., 2005). Эти данные доказывают, что данные клетки требуют репрограммирования до введения (Chiavegato A. et al., 2007). Похожие предварительные результаты были достигнуты при восстановлении повреждённого седалищного нерва (Pan H.C. et al., 2006), восстановлении частичного или полного циркулярного дефекта трахеи (Kunisaki S.M. et al., 2007), создании клапанов сердца (Schmidt D. et al., 2007), интеграции в повреждённую почку и выживание в ткани почки, или, через паракринный эффект, отображение комбинированного эффекта на посттравматическое ремоделирование и гладкомышечную регенерацию мочевого пузыря.

10.2. Вартонов студень

Вартонов студень, или слизистая соединительная ткань пупочного канатика, содержит в себе СК, которые называются некоторыми авторами СК *матрикса пуповины* (Weiss M.L. et al., 2006), или *периваскулярные клетки пуповины канатика* (Sargaser R. et al., 2005), или *стромальные клетки* (Karahuseyinoglu S.

et al., 2007). Данные клетки в последние годы были подробно исследованы и получили описательные характеристики (Mitchell K.E. et al., 2003; Wang H.S. et al., 2004; Sarugaser R. et al., 2005; Weiss M.L. et al., 2006; Karahuseyinoglu S. et al., 2007). Эти клетки представляют собой более насыщенный вид по сравнению с МСК, полученными из костного мозга, или крови пупочного канатика. В частности, эти стромальные клетки были изолированы из слизистой соединительной ткани, которая называется *Вартонов студень*, окружающей две артерии и одну вену пупочного канатика. Они являются миофибробластными клетками различного пространственного расположения, причём большинство пролиферирующих клеток располагается возле амниотической поверхности, в то время как *фибробластоидные клетки* (по-другому – *периваскулярные СК*), располагаются ближе к трём сосудам. Систематическое изучение позволило охарактеризовать различные стадии их роста *in vivo* в течение 10-ти месячного периода и выделить некоторые исключительные особенности *стромальных клеток* пуповины (Karahuseyinoglu S. et al., 2007). Из одного образца крови пуповинного канатика может быть получено около $3,6 \times 10^6$ жизнеспособных *стромальных клеток*, в то время, как общее их количество к 7 месяцам составляет приблизительно $11,5 \times 10^8$ клеток, показывающих стабильную теломеразную активность до 6 пассажа (Karahuseyinoglu S. et al., 2007). В других работах зафиксировано получение около 17×10^3 клеток на 1 см длины пуповины, разброс составляет от 10×10^3 до 50×10^3 клеток на 1 см (Weiss M.L. et al., 2006). Обнаружено также, что морфологически *стромальные клетки Вартонова студня* состоят из двух типов популяций клеток. Разделение основано на их особенностях в экспрессии виментиновых и цитокератиновых филаментов, разделяя похожие способности дифференцироваться в несколько линий клеток, исключая нейрональные клетки (Karahuseyinoglu S. et al., 2007). Изолированные *стромальные клетки* пуповины при культивировании в условиях исключаяющих остеогенное направление – дают популяцию МСК с гомогенной фибробластной морфологией и высокой степенью пролиферативной активности и дифференцировки в костные узелки. Определено, что

данные клетки содержат легко нарастающую субпопуляцию клеток, которые не экспрессируют ни 1, ни 2 класс комплексов гистосовместимости, а это – важная особенность для дальнейшего клинического применения, так как отсутствие комплексов гистосовместимости обеспечивает полное приживание клеточного материала. Более того, около 20 % периваскулярных клеток пуповины вообще не экспрессируют антигенов комплексов гистосовместимости. Причём данная популяция способна увеличиваться до 95 % после пассажей и криоконсервации (Sagugaser R. et al., 2005). Однако никаких данных *in vivo* по этим свойствам не получено, или же они действительно могут поддерживать этот фенотип вследствие дифференцировки. МСК, полученные из *Вартонова студня* не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток, зато отлично экспрессируют типичные маркеры, свойственные мезенхимальным клеткам, а также могут дифференцироваться в *адипоциты*, *остеогенные* и *хондрогенные клетки*, *кардиомиоциты* (Wang H.S. et al., 2004), *нейроны* или *глиальные клетки* (Mitchell K.E. et al., 2003), и даже, в *допаминэргические* нейроны, которые могут частично корректировать нарушение обмена амфетаминов на крысиной модели болезни Паркинсона (Fu Y.S. et al., 2006). Более того, как показали последние исследования у человека (Weiss M.L. et al., 2006) и свиньи (Carlin R. et al., 2006), *стромальные клетки Вартонова студня* экспрессируют дополнительные ЭСК маркеры, такие как *Oct-4*, *Sox-2*, *Rex-1*, *Nanog*.

Были успешно оценены поведенческие эффекты человеческих *стромальных клеток* пуповины на крысиной модели болезни Паркинсона (Weiss M.L. et al., 2006). Важно заметить, что это исследование зафиксировало отсутствие туморогенных формирований в течение 12 недельного периода наблюдения. Однако, необходимо проводить дальнейшие исследования, подтверждающие безопасность этих клеток в более поздние сроки. Уже было несколько попыток оценки дифференцировки *in vivo* *стромальных клеток Вартонова студня* для клеточной терапии. В частности, была проведена успешная работа на мышах по регенерации мышц после тяжёлого повреждения мышечной ткани (Conconi M.T. et al., 2006).

10.3. Амниотическая оболочка

Совсем недавно выяснилось, что амниотическая оболочка, или просто – амнион, может представлять собой новый и альтернативный источник получения популяции *фетальных* СК. Особенность амниона в том, что он состоит из трёх слоёв клеток и после 8 дня развития в нем не существует сосудистой сети. Три слоя включают в себя: *внутренний эпителиальный слой*, который состоит из эпителиальных клеток и у них есть название *амниотические эпителиальные клетки*; *промежуточной основной мембраны*, которая вообще не имеет клеточных элементов и, наконец, *наружный слой*, который тесно соединён с хорионом и состоящий из мезенхимальных клеток, называющихся *амниотическими мезенхимальными* или *мезенхимальными стромальными клетками* амниотической оболочки. Так как эти амниотические клетки часто называются СК из амниона, происходящие из эпибластных клеток, считается, что они могут отражать некоторые особенности СК в течение всего периода гестации и ассоциируются с клетками, которые экспрессируют незначительное количество *HLA*-антигена. Первичные эпителиальные клетки амниона содержат антигены главного комплекса гистосовместимости 1А и 2 класса, согласующиеся с низким риском тканевого отторжения. Однако, вследствие дифференцировки в клетки поджелудочной железы или в печени, но не в кардиогенном направлении, статистически значимый процент клеток начинает экспрессировать антигены класса 1А главного комплекса гистосовместимости, но не 2 класса (Plancheran S. et al., 2007). Следовательно, необходимо проводить дополнительные исследования для лучшего понимания механизмов антигенной экспрессии до того момента как данные клетки попадут в клинику. Недавно проведенные исследования амниона выявили среди эпителиальных клеток около 10% клеток, которые экспрессировали маркеры СК, в частности *SSEA-4*, *Tra1-60*, *Tra1-80* (Miki T. et al., 2007), домен *POU*, *Nanog*, гены *SRY-box* (Plancheran S. et al., 2007). Причём именно в эпителиальных, а не в мезенхимальных клетках амниона. Необходимо заметить, что клеточная гетерогенность в распределении маркеров СК в данном феталь-

ном материале говорит о том, что популяция СК человеческого амниона представлена в разных местах во время развития и дифференцировки организма, т.е. она перемещается из одного участка в другой. У эпителиальных клеток амниона была обнаружена способность дифференцироваться во всех клетках трёх зародышевых листков (Miki T., Strom S.C., 2006). Эти особенности эпителиальных клеток можно связать с тем фактом, что они напрямую происходят из эпибласта и таким образом могут сохранять в себе пластичность прегастральной ЭСК. Однако, важно отметить что эти СК амниона, в отличие от ЭСК, не образуют тератому *in vivo*, как минимум в течение 10 недель после введения (Pancheran S. et al., 2007). Пластичность СК, полученных из амниона, была проверена на клональном уровне, где были зафиксированы способность к мультидифференцировке и многократному самообновлению популяции (Marcus A.J. et al., 2008). Пролиферативная частота мезенхимальных клеток амниона составила приблизительно 300 кратное увеличение за 21 день, прибавка составляла $2,9 \times 10^6$ клеток (Alviano F. et al., 2007). Необходимо отметить, что наружный слой амниона представляет собой богатый источник МСК со способностью этих клеток дифференцироваться в эндотелиальные клетки *in vitro* (Alviano F. et al., 2007), а *кардиомиоциты* и *гепатоциты* как *in vitro*, так и *in vivo* (Tamagawa T. et al., 2007). Другой важной особенностью мезенхимальных клеток амниона является их способность проявлять контактный и дозозависимый иммуномодуляторный эффект на мононуклеары в периферической крови (Wolbank S. et al., 2007). Эти свойства отражают общую способность МСК или *стромальных клеток*, полученных из разных источников, высвобождать оксид азота в ответ на появление провоспалительных цитокинов из активированных Т-клеток (Keating A., 2008). Эти новые разъяснения механизмов иммуномодулирующего эффекта МСК обеспечивают возможность действительно использовать эти мультипотентные СК в качестве альтернативного источника клеток для применения в тканевой инженерии, как аллогенный материал.

10.4. Плацента

Плацента представляет собой важнейший источник для получения СК с разнообразной потенцией. Развивается плацента из трофобластической мезенхимы, состоящей из трофобластных компонентов, включающих цитотрофобласт и синцитотрофобласт. Чистая популяция СК из тканей человеческой плаценты (Hemberger M. et al., 2008) состоит из хориональных мезенхимальных стромальных клеток и хориональных трофобластных клеток. Обе популяции проявляют изменчивую пластичность (Parolini O. et al., 2008). Находиться в недифференцированном состоянии трофобластными СК удаётся благодаря воздействию транскрипционного гена *Ets2* (Wen F. et al., 2007). Благодаря экспрессии специфических маркеров (*FZD9* или *CD349*) мезенхимальными клетками плаценты, их легко селективно выделить (Battula V.L. et al., 2008). Недавно была выделена из материнской части (париетальная оболочка) популяция СК плаценты, равномерно экспрессирующая маркеры плюрипотентности (*SSEA-4*, *SSEA-1*, *Oct-4*, *Stro-1*, *Tra 1-81*), наряду с мезенхимальными и гемопоэтическими маркерами (Strakova Z. et al., 2008). Мезенхимальные клетки, полученные из плаценты, более эффективны, чем МСК из костного мозга, в поддержке клеток, как фидерный слой и позволяют дольше размножаться человеческим ЭСК (Kim S.I. et al., 2007). Однако не обнаружено достоверных различий в количестве необходимых клеток и скорости роста между МСК из костного мозга и МСК из плаценты (Miao Z. et al., 2006). Характеристики СК, полученных из плаценты, такие же как и у МСК по иммуномодуляторным свойствам (Li C. et al., 2007; Jones B.J. et al., 2007; Li D. et al., 2007) с дополнительно индуцированной экспрессией плюрипотентных маркеров *SSEA-4*, *Nanog 3*, *Oct-4* (Battula V.L. et al., 2007) и *Rex-1* (Fukuchi Y. et al., 2004). Они также проявляют типично широкий спектр дифференцировочной способности МСК (Fukuchi Y. et al., 2004; In't Anker P.S. et al., 2004; Portmann-Lanz C.B. et al., 2006; Battula V.L. et al., 2007; Parolini O. et al., 2008), включая дифференцировку в нейрональные и глиальные клетки *in vitro* (Yen B.L. et al., 2008), инсулин-позитивные клетки как *in vivo*, так и *in vitro* (Chang C.M. et al.,

2007), *гепатоциты* (Chien C.C. et al., 2006) и даже создание клапанных структур сердца на биodeградируемом каркасе (Schmidt D. et al., 2006). Примечательно, что недавно было обнаружено свойство маркера плюрипотентности *Oct-4* снижать свои эпигенетические способности через процессы метилирования в *плаценте*, что может быть важным в понимании патогенеза возникновения болезни трофобласта во время беременности (Zhang H.J. et al., 2008). Недавно было также обнаружена способность СК, полученных из плаценты, дифференцироваться в эндотелиальные клетки (Wu C.C. et al., 2008). Интересно отметить, что были обнаружены различия между эндотелиальными клетками полученными из артерий и вен *плаценты* (Lang I. et al., 2008). Фенотипические, генотипические и функциональные особенности, включая пластичность, тесно связаны с высокопластичным фенотипом венозных клеток, а не с более зрелым фенотипом артериальных клеток, что поддерживает теорию о роли эндотелиальных прогениторов, оставшихся в тканях во время эмбрионального развития, для их формирования (Lang I. et al., 2008). По взаимодействию с другими типами СК клетки из *плаценты* проявляют более выраженные свойства по приживлению, чем, например, СК полученные из костного мозга, и все это благодаря более эффективному использованию *VEGF* опосредованным связям (Brooke G. et al., 2008). Специфические производные из культивированных МСК плаценты обозначают как *PLX-I*, также имеют усиленное приживление по сравнению с ГСК (Prather W.R. et al., 2008). Циркулирующие фетальные фиброциты, которые обнаруживаются после первой открутки клеток из сосудов пуповины и *плаценты*, представляют собой важное хранилище для ключевых клеточных популяций плаценты (Kim J.S. et al., 2008). Более важный момент заключается в том, что мигрирующие фетальные фиброциты были обнаружены в изменённом виде в недоразвитой матке, что даёт возможность определить их роль в развитии этой патологии. Удалось выяснить вероятный механизм перемещения клеток между матерью и плодом, приводящий в результате к материнскому микрохимеризму, с помощью циркулирующих материнских мультипотентных МСК. С помощью *VEGF-A* и интегрин зависимый путь,

они проникают через гемохориальную часть плаценты в плод, где и были обнаружены у фетуса (Chen C.P. et al., 2008). Более того, недавние экспериментальные исследования представили неопровержимые доказательства того, что ткани *плаценты* за жёлтым мешком и дорсальной и желточной аортой также являются подлинными и самостоятельными местами регенерации ГСК, развивающимися до стадии фетальной колонизации (Rhodes K.E. et al., 2008). Циркулирующие в плаценте $CD34^+$ гемопоэтические прогениторные клетки и $CD31^+$ и $CD133^+$ эндотелиальные клетки плаценты – окружают кровеносные сосуды плаценты и экспрессируют модулярный белок *ACBD6*. В настоящее время считается, что данный белок находится в гемангиогенных СК, которые являются предшественниками клеток крови и сосудов (Souprene E. et al., 2008). Не решённый на данный момент вопрос о происхождении раковых СК может быть решён с помощью модели хориокарциномы, которая является новообразованием из цитотрофобласта и синцитотрофобласта. Иммуногистохимические исследования выявили, что она компонуется в большей степени из синцитотрофобласта и интермидии трофобласта и совсем в малого процента клеток цитотрофобласта (Мао J.L. et al., 2007). Часть из небольшого процента клеток, которые экспрессируют ядерный β -катенин, представляют собой чисто раковые СК, которые дают две популяции малигнизирующих опухолей (Мао J.L. et al., 2007).

10.5. Пуповинная кровь

В течении последних 20 лет *пуповинная кровь* (ПК) преподносится как насыщенный источник гемопоэтических и прогениторных СК с установленным терапевтическим эффектом в лечении нарушенного гемопоэза (Врохмeyer H.F. et al., 2006). Данные методики лечения гематологических больных принесли неоспоримые доказательства успеха клеточных технологий. Около 1% мононуклеаров ПК экспрессирует $CD34+$ антиген, который является основным маркером ГСК. Способность $CD34+$ клеток к самообновлению и дифференцировке в несколько клеточных линий была неоднократно доказана как *in vitro*, так и *in vivo*,

включая оценку репопуляции гемопоэтических клеток у иммунодефицитных мышей (Wrochmeyer H.E., 2005). Репопулирующие клетки у мышей экспрессировали высокий уровень *CD34+*. Количество клеток с высоким уровнем экспрессии *CD34+* в ПК намного выше по сравнению с материалом, полученным из костного мозга или периферической крови после мобилизации цитокинами. Эффект приживляемости у ГСК в место трансплантации опосредован через специфическую кратковременную репопуляцию (Mazurier F. et al., 2003). Хотя ГСК из ПК успешно увеличиваются в количестве до трансплантации, чтобы улучшить свою способность для *хоуминга* и приживляемости, они начинают проявлять свойства утраты долговременного приживания (McNiece I.K. et al., 2002). Эти результаты косвенно подтверждают, что помимо цитокиновых эффектов, необходимы клеточные и молекулярные факторы для хорошего приживания и *хоуминга*. Поэтому кажется правильным направление в настоящее время на модификацию главных компонентов клеточной мембраны, вовлечённых в основные тропы трансдукции сигналов, таких как *Notch* и *Wnt3a* (Stier S. et al., 2002). Дополнительные работы по изучению профиля экспрессии ГСК ПК, подразумевают в будущем понимание механизмов воздействия на самообновление, способность к росту и увеличение потенциала приживляемости этих клеток.

В настоящее время наблюдается прогресс в понимании роли МСК в поддержании и росте популяции ГСК *in vivo*. Важно отметить, что ГСК из ПК экспрессируют нейрональные белки и могут дифференцироваться в *глиальные* или подобные *нейронам* клетки (McGuckin C.P., 2004). Основываясь на вышеназванных свойствах клеток ПК, выполненные исследования на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний, подтвердили, что клетки ПК экспрессируют нейрональные маркеры, способны образовывать нейрон-подобные клетки, что приводит к улучшению неврологической симптоматики. Механизмов, которые предположительно задействованы в улучшении неврологической симптоматики, – несколько. Во-первых – высвобождение ростовых факторов и цитокинов клетками ПК; во-вторых – неоваскуляризация ишемической зоны; в-третьих –

стимуляция регенерации скелетной мускулатуры прогениторными клетками ПК без эффекта длительного приживания (Koronen J.K., 2007).

МСК ПК представляют собой вторую главную популяцию и обладают фенотипом, который наиболее всего похож на ЭСК. Кроме типичных для МСК маркеров таких как *CD105(SH2)*, *CD73(SH3)*, *CD44*, они ещё экспрессируют маркеры ЭСК, такие как *Oct-4*, которые необходим для ингибирования тканеспецифичных генов, и таким образом поддерживает свойство самообновления и плюрипотентности (Greco S.J., 2007). Костный мозг (КМ) и клетки ПК традиционно считаются двумя основными источниками получения МСК и действительно содержат большинство клеточных популяций мультипотентных предшественников, пригодных не только для научного изучения, но и для клинического применения. Недавно впервые продемонстрировали увеличение количества МСК из пуповинной крови для клинического применения, при культивировании которой не использовалась бычья сыворотка (Reinisch A. et al., 2008). Использование фетальной бычьей сыворотки при культуральных работах – основная проблема для дальнейшего клинического применения из-за наличия ксеногенных белков для пациента, особенно при повторных применениях.

Работы по изучению дифференцировочной способности МСК из двух источников – КМ и ПК показали, что МСК из ПК проявляют больший остеогенный потенциал, но меньший адипогенный потенциал по сравнению с МСК из КМ (Chang Y.J. et al., 2006). Оба типа клеток отвечают на воздействие лептина, регуляторного белка, стимулирующего остеогенез, но блокирующего адипогенез, а также модулируются другими важными медиаторами *Cbfa1* и *PPAR2*, соответственно. Более того, недавно теми же исследовательскими группами проведены работы с использованием метода ограниченного разведения, в результате которых обнаружены две популяции МСК в ПК с различиями в морфологическом фенотипе, но имеющие одинаковые поверхностные маркеры и одинаковый дифференцировочный потенциал, исключая адипогенез (Chang Y.J. et al., 2006). Факт, что большинство клеток, имеющие фенотип *CD90* – теряют способ-

ность подвергаться адипогенезу, может объяснить уменьшение потенциала МСК из ПК дифференцироваться в адипоциты (Chang Y.J. et al., 2006).

Резюме

Потенциальные терапевтические свойства *фетальных* СК из разнообразных фетальных источников постепенно переходят на клинический уровень через создание комплексного международного руководства по клиническому применению СК и их производных (Daley G.Q. et al., 2008). СК, полученные из этих фетальных, не затрагивающих фетуса тканей, в большинстве своём имеют мезенхимальный тип и преимущество в виде быстрого наращивания общего количества клеток при культивировании, что необходимо при клиническом использовании. Помимо этого, они ничтожно иммунодефицитны, не обладают признаками формирования тератом и не вызывают этических проблем. В ближайшем будущем эти особенности позволят провести клинические испытания клонально полученных МСК для лечения различных заболеваний. Ввиду того, что совсем недавно были получены производные ЭСК, которые называются сейчас *индуцированные плюрипотентные клетки*, предполагается, что имеются как минимум 2 разных статуса плюрипотентных клеток: или как эпибластные прогениторы, или как плюрипотентные прогениторы поздних стадий гастрюляции эмбриона (Rossant J., 2008). *Индукцированные плюрипотентные клетки* получают благодаря репрограммированию взрослых клеток, типа фибробластов (Jaenisch R., Young R., 2008). Однако, недавние исследования разнообразных типов *фетальных* СК, подтвердили, что они представляют собой новый класс СК, располагающихся по развитию и деятельности между ЭСК и взрослыми СК, сочетающими в себе особенности плюрипотентности и мультипотентности без выводов о том, что они могут создать любую ткань (Gilbert S.F. et al., 2005; Gilbert S.F., 2006; Emanuel P., 2007). Однако, выделение исключительного статуса для данных клеток, как источника получения плюрипотентных клеток, в ближайшем будущем необходимо для того, чтобы лучше понимать

разнообразные механизмы репрограммирования как *фетальных*, так и взрослых дифференцированных клеток.

Обобщая полученные сведения, выделим несколько особенностей *фетальных* СК:

1. *Разнообразные типы фетальных СК*

– *фетальные* СК научились изолировать из нескольких тканей (амниотическая жидкость, Вартонов студень, амнион, плацента, пупочный канатик);

– они получают непосредственно из фетуса или структур окружающих фетус;

– они представляют идеальный источник клеток для восстановительной медицины, потому что их легко получить, они имеют высокий пролиферативный потенциал, не формируют тератом и не имеют проблем связанных с ЭСК;

– их функциональной особенностью является то, что они представляют собой популяцию клеток между ЭСК и взрослыми СК.

2. *СК из амниотической жидкости*

– представляют собой гетерогенную популяцию происходящую из всех трёх зародышевых слоёв;

– клонально выращенные МСК, полученные из амниотической жидкости экспрессируют маркеры СК (*Oct-4*, *Nanog*, *SSEA-4*);

– имеют широкий спектр дифференцировочного потенциала;

– клетки *CD117*⁺ из популяции СК *in vivo* проявили свойства плюрипотентных СК.

3. *Клетки из Вартонова студня*

– недавно выделены и охарактеризованы;

– экспрессируют маркеры ЭСК (*Oct-4*, *Nanog*, *SSEA-4*) без маркеров МСК;

– исследования на животных показали их способность восстанавливать поражённые мышечные ткани.

4. *СК из амниотической оболочки*

– амниотическая оболочка происходит из эпибласта после 8 дня развития и состоит из 3 слоёв;

– СК, полученные как из внутреннего слоя (амниотические эпителиальные клетки), так и наружного слоя (МСК амниотической оболочки) проявляют разнообразную степень дифференцировочного потенциала;

– как эпителиальные, так и МСК амниотической оболочки имеют дозозависимый и контактзависимый иммуномодуляторный эффекты, что крайне важно при аллогенной тканевой инженерии.

5. *СК из плаценты*

– охарактеризовано несколько популяций СК из плаценты;
– они экспрессируют маркеры плюрипотентности (*SSEA-4*, *Oct-4*, *Stro-1*, *Tra1-81*), типичные маркеры МСК и имеют широкий спектр дифференцировки;

– способны *in vivo* дифференцироваться в нейрональные и глиальные клетки, инсулин-позитивные клетки и гепатоциты, а также создавать клапанные структуры на носителях.

6. *СК из пуповинной крови*

– становятся основной клеточной популяцией мультипотентных СК для терапевтического применения;

– большинство исследований сфокусировано на МСК и *CD34⁺* гемопоэтических СК;

– представляют собой две популяции МСК, имеющих похожие маркеры, но разный потенциал дифференцировки.

ГЛАВА II

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОИНФОРМАТИКИ В МЕДИЦИНЕ

1. Математическое моделирование в медико-биологических исследованиях

В последние несколько десятилетий разработка методов математического моделирования различных патологических процессов, состояний и заболеваний ведется очень активно. Результаты данных работ отражены во множестве публикаций. Рассматриваются биохимическая и электрокардиографическая модели инфаркта миокарда, анализ которых выявил механизм его формирования и некоторые закономерности его течения (Белоцерковский О.М., 2001, 2005; Петров И.Б., 2009). Сопоставление результатов расчетов с клиникой острого инфаркта миокарда выявило, что они позволяют отличить инфаркт миокарда легкого клинического течения от инфаркта тяжелого клинического течения. Механическая модель сердца рассматривалась в работах (Петров И.Б., 2003). Исследование распространения импульсов Пуркинье проводится в работах (Пашков Р.А., Петров И.Б., 2002). Описание простейших математических моделей работы систем кровообращения и сердца можно найти в работе П.И. Бегуна и П.Н. Афолина (2004). Математическое описание работы дыхательной системы на участке трахея – бронхи представлено в работах (Евдокимов А.В., Холодов А.С., 2001; Холодов А.С., 2001). Моделирование функционирования кровеносной системы, базирующееся на квазитрехмерной модели системы кровообращения, предложено А.В. Евдокимовым и А.С. Холодовым (2001). Нестационарный квазиопериодический режим кровообращения головного мозга рассматривался в работе Ашметова И.В. (2005).

По инициативе нейрохирургов Главного военного клинического госпиталя им. Н.Н. Бурденко и Института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского была поставлена задача о расчете последствий черепно-мозговых травм. Экспериментальным данным, описывающим последствия черепно-мозговых травм, по-

священы хорошо известные в нейрохирургии работы (Лебедев А.П., Крылов В.В., 1998). Также вопросам математического моделирования последствий черепно-мозговых травм были посвящены работы (Агапов П.И., Петров И.Б., 2006; Агапов П.И., Васюков А.В., Петров И.Б., 2006).

К проблеме математического моделирования травматологических процессов относится задача о заживании ран. Численному изучению этого процесса посвящены работы (Пашков Р.А., 2005; Olsen L., Sherratt J.A., Maini J.A. and P.K. A, 1995), в которых получено количественное описание динамики заживания резаной раны кожного покрова человека. Важнейшей областью в травматологии является проблема математического моделирования движения ног человека при ходьбе с целью построения ортопедических протезов, имитирующих их движение. Авторы работы (Фарбер Б.С., Витензон А.С., Морейнис И.Ш., 1995) не только строят такие модели, но и реализуют их.

Перспективным направлением вычислительной медицины представляется компьютерная реализация виртуальных хирургических операций и предсказания их последствий. Так, в работе Д.С. Жукова, И.Б. Петрова, А.Г. Тормасова (1991) представлено численное моделирование операций литотрипсии. Целью этих исследований было найти режимы работы литотриптора (длительность и интенсивность импульса, количество импульсов), при которых фрагменты разрушенного камня были бы достаточно малыми для выведения из организма естественным путем. Для этого численно исследовалась картина распространения акустического импульса в теле и в камне, а также решалась задача его разрушения. Другой пример – моделирование офтальмологической операции экстракции катаракты (Балановский Н.Н., 2003).

Важным приложением вычислительной медицины являются проблемы предсказания динамики развития онкологических заболеваний, то есть развития опухолей, в том числе с учетом кровообращения. Для их численного решения используются уравнения гидродинамики, уравнения типа реакция-диффузия. С помощью нелинейных уравнений параболического типа (реакция-диффузия) проводится также и численное моделирование процессов структурообразования в активных биосредах, коло-

ниях бактерий, микроорганизмов (например, *Escherichia coli*, *Distyostelium discoideum*). Этим задачам посвящены работы, в которых численно решаются двух- и трехмерные динамические задачи об образовании таких структур.

При изучении некоторых медицинских процессов необходимо численно решать жесткие системы обыкновенных дифференцированных уравнений, например, при моделировании протекания химических реакций, что представляет собой самостоятельную проблему, которой посвящена обширная литература (Федоренко Р.П., 1991; Хайер Э., Винер Г., 1999).

Методы математического моделирования широко применяются в описании процессов свободно-радикального окисления и регуляции агрегатного состояния крови. Общей целью данных исследований было выявление и анализ механизмов регуляции свертывания крови при помощи математических моделей.

Предложены оригинальные математические модели свертывания крови, активированного по внешнему пути, количественно описывающая процесс свертывания как в гомогенной, так и в пространственной экспериментальных постановках. В качестве объекта моделирования были выбраны две экспериментальные модели гемостаза. Первой моделью был тест генерации тромбина, в котором свертывание в плазме или в цельной крови активируется *тканевым фактором* (ТФ) и регистрируется изменение активности тромбина со временем. Второй моделируемой системой была разработанная в лаборатории физической биохимии ГНЦ РАМН методика по исследованию пространственного формирования фибринового сгустка в тонком, перемешиваемом слое рекальцифицированной плазмы при активации свертывания монослоем клеток, экспрессирующих ТФ. Практическое применение разработанной модели заключалась в том, что с ее помощью автором был проведен анализ чувствительности и информативности теста генерации тромбина, показано различие механизмов работы внутреннего и внешнего путей в фазе распространения свертывания: установлено, что активированный фактор X производится внутренней теназой, тогда как фактор IX активируется по внешнему пути и распространяется в пространстве путем диффузии, оценен вклад ТФ-

зависимого и ТФ-независимого механизмов действия препарата NovoSeven в нормализацию генерации тромбина в плазме больных гемофилией и показано, что при физиологических условиях главным является вклад ТФ-независимого механизма, представлено теоретическое обоснование терапевтической эффективности гипердоз препарата NovoSeven, был предсказан эффект локализации фибринового сгустка в присутствии тромбомодулина, подтвержденный экспериментом. Также в этой работе Пантелеевым М.А. было экспериментально показано, что фактор VIIIa связывает фактор X на фосфолипидных мембранах и регулирует его доставку к ферменту в реакции, катализируемой внутренней теназой, предложен механизм регуляции внешнего пути свертывания крови ингибитором пути тканевого фактора.

В дальнейшем были разработаны алгоритмы анализа сложных сетей биохимических реакций, основанный на применении функционально-ориентированного анализа чувствительности в комбинации с анализом временной иерархии процессов в системе, построена детальная математическая модель свертывания крови, превосходящая существующие аналоги корректностью описания биохимии свертывания и успешно прошедшая тестирование сравнением с большим набором экспериментальных данных (Пантелеев М.А., 2010).

Построенные модели описывают процессы свертывания крови либо в точечной, либо в пространственной системе. В частности, вариант модели для свертывания в точечной системе представляет собой систему из 24 обыкновенных уравнений, выписанных на основании закона действующих масс. Переменными модели служат концентрации шести ферментов (факторы VIIa, IXa, Xa, IIa, XIa, активированный протеин C), шести зимогенов (факторы VII, IX, X, II, XI, протеин C), двух активных кофакторов (Va, VIIIa) и двух их предшественников (V, VIII), двух стехиометрических ингибиторов (AT-III и TFPI), трех белков других классов (TF, фибрин, фибриноген) и трех комплексов (VIIa-TF, VII-TF, Xa-TFPI). Для некоторых видов расчетов в модель включались иные компоненты: тромбомодулин, комплексы и реакции с его участием; активация тромбоцитов. При построении модели сначала описывались отдельные реакции и простые системы из

нескольких очищенных белков, вплоть до достижения согласия с экспериментом. Затем моделируемые системы постепенно усложнялись, постоянно сопоставляясь с экспериментом. Диапазон параметров модели ограничивался экспериментально измеренными значениями. Юстирования констант не проводилось, лишь в некоторых случаях осуществлялся выбор между несколькими значениями, сообщавшимися разными группами. Конечная версия модели подверглась проверке путем сравнения с большим набором экспериментальных данных. В точном случае математическая модель интегрировалась численно с использованием солвера ode45 в MATLAB, версия R2008a (The MathWorks, Natick, MA, USA). Задача интегрирования системы уравнений в частных производных решалась вложенным методом Рунге-Кутты-Фельберга порядка 2(3). Численная схема реализована с помощью программы, написанной на Watcom C/C++ 10.0. (Пантелеев М.А., 2010).

С использованием математических моделей и экспериментальных данных выявлен механизм и динамика порогового поведения системы свертывания крови, экспериментально показана новая роль фактора VIII в регуляции доставки субстрата к ферменту в комплексе внутренней теназы, впервые построена детальная модель мембранно-зависимой реакции, катализируемой комплексом внутренней теназы, выявлен механизм, с помощью которого внутренняя теназа регулирует пространственную динамику свертывания крови, теоретически предсказана и экспериментально обнаружена локализация пространственного роста тромба *in vitro*; показано, что она определяется путем протеина C, установлено преимущественное связывание компонентов внутренней теназы с малой субпопуляцией, формирующейся при активации тромбоцитов.

Таким образом, с помощью математического моделирования выявлен новый режим регуляции внешнего пути ингибитором пути тканевого фактора, путем теоретических и экспериментальных исследований влияния препаратов Агемфил А, Коэйт DVI, НовоСэвен на динамику свертывания крови пациентов с гемофилией А *in vitro* установлены зависимости их эффективности от дозы, выявлены механизмы действия, предложены

стратегии по оптимизации терапии, показано, что в системе свертывания крови могут быть идентифицированы шесть функциональных модулей и соответствующих им функций.

Создание математических моделей свободно-радикальных процессов, а также работы в организме антиоксидантных систем отражено в ряде публикаций. Измайловым Д.Ю. (2003) была создана компьютерная программа для расчетов кинетики химических реакций, в которой реализован набор функций, облегчающих процесс математического моделирования, на основе экспериментальных данных хемилюминесценции суспензии фосфолипидных липосом определена минимально-достаточная математическая модель Fe-индуцированного перекисного окисления липидов, изучено влияние 20 комбинаций реакций антиоксидантного действия на кинетику хемилюминесценции (рассмотрены 4 реакции молекулы антиоксиданта и 5 реакций радикала антиоксиданта), на основе анализа реакций антиоксидантного действия предложена методика математического моделирования действия антиоксидантов и определения эффективных констант скоростей реакций. С использованием этой методики проведено математическое моделирование действия антиоксидантов α -токоферола, β -каротина, ионола, аскорбиновой кислоты, ликопина и ЭДТА. Для всех исследуемых жирорастворимых антиоксидантов (α -токоферол, β -каротин, ионол и ликопин) соответствие экспериментальных данных и математической модели было получено при использовании реакций взаимодействия с липидными радикалами. В ходе математического моделирования были определены значения эффективных констант скоростей этих реакций. Было показано, что в ряду жирорастворимых антиоксидантов происходит рост значений эффективных констант скоростей реакций в следующем порядке: ликопин < β -каротин < ионол < α -токоферол. При математическом моделировании водорастворимых антиоксидантов (аскорбиновой кислоты и ЭДТА) было показано, что их действие связано с изменением концентрации ионов железа.

Работы Хасая Д.А., Субботиной Т.И., Исаевой Н.М. посвящены математическому моделированию патогенетических взаимосвязей между показателями СРО и системы РАСК в случае воздействия на организм ЭМИ КВЧ без экранирования и с

экранированием биологического объекта шунгитом с использованием системы дифференциальных уравнений (Хасая Д.А., 2010). В данных исследованиях проводился корреляционный анализ между базовыми лабораторными показателями СРО и системы РАСК, составлялись уравнения множественной регрессии, после чего были построены поверхности регрессии и математические модели. В итоге были получены корреляционные зависимости, свидетельствующие о существовании патогенетической зависимости между высокой активностью коагулянтов и высокой активностью процессов ПОЛ. Методы математического моделирования позволили подтвердить эти зависимости.

Попытки применения математического моделирования использования клеточных технологий в биомедицине проводились в 80-х гг. XX века. В исследованиях А.Д. Андреева описываются математические модели восстановления клеток от радиационного поражения (модели восстановления клеток при остром облучении и метод уменьшения эффективной дозы, общая модель восстановления при произвольных условиях облучения, специальные случаи общей модели – модель восстановления при фракционировании, модель восстановления при пролонгированном облучении, а также модель восстановления при облучении короткоживущим изотопом). Данные исследования показали, что восстановление в клетках можно рассматривать как специальный случай схемы массового обслуживания. Исходя из полученных математических моделей предложено описание восстановления лучевых повреждений в клетках, базирующееся на следующих положениях:

- восстановление осуществляется отдельными каналами (свойство дискретности);
- каждый канал может восстанавливать только одно повреждение (ординарность);
- все каналы фактически одинаковые и работают однотипно (однородность);
- восстановление каждого повреждения происходит независимо от восстановления отдельных повреждений (независимость);

- некоторые повреждения, возникнув, оказываются устойчивыми и восстановлению не поддаются. В работе каналов восстановления возможны случайные отказы (вероятностный характер функционирования канала);

- невосстановленные повреждения вместе с устойчивыми повреждениями образуют необратимый компонент радиационного поражения.

Математическому моделированию динамики селективного размножения клонообразующей популяции аномальных клеток в культуре стволовых клеток человека посвящены работы М.С.Виноградовой (2011). Целью данных исследований было спрогнозировать динамику размножения в культуре аномальных злокачественных клеток, которые могут появляться *in vitro* в силу естественной изменчивости и обладать селективным преимуществом, что может привести к трансформации стволовых клеток из нормального состояния в злокачественную форму. Рассматривалась культура клеток, в которой различают нормальные и аномальные (анеуплоидные) клетки. При разработке математической модели были приняты следующие допущения: клеточная популяционная система является изолированной и имеет значительную численность; влияние фактора плотности посева клеток не учитывается; параметры математической модели считаются постоянными. При посеве все клетки считаются нормальными. В процессе размножения нормальная клетка может погибнуть, может выжить и не разделиться, может выжить, разделиться и остаться нормальной, может выжить, разделиться и стать аномальной. При дальнейшем развитии популяции аномальные клетки могут погибнуть, могут выжить и не разделиться, и могут разделиться, оставаясь при этом аномальными. Методами численного моделирования была исследована динамика клеточных популяций, установлены значения параметров модели, при которых реализуются различные сценарии: экспоненциального роста числа нормальных клеток, стабилизации численности популяций, подавления популяции нормальных клеток аномальными и др. Проведено сравнение с экспериментом, показавшее адекватность модели. Построенная при данных исследованиях математическая модель позволяет рассчитать числен-

ность нормальных и аномальных клеток, находящихся в момент времени t в k -м состоянии митоза.

Имитационному моделированию кинетики популяций нормальных и облученных клеток посвящены работы Зорина А.В. и соав. (1975, 1983). Предложенная в работе имитационная модель позволила осуществить воспроизведение и интерпретацию комплекса радиобиологических феноменов:

- колебаний выживаемости синхронизированных клеток при их облучении в различные моменты времени после синхронизации и увеличение размаха этих колебаний с ростом дозы облучения;

- репарации клеток от сублетальных радиационных повреждений;

- репарации клеток от потенциально летальных радиационных повреждений;

- репарации потенциально летальных повреждений в условиях фракционированного облучения культуры клеток в стационарной фазе роста;

- различий в выживаемости клеток в культуре при облучении в экспоненциальной и стационарной фазах роста.

Было установлено, что кривая, отражающая увеличение выживаемости клеток с ростом срока их пребывания в покоем состоянии после однократного облучения достигает плато по завершении репарации потенциально летальных повреждений. Дальнейший рост этой кривой обусловлен селекцией клеток, которая является следствием репродуктивной и интерфазной гибели части клеточной популяции. Вклад механизма селекции важно учитывать и при интерпретации опытов, направленных на исследование изменений выживаемости клеток при фракционировании дозы облучения. Количественная оценка этого вклада может быть осуществлена с помощью предложенной в работе имитационной модели.

Имитационные эксперименты, направленные на воспроизведение кривых выживаемости (кривых «доза-эффект») и кинетики репарации потенциально летальных повреждений при облучении культуры клеток LICH в экспоненциальной и стационарной фазах роста, позволили установить следующий факт:

покоящиеся клетки могут обладать одновременно как большей чувствительностью к радиационному воздействию, так и большей выраженностью пострадиационной репарации, чем активно пролиферирующие клетки.

1.1. Применение принципа «золотого сечения» в медико-биологических исследованиях

Последние десятилетия были отмечены всплеском интереса к применению закона «золотого сечения» (ЗС) в математическом моделировании в медицине и биологии. В медико-биологических исследованиях 70-90-х гг. показано, что в природе всюду проявляет себя «золотая пропорция» как характеристика соразмерности и гармоничности живых систем. «Золотое сечение», числа Фибоначчи и пентагональная симметрия являются бесспорным элементом роста живых существ. В публикациях указывается, что организм человека имеет множество подсистем, открытых и относительно замкнутых, подведение «порции» внешней энергии к которым может выборочно возбуждать ее определенные структуры. Этот основной принцип резонанса реализован природой в работе нашего организма – своеобразной нелинейной (фрактальной) конструкции, богатой «золотыми пропорциями».

Проблемы «золотого сечения» в медицине нашли отражение в разнообразных публикациях. «Золотое сечение» обнаружено при исследовании сердечно-сосудистой системы (В.Д. Цветков, Н.В. Дмитриева, А.М. Жирков, А.Г. Суббота), в системе крови (К.С. Симонян, В.Н. Кидалов, А.Г. Суббота, С.В. Петухов), при анализе биоэлектрической активности больших полушарий головного мозга (А.А. Соколов, Я.А. Соколов). «Золотые пропорции» получены при изучении строения тела человека (С.В. Петухов, П.Ф. Шапоренко, Ю.И. Гуминский) и центральной нервной системы (Т.А. Свистун, А.Г. Суббота). Авторами всех этих публикаций утверждается, что соответствие соразмерности «золотого сечения» характеризует идеальную норму, к которой стремится функциональная система при обеспечении гомеостаза. В связи с этим принципы «золотого сечения» очень

важны в области патологии, так как позволяют оценить функциональные сдвиги при диагностике и терапии заболевания. Кроме того, принцип ЗС может быть связан с проблемой «отхода» от принципа симметрии мозга и некоторых органов. В ряде публикаций был поставлен вопрос, нельзя ли понять проблему односторонне расположенных главных органов (сердце, печень) с позиций закона «золотого сечения».

Гармонические отношения в системе крови были описаны во многих работах. Э.М. Сороко (1984) показал, что форменные элементы крови сбалансированы по объему в пропорции, близкой к «золотой». К.С. Симоняном (1971) было установлено, что объем циркулирующей крови и плазменный объем находятся в отношении 5:3, а плазменный объем относится к глобулярному объему как 3:2. Это же отношение получается для альбуминов и глобулинов. Все указанные отношения близки к числу Фибоначчи. Гармонический анализ эритрона был проведен В.Н. Кидаловым (1989, 1994). Нормальный зрелый эритроцит – это симметричный двояковогнутый диск, заполненный гемоглобином. Диаметр этого диска у млекопитающих группируется возле величин 3-5-8 мкм, то есть чисел Фибоначчи. Толщина диска в центральной вогнутой части может изменяться в пределах от 40 до 60 % толщины тора. Диапазон этих колебаний близок к «золотой» пропорции. Гармонические размеры эритроцита также совпадают с числами Фибоначчи. Было рассмотрено более 40 конфигураций трансформированных эритроцитов и показано, что распределение эритроцитов по их конфигурациям в норме соответствует «золотой» пропорции. Установлено, что у человека и четырех видов лабораторных животных количество дискоцитов в крови близко к «золотому» числу 61,8 %, на остальные трансформированные эритроциты приходится 38,2 % (второе «золотое» число). При этом процентное распределение трансформированных эритроцитов также соответствует ряду Фибоначчи. Кроме того, в приведенных выше работах был вычислен ряд вурфов, характеризующих гармонические отношения в системе крови. Их значения сравнивались с величиной «золотого» вурфа $W = \Phi^2/2 = 1,309$, который был впервые введен С.В. Петуховым (1981). В целом «сверхподвижная» кровь в течение всей

жизни обеспечивает общую двигательную (локомоторную) активность организма, которая по данным А.Г. Субботы основана на «золотых» пропорциях двигательных актов. Замечено, например, что лишь при оптимальном кровоснабжении мышечное волокно имеет временное соотношение фазы расслабления и сокращения, близкое к «золотой» пропорции (Хадарцев А.А., 2006; Субботина Т.И., Яшин А.А., 2007).

Большую роль играет принцип «золотого сечения» в физиологии состояния сердечно-сосудистой системы. Анализ электрокардиограммы показывает, что при частоте сердечных сокращений в 1 Гц продолжительность электрической систолы и диастолы с точностью до второго знака после запятой совпадает с «золотыми» числами 0,382 и 0,618. При анализе зависимости электрической систолы и диастолы между собой, а также их зависимости от «золотого сечения», был установлен общий закон связи электрической и механической систол у животных при различной частоте сердечных сокращений и параметров «золотого сечения», на основании чего выделил так называемые «зоны оптимума» (пределы отклонения исследуемых параметров от идеальных составляют 5-6 %). В.Д. Цветков (1997) установил, что у человека и других млекопитающих имеется оптимальная («золотая») частота сердцебиения, при которой длительности систолы, диастолы и полного сердечного цикла соотносятся между собой в пропорции 0,382:0,618:1, то есть в полном соответствии с «золотой» пропорцией.

Н.В. Дмитриевой (1989) была построена геометрическая модель ЭКГ здоровых и больных гипертонической болезнью людей, которая позволила проанализировать с позиций «золотого сечения» не только длительность интервалов, но и амплитуду зубцов ЭКГ. На основании данной модели можно сделать вывод, что у здоровых людей длительности систолы, диастолы и всего кардиоцикла относятся как 0,388:0,612:1, а продолжительности систолы предсердий, желудочков и общей систолы относятся как 0,4:0,6:1. Таким образом, в двух рассмотренных случаях была получена «золотая» пропорция, отклонение от которой составило не более 5 %.

В 1998 г. В.В. Шкариным было исследовано клиническое соотношение величин *систолического* (САД) и *диастолического* (ДАД) *артериального давления*. Этому соотношению присвоен термин «*структурная точка АД*» (СТАД). К настоящему времени известно, что СТАД приближается к «золотому числу» – 0,618. Большие отличия от пропорции ЗС характерны для нестабильных состояний: пограничной *артериальной гипертензии* (АГ), тяжелых форм АГ, возможно кризовых форм АГ. В состоянии относительного покоя, т.е. ночью, отношение ДАД/САД ближе к пропорции ЗС (0,618), нежели днем, когда на АД действует гораздо больше возмущающих факторов. П.П. Черныш (2000) установил, что отношения величины САД к ДАД, САД к *частоте сердечных сокращений* (ЧСС), пульсового АД к ДАД также относятся друг к другу в «золотой» пропорции. При анализе фонокардиограммы также получается интервальная последовательность, близкая к «золотой» пропорции. В качестве примера приводится ФКГ из «Атласа практической фонокардиографии» Ю.М. Бала (1979), согласно которой «у здорового человека между I и II тонами имеется интервал около 10 мм, а между II и I – около 16 мм, то есть соответствует числу Ф».

А.Г. Суббота в работе (1996) обращает внимание на действие закона «золотого сечения» в системе дыхания. На основании спирограммы человека он показывает, что отношение длительности фазы выдоха и фазы вдоха близко к «золотой» пропорции.

Наличие «золотого сечения» в некоторых показателях электрических колебаний мозга было впервые отмечено А.А. и Я.А. Соколовыми (1976). Эмоциональному возбуждению мозга соответствует гамма-ритм с граничными частотами 35-55 Гц, умственной работе отвечает бета-ритм с граничными частотами 14-35 Гц, при появлении неприятности или опасности в мозге доминирует тета-ритм с частотой 4-7 Гц, что в среднем соответствует 5 Гц. Для состояния спокойного бодрствования характерен альфа-ритм с частотами колебаний от 8 до 13 Гц, а наиболее медленные колебания с частотой 1,5-4 Гц (дельта-ритм) характерны для состояния сна. Таким образом, граничные частоты ритмов почти точно отвечают числам Фибоначчи. Отклонения граничных частот от чисел Фибоначчи находятся в пределах

точности эксперимента. Наличие «золотого сечения» в функциональной организации высших отделов головного мозга человека подтверждается не только психофизиологическими методами, но и объективной регистрацией колебаний ЦНС.

1.2. Правило «золотого сечения», как показатель равновесного состояния в условиях необратимого патологического процесса

Следует отметить ряд исследований, проведенных на кафедре медико-биологических дисциплин лечебного факультета Тульского государственного университета (Куротченко Л.В., Савин Е.И., Субботина Т.И., 2008; Исаева Н.М., 2010; Иванов В.Б., 2010). Данные работы посвящены проблеме использования правила «золотого сечения» в качестве способа интерпретации полученных результатов с медико-биологической точки зрения. Согласно исследованиям, проведенным в лаборатории указанной кафедры, приложение правила «золотого сечения» к задачам обработки результатов в экспериментальной электромагнитобиологии, оказалось чрезвычайно эффективным. В публикациях приводятся результаты научных работ, целью которых являлось изучение соблюдения равновесного состояния в условиях развития необратимого патологического процесса при сочетании воздействия ЭМИ КВЧ и нефротоксического антибиотика гентамицина. Данное исследование проводилось на четырех группах лабораторных животных. Крысам первой группы вводили внутримышечно гентамицин, а также подвергали их воздействию КВЧ-излучения. Крысы второй группы подвергались только воздействию ЭМИ КВЧ, а третьей – только введению гентамицина. Четвертая группа животных – контрольная. С использованием правила «золотого сечения» проводилось сравнение соотношения между площадью полости, площадью ядер и площадью нормальной цитоплазмы тканей почек крыс всех исследуемых групп. Исследование позволило установить, что к «золотому сечению» приближается большинство отношений между морфометрическими и функциональными показателями в контрольной группе и в группе крыс, подверженных сочетанно-

му воздействию ЭМИ КВЧ и гентамицина, из чего следует, что «золотое сечение» типично не только для показателей нормы, но и для показателей, отражающих формирование равновесного состояния в условиях сформировавшегося необратимого патологического процесса.

Целью нашего исследования было изучение соблюдения правила «золотого сечения» как критерия гармоничного состояния в биологических системах при помощи оценки тяжести морфологических изменений в тканях почек лабораторных мышей, подверженных воздействию магнитных полей различных режимов. Результаты проведенного исследования подтверждают предположение о том, что закон «золотого сечения» соблюдается не только в условиях нормы, но и при формировании тяжелых патологических процессов. Данное явление связано с тем, что биологическая субстанция максимально стремится к состоянию равновесия в условиях сформировавшегося необратимого патологического процесса и характеризуется минимальной свободной энергией и, как следствие, высоким уровнем энтропии, соответственно такая равновесная, но патологическая система будет подчиняться правилу «золотого сечения», либо стремиться к нему. Напротив, в условиях развивающегося патологического процесса, сопровождающегося высокой активностью реакций компенсации, формируется неравновесная система с высоким уровнем свободной энергии и относительно низкой энтропией по сравнению как со стабильной системой в условиях нормы, так и с системой, подверженной необратимым патологическим изменениям (Исаева Н.М., 2009).

В публикациях приводятся данные исследований по сравнению биохимических и иммунологических показателей крови в норме и при патологии печени для контрольной группы и для пяти групп больных (больные с хроническим активным гепатитом вирусной этиологии, больные с хроническим персистирующим гепатитом вирусной этиологии, больные с циррозом печени вирусной этиологии, больные желчнокаменной болезнью и микросфероцитарной гемолитической анемией и больные с алкогольными поражениями печени в форме хронического персистирующего гепатита и жировой дистрофии). Вначале у всех иссле-

двух пациентов сравнивались основные биохимические показатели, отражающие развитие гепатоцеллюлярной недостаточности: общий белок, альбумины, глобулины. Также рассматривались показатели, характеризующие уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови. Анализ соотношения данных показателей позволил сделать вывод о том, что правило «золотого сечения» соблюдается только в контрольной группе, следовательно, правило «золотого сечения» в данном случае связано с идеальной нормой в организме, всякие же отклонения от этой нормы приводят к нарушению этого правила. Далее была поставлена цель установить для каждой группы пациентов, находится ли система биохимических и иммунологических показателей в устойчивом равновесном состоянии. Для этого вычислялась относительная информационная энтропия для маркеров воспалительного синдрома, а также синдромов холестаза и цитолиза. Значения, полученные в контрольной группе, сравнивались с соответствующими значениями, вычисленными для пяти указанных выше групп пациентов с заболеваниями печени, при этом учитывалось соответствие значения относительной энтропии не только «золотому сечению», но и «обобщенным золотым сечениям». Анализ относительной энтропии, полученной для маркеров воспалительного синдрома, а также для синдромов холестаза и цитолиза позволил подтвердить полученный в предыдущих исследованиях вывод о стремлении биологической субстанции к состоянию равновесия не только в норме, но и в условиях сформировавшегося необратимого патологического процесса (Иванов В.Б., 2010).

Анализ литогенных свойств желчи и исследование вурфов, характеризующих кристаллы и собственно структуру желчных камней, для тех же пяти групп пациентов (больные с хроническим активным гепатитом вирусной этиологии, больные с хроническим персистирующим гепатитом вирусной этиологии, больные с циррозом печени вирусной этиологии, больные желчно-каменной болезнью и микросфероцитарной гемолитической анемией и больные с алкогольными поражениями печени в форме хронического персистирующего гепатита и жировой дистрофии) показал, что правилом «золотого сечения» можно адекватно описать зависимости между литогенными свойствами желчи и тяже-

стью морфологических изменений в печени. Было установлено, что «золотая» пропорция имеет место как при анализе состава желчи в норме, так и при анализе характеристик литогенных свойств желчи.

Исходя из данных отечественной и зарубежной литературы можно заключить, что методы математической биологии и биоинформатики широко применяются в медицине, однако сведения о применении этих методов для исследования процессов СРО и системы РАСК в организме с гипоплазией ККМ, вызванной введением цитостатиков, отсутствуют. Нами предпринято подробное изучение процессов СРО и системы РАСК в условиях введения в организм фторурацила, в том числе при последующем изолированном и сочетанном в различных комбинациях воздействии модулирующих факторов – стволовых клеток, фитомеланина и ЭМИ КВЧ, путем сравнения силы биологических эффектов данных факторов, корреляционного и регрессионного анализа между базовыми лабораторными показателями, построения и решения дифференциальных уравнений, а также при помощи исследования распространения законов «золотого сечения» и «золотого вурфа» при анализе показателей.

ГЛАВА III

ГИПОПЛАЗИЯ КРАСНОГО МОЗГА И ВНЕШНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

(экспериментальные исследования)

1. Материалы и методы исследования

При выполнении исследования была составлена программа, сформулированы ее цели, задачи, определены объект, объем и методы исследования.

Экспериментальные исследования выполнены на беспородных крысах обоих полов в возрасте от 3 до 6 месяцев. Выбор указанных животных обусловлен тем, что на крысах хорошо моделируется изучаемая патология и они не требуют особых условий содержания. Моделирование у животных экспериментальной гипоплазии ККМ проводилось путем внутривенного введения им фторурацила 0,1 мл.

Для решения поставленных задач и достижения цели работы все животные были разделены на следующие экспериментальные группы:

– первая группа животных, контрольная, – это крысы, содержащиеся в стандартных условиях вивария (Мурашев А.Н., 2009).

– животным второй группы внутривенно вводили фторурацил 0,1 мл.

– животным третьей группы внутривенно вводили фторурацил 0,1 мл, после чего вводили аллогенные мезенхимальные СК, полученные из подкожного жира. СК для проведения экспериментов были предоставлены ГУП «НИИ Новых медицинских технологий», г. Москва.

– четвертая группа животных одновременно с внутривенным введением цитостатика фторурацила 0,1 мл подвергалась воздействию электромагнитных полей миллиметрового диапазона частотой 37 ГГц, мощностью 0,3 мВт/см². Продолжительность однократного облучения составила 30 минут, суммарное время воздействия составило 180 минут.

– животным пятой группы внутривенно вводили фторурацил 0,1 мл, аллогенные МСК, полученные из подкожного жира, кроме того, их подвергали воздействию электромагнитных полей миллиметрового диапазона частотой 37 ГГц, мощностью 0,3 мВт/см². Продолжительность однократного облучения составила 30 минут, суммарное время воздействия составило 180 минут.

– животным шестой группы внутривенно вводили фторурацил 0,1 мл, после чего подкожно вводили фитомеланин 1,0 мл.

– седьмая группа животных подвергалась внутривенному введению фторурацила 0,1 мл, подкожному введению фитомеланина 1,0 мл, а также воздействию ЭМИ КВЧ частотой 37 ГГц, мощностью 0,3 мВт/см². Продолжительность однократного облучения составила 30 минут, суммарное время воздействия составило 180 минут.

– восьмая группа животных подвергалась внутривенному введению фторурацила 0,1 мл, подкожному введению фитомеланина 1,0 мл и введению аллогенных МСК, полученных из подкожного жира.

– девятая группа животных подвергалась внутривенному введению фторурацила 0,1 мл, подкожному введению фитомеланина 1,0 мл, введению аллогенных МСК, полученных из подкожного жира, и воздействию электромагнитных полей миллиметрового диапазона частотой 37 ГГц, мощностью 0,3 мВт/см². Продолжительность однократного облучения составила 30 минут, суммарное время воздействия составило 180 минут.

На седьмые сутки по окончании каждой серии экспериментов у всех животных после их усыпления посредством эфира производилось взятие для проведения исследований гистологического материала: красного костного мозга, селезенки и печени, а также крови. Гистологический материал фиксировали в 10 %-ном растворе формалина с последующим приготовлением и окраской гематоксилином и эозином по стандартной методике. Печень использована в морфологическом исследовании как орган, участвующий в эмбриональном гемопоэзе, и как орган, относящийся к ретикуло-эндотелиальной системе. Морфологическая оценка гистологического материала выполнялась на микроскопе Nikon Eslip SE-400 при максимальном увеличении 6х600.

В крови животных по стандартным методикам исследовались показатели, отражающие состояние гуморальных факторов гемостаза и состояние свободно-радикальных процессов (Меньшиков В.В., 2002). Состояние гуморальных факторов гемостаза оценивалось по следующим показателям: время свертывания крови, время рекальцификации, концентрация фибриногена и растворимого фибрина, продукты деградации фибрина, концентрация гепарина, активность антитромбина III, активность плазмина. Уровень свободно-радикальных процессов оценивался на основании активности оксидантов и антиоксидантной защиты. В качестве исследуемых показателей определяли уровень гидроперекисей липидов, концентрацию малонового диальдегида, антиокислительную активность плазмы, активность каталазы и супероксиддисмутазы.

2. Обоснование проведенных экспериментальных исследований

В качестве исследуемого патологического процесса выбрана экспериментальная гипоплазия красного мозга, достигаемая путем внутривенного введения животному цитостатика фторурацила. Изучение данной проблемы является актуальной темой, так как фторурацил показан к применению у большого числа пациентов с злокачественными опухолями молочной железы, желудка, поджелудочной железы, прямой кишки и других отделов толстого кишечника. При этом у пациентов, принимающих цитостатики, одним из частых побочных эффектов является угнетение всех ростков кроветворения в красном костном мозге (Карева Н.П., 2008). Также при употреблении цитостатиков происходит поражение иммунной системы, что часто приводит к развитию вторичных иммунодефицитов (Маркова Т.П., 2011). Неблагоприятно влияет данная группа препаратов и на процессы свободно-радикального окисления. Под действием цитостатиков наблюдается истощение внутриклеточных запасов восстановленного глутатиона с последующим повреждением всей системы антиоксидантной защиты, что ведет к интенсификации перекисного окисления липидов. Воздействие цитостатиков на систему регуляции агрегатного состояния крови также выража-

ется неблагоприятными побочными эффектами. В экспериментах на лабораторных животных было показано, что при введении фторурацила в организме вначале наблюдается гиперкоагуляция, происходит активация коагулянтов на фоне снижения активности гепарин-антитромбиновой и плазминоген-плазминовой систем, однако указанные изменения формировались на фоне тромбоцитопении и быстро приводили к развитию коагулопатии потребления.

В качестве модулирующих факторов, оказывающих восстановительные эффекты на вышеописанные побочные эффекты фторурацила, были взяты СК, электромагнитное излучение крайне высокочастотного диапазона и фитомеланин, известный в медицине своими антиоксидантными свойствами.

СК уже давно применяются для лечения различных заболеваний пищеварительной, эндокринной, дыхательной, мочевыделительной, сердечно-сосудистой, иммунной систем, ЦНС, кожных покровов, органов чувств, так как они оказывают мощное модулирующее воздействие на восстановление клеток при самых различных видах их повреждения. В работе Е.Д.Гольдберга с соавт. (2006) показана роль СК в восстановлении кроветворения при цитостатических и лучевых миелосупрессиях. Анализ многочисленных источников отечественной и зарубежной литературы, описывающих действие на организм ЭМИ КВЧ, позволяет сделать вывод о том, что ЭМИ КВЧ обладает мощным модулирующим эффектом как на саногенные реакции, так и на возникновение и развитие патологии в различных органах и системах, причем характер и сила эффекта зависят от множества факторов, таких как выбранный режим облучения, участие в облучении других организмов (параллельное облучение), характер самого патологического процесса, происходящего в организме (либо полного отсутствия патологического процесса) и т.д. Например, проведенные исследования по влиянию ЭМИ КВЧ на систему РАСК и процессы СРО показывают, что при воздействии ЭМИ КВЧ на здоровый организм происходит усиление активности коагулянтов и оксидантов и снижение активности антикоагулянтов и антиоксидантов, что приводит к развитию гиперкоагуляции и интенсификации ПОЛ (Хасая Д.А. и соавт., 2009). При воздействии ЭМИ КВЧ на пациентов со стенокардией, напротив, происходят усиление активности антикоагу-

лянтов, что приводит к снижению уровня свертываемости крови, а в работах Чуян Е.Н. и соавторов (2006-2008) указывается на увеличение активности антиоксидантной системы организма. В работе Каревой Н.П. (2006) с соавторами описано модулирующее влияние ЭМИ КВЧ на восстановление кроветворения, нарушение которого вызвано применением цитостатиков. Вместе с тем остаются не исследованными характер и сила воздействия ЭМИ КВЧ на изменение показателей СРО и системы РАСК в организме, подверженном введению цитостатиков.

Сочетанное воздействие двух модулирующих факторов – СК и ЭМИ КВЧ – в настоящее время является малоизученным. В работе Иванова Д.В. с соавт. (2006) описывается теоретическая возможность управления дифференцировкой СК воздействием ЭМИ КВЧ. Приводятся результаты исследований, согласно которым ЭМИ КВЧ может оказывать модулирующее воздействие на пролиферацию стволовых клеток нативного и криоконсервированного костного мозга (Игнашева Л.П., 1991). Вместе с тем изучение сочетанного, в различных комбинациях, воздействия СК, ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм, подверженный введению цитостатиков, до настоящего времени не проводилось.

Поэтому нами впервые проведено подробное изучение и сравнение модулирующих эффектов на восстановление показателей СРО и системы РАСК изолированного, так и сочетанного в разных комбинациях воздействия стволовых клеток, ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ, моделируемой путем введения фторурацила, исходя из соблюдения законов «золотого сечения» и «золотого вурфа»

Проведен сравнительный анализ формирования гармоничных состояний при необратимом патологическом процессе в системе кроветворения при сочетании различных факторов, обладающих модулирующим эффектом.

В связи с тем, что цитостатики широко применяются в медицине, но имеют огромное количество побочных эффектов, были изучены пути снижения их количества путем применения факторов, которые могут обладать саногенными свойствами, а также при помощи их сочетанного применения. Даны рекомендации по использованию данных факторов для коррекции уров-

ня показателей СРО и системы РАСК в организме, подверженном введению цитостатиков. Построенный математический аппарат послужит надежной доказательной базой для объяснения результатов проведенных экспериментов.

3. Изучение активности процессов СРО и системы РАСК в условиях экспериментальной гипоплазии ККМ

На седьмые сутки после начала эксперимента у всех животных второй группы (животные, подверженные введению фторурацила) в тканях ККМ выявлены признаки гипоплазии, характеризующиеся уменьшением количества переходных форм (I-III классов) клеток всех ростков ККМ. Гистологическая картина характеризуется мономорфностью клеточного состава, отсутствием четкой метафазной активности низкодифференцированных клеток, практически отсутствуют переходные клетки миелоидного ростка (рис. 1). Для сравнения приводится микрофотография ткани красного костного мозга животных первой (контрольной) группы (рис. 2).

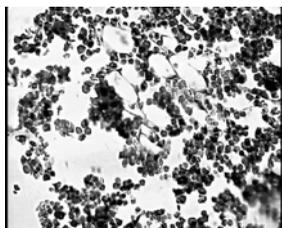


Рис. 1. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс второй группы, х230

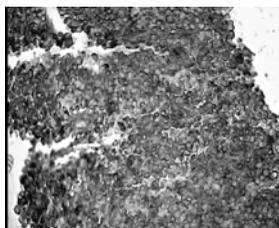


Рис. 2. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс первой (контрольной) группы, х230

В других исследуемых тканях (печень, селезенка) также выявлены морфологические изменения, свидетельствующие о поражении их цитостатиками. В ткани селезенки наблюдается гипоплазия лимфоидных фолликулов и уменьшение их количества, резко снижено количество селезеночных макрофагов (рис. 3).

В ткани печени наблюдается уменьшение количества купферовских клеток, синусоиды и центральные вены расширены. В просвете синусоидов формируется слайдж-феномен, в просвете центральных вен – микротромбы. Отсутствует инфильтрация портальных полей макрофагами и лимфоцитами. Митотическая активность гепатоцитов во всех зонах классических печеночных долек низкая, двухъядерные гепатоциты отсутствуют (рис. 4).

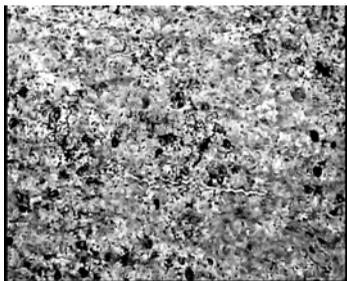


Рис. 3. Микроскопическая картина селезенки крыс второй группы, x230

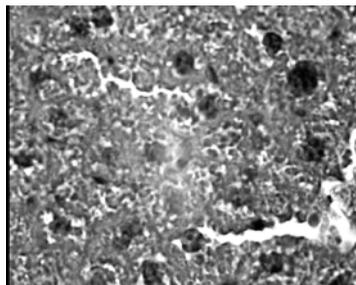


Рис. 4. Микроскопическая картина печени крыс второй группы, x115



Рис. 5. Микроскопическая картина селезенки крыс контрольной группы, x460

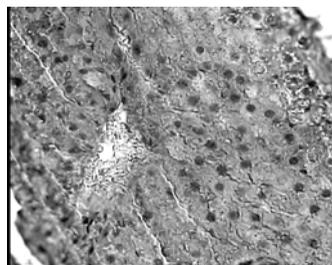


Рис. 6. Микроскопическая картина печени крыс контрольной группы, x230

Для сравнения приведены микрофотографии селезенки и печени животных первой (контрольной) группы (рис. 5-6).

Изучение активности свободно-радикальных процессов позволило установить, что у животных второй группы по сравнению с первой (контрольной) произошло значительное увеличе-

ние концентрации гидроперекисей липидов (с $1,17 \pm 0,05$ до $3,03 \pm 0,17$ ОЕ/мл) и малонового диальдегида (с $0,81 \pm 0,03$ до $2,03 \pm 0,15$ мкмоль/л). Эти результаты свидетельствуют о том, что после введения цитостатика происходит активация оксидантных систем организма.

В то же время по сравнению с первой группой у животных второй группы снизились общая антиокислительная активность плазмы (с $25,48 \pm 0,40$ до $17,15 \pm 0,81$ %), активность каталазы (с $12,65 \pm 0,38$ до $6,40 \pm 0,29$ мкат/л), активность супероксиддисмутазы (с $2,04 \pm 0,17$ до $1,57 \pm 0,19$ ОЕ/1 мг белка эритроц.) Данные результаты свидетельствуют о снижении активности антиоксидантных систем при введении в организм цитостатика.

Сравнение показателей, отражающих активность свертывающей и противосвертывающей систем крови животных первой и второй групп, позволило установить, что у крыс, подвергшихся введению фторурацила, по сравнению с контрольными крысами произошло снижение времени свертывания крови (с $120,75 \pm 2,17$ до $62,25 \pm 6,66$ с.) и времени рекальцификации плазмы (с $42,75 \pm 2,17$ до $31,25 \pm 3,43$ с.). Концентрация фибриногена снизилась с $10,50 \pm 0,40$ до $7,60 \pm 0,45$ мкмоль/л, а концентрация фибрина возросла с $0,25 \pm 0,04$ до $0,53 \pm 0,06$ мкмоль/л. Концентрация *продуктов деградации фибрина* (ПДФ) возросла с $43,80 \pm 0,46$ до $87,05 \pm 2,51$ нмоль/л. Концентрация гепарина снизилась с $0,54 \pm 0,04$ до $0,24 \pm 0,03$ Е/л, а активность антитромбина III – с $91,95 \pm 0,93$ до $76,25 \pm 2,62$ %. Активность плазмينا снизилась с $9,80 \pm 0,49$ до $5,33 \pm 0,99$ мм². Концентрация α_2 -макроглобулина возросла с $3,93 \pm 0,22$ до $5,48 \pm 0,40$ мкмоль/л, а концентрация α_1 -антитрипсина – с $39,20 \pm 0,56$ до $55,98 \pm 2,05$ мкмоль/л.

Таким образом, у животных второй группы относительно первой (контрольной) наблюдается тенденция к гиперкоагуляции. Снижение концентрации фибриногена и увеличение концентрации фибрина свидетельствует о повышении скорости третьей фазы коагуляционного гемостаза (переход фибриногена в фибрин). Увеличение концентрации продуктов деградации фибрина говорит об усилении активности системы фибринолиза, то есть о повышенном взаимодействии плазмина с фибриногеном и фибрином. Уменьшение концентрации гепарина, активности антитромбина III и плазмина свидетельствует о снижении активно-

сти гепарин-антитромбиновой и плазминоген-плазминовой систем. Под действием фторурацила, введенного внутривенно, у животных второй группы была смоделирована экспериментальная гипоплазия красного костного мозга, сопровождающаяся также морфологическими изменениями в тканях печени и селезенки, свидетельствующими о поражении этих органов цитостатиками, активацией процессов СРО, значительной тенденцией к гиперкоагуляции.

4. Модулирование процессов в системах СРО и РАСК сочетанным воздействием электромагнитного излучения, стволовых клеток и фитомеланина

У животных третьей экспериментальной группы, которым после введения цитостатика вводились СК, на фоне блокады иммунной системы в морфологических препаратах регистрировалась тенденция к усилению пролиферативной активности клеток. В красном костном мозге наблюдается увеличение плюрипотентных клеток и появление переходных клеток, но обращает на себя внимание наличие единичных миелобластов с гипертрофированными палочковидными ядрами, что указывает на нарушение процессов дифференцировки (рис. 9).

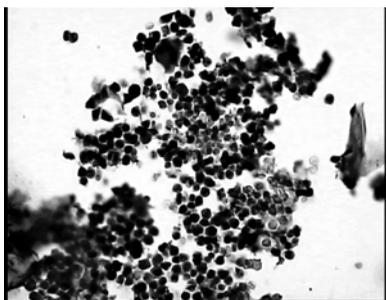


Рис. 9. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс третьей группы, x230

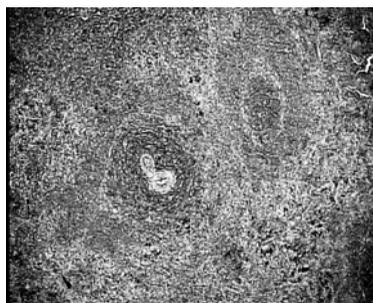


Рис. 10. Микроскопическая картина селезенки крыс третьей группы, x460

В ткани селезенки выявлено увеличение количества и размеров лимфоидных фолликулов, наблюдаются единичные селезеночные макрофаги, что может свидетельствовать о нарушении дифференцировки моноцитов (рис. 10).

Морфологическая картина ткани печени существенно не отличалась от таковой, полученной у животных второй экспериментальной группы, которым не вводились СК. Инфильтрация портальных полей не выражена, в синусоидах появляются единичные купферовские клетки. Сохраняются морфологические признаки нарушения микроциркуляции: стаз и слайдж в синусоидах, сочетающиеся с тромбообразованием в центральных венах. К отличительным морфологическим особенностям следует отнести более выраженную митотическую активность в гепатоцитах перипортальной зоны и незначительное увеличение количества синусоидальных клеток (рис. 11).

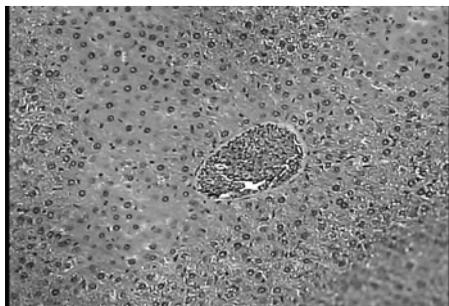


Рис. 11. Микроскопическая картина печени крыс третьей группы, x115

Таким образом, введение СК оказало модулирующий эффект на восстановление клеточного субстрата в КKM и в селезенке, значительно в меньшей мере – в печени. Однако в морфологических препаратах КKM и селезенки наблюдаются признаки нарушения дифференцировки клеток, в печени уровень пролиферации и дифференцировки клеток остается существенно низким, сохраняются нарушения микроциркуляции.

При исследовании уровня активности СРО в третьей группе экспериментальных животных были получены следующие ре-

зультаты. Концентрация гидроперекисей липидов составила $(2,26 \pm 0,12)$ ОЕ/мл, малонового диальдегида – $(1,33 \pm 0,06)$ мкмоль/л, антиокислительная активность плазмы – $(20,05 \pm 0,59)$ %, активность каталазы – $(9,95 \pm 0,36)$ мкат/л, активность супероксиддисмутазы – $(1,80 \pm 0,03)$ ОЕ/1 мг белка эритроц.

При сравнении активности СРО животных третьей группы с животными первой и второй групп видно, что концентрации гидроперекисей липидов и малонового диальдегида у животных третьей группы снизились по сравнению с таковыми во второй группе, но значительно превышают показатели первой (контрольной) группы. Антиокислительная активность плазмы, а также активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и супероксиддисмутазы по сравнению с показателями животных второй группы повысились, однако остаются значительно ниже показателей первой (контрольной) группы.

Таким образом, СК обладают модулирующим эффектом на усиление антиоксидантной защиты организма с экспериментальной гипоплазией ККМ, при их введении происходит торможение активности СРО. Данный эффект, вероятно, связан с частичным восстановлением клеточного субстрата (рис. 9-11). Однако полного восстановления уровня СРО при введении СК не произошло.

Изучение уровня активности коагулянтов и антикоагулянтов у животных третьей группы дало следующие результаты. Среднее время свертывания крови составило $(83,00 \pm 2,53)$ с, время рекальцификации плазмы – $(35,25 \pm 1,23)$ с, концентрация фибриногена – $(8,25 \pm 0,19)$ мкмоль/л, концентрация фибрина – $(0,42 \pm 0,02)$ мкмоль/л, концентрация ПДФ – $(79,48 \pm 2,55)$ нмоль/л, концентрация гепарина – $(0,33 \pm 0,03)$ Е/л, активность антитромбина III – $(79,43 \pm 2,86)$ %, активность плазмина – $(6,43 \pm 0,40)$ мм², концентрация α_2 -макроглобулина – $(4,95 \pm 0,13)$ мкмоль/л, концентрация α_1 -антитрипсина – $(47,13 \pm 1,05)$ мкмоль/л.

При сравнении показателей свертывающей и противосвертывающей систем животных третьей группы с животными первой и второй групп отмечаются следующие закономерности. Время свертывания крови и время рекальцификации плазмы у крыс третьей группы повысились относительно данных показателей у крыс второй группы, но остаются значительно ниже, чем показатели в первой (контрольной) группе, следовательно, вве-

дение СК в организм, пораженный цитостатиками, приводит к некоторому снижению гиперкоагуляции. Концентрация фибриногена выше, чем у животных второй группы, но ниже, чем у животных контрольной группы. Концентрация фибрина, напротив, снизилась относительно данного показателя во второй группе, но остается выше концентрации фибрина у животных первой группы. Таким образом, скорость третьей фазы коагуляционного гемостаза при введении стволовых клеток в организм, пораженный цитостатиками, несколько снижается. Концентрация ПДФ у животных третьей группы по сравнению с данным показателем во второй группе снизилась, но остается значительно выше контрольных значений, следовательно, активность фибринолиза при введении СК в организм, пораженный цитостатиками, снижается, хотя и остается значительно выше нормы. Концентрация гепарина, а также активность антитромбина III и плазмينا по сравнению с данными показателями у животных второй группы повысились, но остаются значительно ниже показателей первой группы, следовательно, введение СК в организм, пораженный цитостатиками, оказывает стимулирующий эффект на увеличение активности гепарин-антитромбиновой и пламиноген-плазминовой систем, хотя она по-прежнему остается значительно ниже контрольных значений.

Таким образом, СК обладают модулирующим эффектом на ослабление активности свертывающей и усиление активности противосвертывающей систем организма с экспериментальной гипоплазией КKM, что приводит к снижению гиперкоагуляции. Данный эффект, вероятно, также связан с частичным восстановлением клеточного субстрата. Однако полного восстановления системы PASC при введении СК не произошло.

Изолированное введение СК животным с экспериментальной гипоплазией КKM оказало модулирующий эффект на усиление пролиферативной активности клеток КKM и селезенки (значительно в меньшей мере – печени). В результате частичного восстановления клеточного субстрата усилилась активация антиоксидантной защиты организма и активация антикоагулянтных систем, что привело к снижению уровня процессов СРО и гиперкоагуляции. Однако в морфологических препаратах КKM и селезенки наблюдаются признаки нарушения дифферен-

цировки клеток, в печени уровень пролиферации и дифференцировки клеток остается существенно низким, сохраняются нарушения микроциркуляции, а показатели СРО и системы РАСК вследствие этого остаются далекими от контрольных значений.

У животных четвертой группы (с введенным цитостатиком, но подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ), в исследуемых тканях КKM, селезенки и печени наблюдались аналогичные полученным во второй группе морфологические изменения, свидетельствующие о поражении органов цитостатиками; в тканях КKM – уменьшение количества переходных форм клеток всех ростков, мономорфность клеточного состава, отсутствие четкой метафазной активности низкодифференцированных клеток (рис. 12); в тканях селезенки обнаружены гипоплазия лимфоидных фолликулов и уменьшение их количества, а также резкое снижение количества селезеночных макрофагов (рис. 13); в тканях печени наблюдаются уменьшение количества купферовских клеток, расширение синусоидов и центральных вен, сохраняются нарушения микроциркуляции, низкая митотическая активность гепатоцитов, отсутствие инфильтрации портальных полей макрофагами и лимфоцитами (рис. 14).

Таким образом, воздействие ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM не оказало модулирующего эффекта на восстановление клеточного субстрата в исследуемых тканях.

При исследовании уровня активности СРО в четвертой группе экспериментальных животных были получены следующие результаты. Концентрация гидроперекисей липидов составила $(2,47 \pm 0,07)$ ОЕ/мл, малонового диальдегида – $(1,63 \pm 0,06)$ мкмоль/л, антиокислительная активность плазмы – $(18,18 \pm 0,27)$ %, активность каталазы – $(8,73 \pm 0,26)$ мкат/л, активность супероксиддисмутазы – $(1,68 \pm 0,02)$ ОЕ/1 мг белка эритроц.

При сравнении активности СРО животных четвертой группы с животными первой и второй групп оказалось, что концентрации гидроперекисей липидов и малонового диальдегида у животных четвертой группы снизились по сравнению с таковыми во второй группе, но значительно превышают показатели первой (контрольной) группы. Антиокислительная активность плазмы, а также активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты – катала-

зы и супероксиддисмутазы по сравнению с показателями животных второй группы повысились, однако были значительно ниже показателей первой (контрольной) группы.

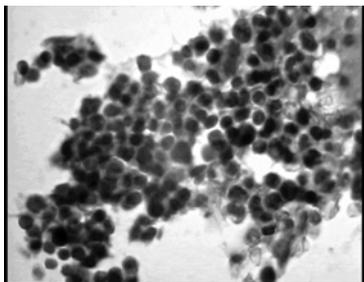


Рис. 12. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс четвертой группы, $\times 230$

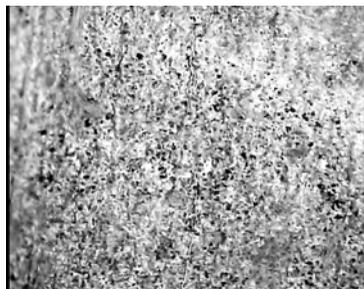


Рис. 13. Микроскопическая картина селезенки крыс четвертой группы, $\times 230$

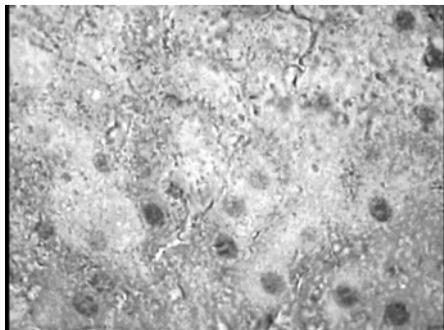


Рис. 14. Микроскопическая картина печени крыс четвертой группы, $\times 230$

Таким образом, ЭМИ КВЧ обладает модулирующим эффектом на усиление антиоксидантной защиты организма с экспериментальной гипоплазией ККМ; при воздействии данного облучения происходит торможение активности СРО. Данный эффект, вероятно, связан с модулирующим влиянием ЭМИ КВЧ на повышение активности каталазы и супероксиддисмутаза. Однако полного восстановления уровня СРО не произошло, так как в условиях необратимой утраты морфологического субстрата (рис. 12-14) по-

вышение активности каталазы и супероксиддисмутазы в поврежденных клеточных элементах является механизмом образования дополнительного источника свободных радикалов кислорода и, как следствие, неконтролируемого синтеза и распада перекиси водорода. При этом нельзя исключать из патогенеза высокую активность атомов железа с переменной валентностью, концентрация которого заметно повышается при распаде клеток красного костного мозга.

Изучение уровня активности коагулянтов и антикоагулянтов у животных четвертой группы дало следующие результаты. Среднее время свертывания крови составило $(80,50 \pm 3,62)$ с, время рекальцификации плазмы – $(35,50 \pm 1,70)$ с, концентрация фибриногена – $(8,25 \pm 0,13)$ мкмоль/л, концентрация фибрина – $(0,42 \pm 0,01)$ мкмоль/л, концентрация ПДФ – $(79,83 \pm 3,51)$ нмоль/л, концентрация гепарина – $(0,31 \pm 0,03)$ Е/л, активность антитромбина III – $(78,80 \pm 1,08)$ %, активность пламина – $(6,43 \pm 0,32)$ мм², концентрация α_2 -макроглобулина – $(5,03 \pm 0,24)$ мкмоль/л, концентрация α_1 -антитрипсина – $(47,95 \pm 1,81)$ мкмоль/л.

При сравнении показателей свертывающей и противосвертывающей систем животных четвертой группы с животными первой и второй групп отмечаются следующие закономерности. Время свертывания крови и время рекальцификации плазмы у крыс четвертой группы повысились относительно данных показателей у крыс второй группы, но остаются значительно ниже, чем показатели в первой (контрольной) группе, следовательно, при воздействии ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, происходит некоторое снижение гиперкоагуляции. Концентрация фибриногена выше, чем у животных второй группы, но ниже, чем у животных контрольной группы. Концентрация фибрина, напротив, снизилась относительно данного показателя во второй группе, но остается выше концентрации фибрина у животных первой группы. Таким образом, скорость третьей фазы коагуляционного гемостаза при воздействии ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, несколько снижается. Концентрация ПДФ у животных четвертой группы по сравнению с данным показателем во второй группе снизилась, но остается значительно выше контрольных значений, следовательно, активность фибринолиза при воздействии ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, снижается, хотя и оста-

ется значительно выше нормы. Концентрация гепарина, а также активность антитромбина III и плазмина по сравнению с данными показателями у животных второй группы повысились, но остаются значительно ниже показателей первой группы, следовательно, воздействие ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, оказывает стимулирующий эффект на увеличение активности гепарин-антитромбиновой и пламиноген-плазминовой систем, хотя она по-прежнему остается значительно ниже контрольных значений.

Таким образом, воздействие ЭМИ КВЧ обладает модулирующим эффектом на ослабление активности свертывающей и усиление активности противосвертывающей систем организма с экспериментальной гипоплазией КKM, что приводит к снижению гиперкоагуляции. Данный эффект, вероятно, связан с активацией по действием ЭМИ КВЧ гепарин-антитромбиновой и пламиноген-плазминовой систем организма. Однако полного восстановления системы PASC не произошло, что связано с практически полным отсутствием модулирующего эффекта ЭМИ КВЧ на восстановление клеточного субстрата в организме с экспериментальной гипоплазией КKM.

Изолированное воздействие ЭМИ КВЧ на организм животных с экспериментальной гипоплазией КKM не оказало модулирующего эффекта на усиление пролиферативной активности клеток КKM, селезенки и печени. Морфологическая картина тканей данных органов практически не отличается от таковой, полученной у животных второй группы. Активация под действием ЭМИ КВЧ ключевых ферментов антиоксидантной защиты организма и антикоагулянтов привела к снижению уровня процессов СРО и снижению гиперкоагуляции. Однако показатели СРО и системы PASC остаются далекими от контрольных значений вследствие отсутствия модулирующего влияния ЭМИ КВЧ на восстановление морфологического субстрата КKM, селезенки и печени в организме с экспериментальной гипоплазией КKM.

У животных шестой группы – которым после введения цитостатика вводили фитомеланин – морфологическая картина красного костного мозга характеризуется увеличением плюрипотентных клеток и усилением пролиферации колониеобразующих единиц по сравнению с таковой, полученной у животных второй

группы, но обращают на себя внимание признаки нарушения дифференцировки клеток (рис. 15). В ткани селезенки признаки гипоплазии существенно сохранены, но относительно животных второй группы обращает на себя внимание некоторое увеличение количества и размеров лимфоидных фолликулов (рис. 16). Морфологическая картина ткани печени в отличие от таковой, полученной у животных второй группы, отличается большей сохранностью гепатоцитов, однако признаки нарушения микроциркуляции те же, что и у крыс второй группы, не подверженных введению фитомеланина (рис. 17).

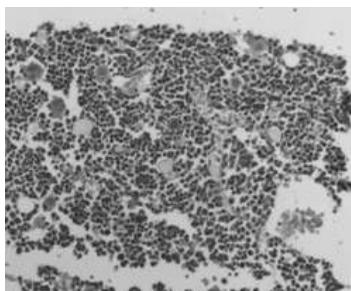


Рис. 15. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс шестой группы, x230

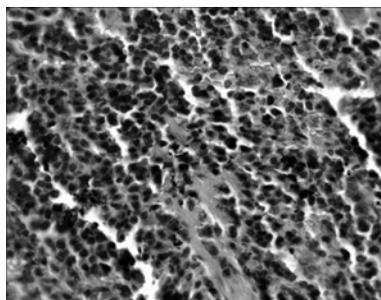


Рис. 16. Микроскопическая картина селезенки крыс шестой группы, x230

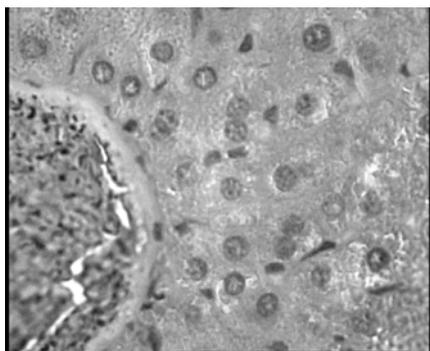


Рис. 17. Микроскопическая картина печени крыс шестой группы, x460

Таким образом, введение фитомеланина животным с экспериментальной гипоплазией ККМ является модулирующим фактором на восстановление клеточного субстрата ККМ, селезенки и печени. Однако данное восстановление является частичным, морфологическая картина по-прежнему далека от той, что была получена в первой (контрольной) группе.

При исследовании уровня активности СРО в четвертой группе экспериментальных животных были получены следующие результаты. Концентрация гидроперекисей липидов составила $(2,24 \pm 0,17)$ ОЕ/мл, малонового диальдегида – $(1,61 \pm 0,04)$ мкмоль/л, антиокислительная активность плазмы – $(19,10 \pm 0,18)$ %, активность каталазы – $(8,90 \pm 0,25)$ мкат/л, активность супероксиддисмутазы – $(1,69 \pm 0,03)$ ОЕ/ 1 мг белка эритроц.

При сравнении активности СРО животных шестой группы с животными первой и второй групп показано, что концентрации гидроперекисей липидов и малонового диальдегида у животных третьей группы снизились по сравнению с таковыми во второй группе, но значительно превышают показатели первой (контрольной) группы. Антиокислительная активность плазмы, а также активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и супероксиддисмутазы по сравнению с показателями животных второй группы повысились, однако остаются значительно ниже показателей первой (контрольной) группы.

Как и следовало ожидать из обзора литературы, фитомеланин оказал модулирующий эффект на усиление антиоксидантной защиты организма с экспериментальной гипоплазией ККМ, при его введении произошло торможение активности СРО. Таким образом, частичное восстановление морфологического субстрата (рис. 15-17) связано с антиоксидантными свойствами фитомеланина, предотвращающего свободно-радикальные процессы в клетках и стабилизирующего тем самым клеточные мембраны.

Изучение уровня активности коагулянтов и антикоагулянтов у животных шестой группы дало следующие результаты. Среднее время свертывания крови составило $(80,00 \pm 7,46)$ с, время рекальцификации плазмы – $(35,00 \pm 1,79)$ с, концентрация фибриногена – $(8,25 \pm 0,23)$ мкмоль/л, концентрация фибрина – $(0,43 \pm 0,03)$ мкмоль/л, концентрация ПДФ – $(82,08 \pm 1,92)$ нмоль/л, концентрация гепарина – $(0,30 \pm 0,03)$ Е/л, активность

антитромбина III – $(78,48 \pm 1,56)$ %, активность плазмينا – $(6,45 \pm 0,17)$ мм², концентрация α_2 -макроглобулина – $(5,05 \pm 0,20)$ мкмоль/л, концентрация α_1 -антитрипсина – $(48,50 \pm 1,68)$ мкмоль/л. При сравнении показателей свертывающей и противосвертывающей систем животных шестой группы с животными первой и второй групп отмечаются следующие закономерности. Время свертывания крови и время рекальцификации плазмы у крыс шестой группы повысились относительно данных показателей у крыс второй группы, но остаются значительно ниже, чем показатели в первой (контрольной) группе, следовательно, при введении фитомеланина в организм, пораженный цитостатиками, происходит некоторое снижение гиперкоагуляции. Концентрация фибриногена выше, чем у животных второй группы, но ниже, чем у животных контрольной группы. Концентрация фибрина, напротив, снизилась относительно данного показателя во второй группе, но остается выше концентрации фибрина у животных первой группы. Таким образом, скорость третьей фазы коагуляционного гемостаза при введении фитомеланина в организм, пораженный цитостатиками, несколько снижается. Концентрация ПДФ у животных шестой группы по сравнению с данным показателем во второй группе снизилась, но остается значительно выше контрольных значений, следовательно, активность фибринолиза при введении фитомеланина в организм, пораженный цитостатиками, снижается, хотя и остается значительно выше нормы. Концентрация гепарина, а также активность антитромбина III и плазмينا по сравнению с данными показателями у животных второй группы повысились, но остаются значительно ниже показателей первой группы, следовательно, введение фитомеланина в организм, пораженный цитостатиками, оказывает стимулирующий эффект на увеличение активности гепарин-антитромбиновой и плазминоген-плазминовой систем, хотя она по-прежнему остается значительно ниже контрольных значений.

Таким образом, введение фитомеланина обладает модулирующим эффектом на ослабление активности свертывающей и усиление активности противосвертывающей систем организма с экспериментальной гипоплазией КKM, что приводит к снижению гиперкоагуляции. Данный эффект, вероятно, связан с активацией под действием фитомеланина антиоксидантных систем,

что привело к снижению уровня СРО и к стабилизации клеточных мембран, вследствие чего произошло частичное восстановление клеточного субстрата КKM, селезенки и печени (рис. 15-17) и частичное восстановление системы PASC.

При введении фитомеланина, известного в медицине своими антиоксидантными свойствами, в организм с экспериментальной гипоплазией КKM главной точкой его приложения являются свободно-радикальные процессы. Фитомеланин оказал модулирующий эффект на усиление активности антиоксидантных систем организма, на торможение уровня СРО, что привело к стабилизации клеточных мембран и частичному восстановлению морфологического субстрата КKM, селезенки и печени и, как следствие, к частичному восстановлению системы PASC. Однако как морфологическая картина исследуемых органов, так и показатели анализов крови далеки от значений, полученных в контрольной группе. Причиной этого может быть то, что точкой приложения фитомеланина являются только свободно-радикальные процессы.

Исходя из результатов анализов видно, что полного восстановления уровня СРО не произошло. Вероятно, это связано с тем, что подобно действию других антиоксидантов фитомеланин в большой дозировке может сам начать обладать прооксидантным действием, поэтому уровень процессов СРО и, как следствие, морфологическая картина КKM, печени и селезенки, а также свертываемость крови восстановились лишь до определенного уровня. Кроме того, даже при восстановлении уровня СРО до нормальных значений в патогенезе повреждения мембран клеток при экспериментальной гипоплазии КKM могут быть и другие ведущие звенья (не связанные с интенсификацией перекисного окисления липидов) – активация лизосомальных, мембранно-связанных и солубилизированных гидролаз, нарушение конформации молекул белка, липопротеидов и фосфолипидов и т.д. Таким образом, даже полное восстановление уровня СРО может не привести к восстановлению клеточного субстрата и, как следствие, системы PASC до контрольных показателей.

Сравнивая морфологическую картину КKM, селезенки и печени, а также показатели процессов СРО и системы PASC крыс третьей, четвертой и шестой групп с показателями первой и второй групп, можно прийти к выводу, что СК, ЭМИ КВЧ и фитомеланин

являются факторами, оказывающими модулирующий эффект на восстановление организма с экспериментальной гипоплазией ККМ. Реализация модулирующего эффекта этих факторов проходила через разные механизмы. Сравним изолированное действие факторов ЭМИ КВЧ, СК и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ между собой.

При изолированном введении фитомеланина в организм, пораженный цитостатиками, главной точкой приложения является активация антиоксидантных систем, при воздействии ЭМИ КВЧ – активация антиоксидантных и антикоагулянтных систем. Однако в случае введения фитомеланина произошла частичная стабилизация клеточных мембран, вследствие чего восстановился и морфологический субстрат ККМ, селезенки и печени и уже, как следствие, частичное восстановление уровня агрегатного состояния крови. В случае воздействия ЭМИ КВЧ восстановление морфологического субстрата тканей исследуемых органов практически не произошло. Вероятно, это связано с тем, что ЭМИ КВЧ может обладать не только модулирующим восстановлением, но и дополнительным повреждающим эффектом на исследуемые органы. Введение СК оказало наибольший модулирующий эффект на восстановление морфологического субстрата ККМ, селезенки и печени среди трех сравниваемых факторов. Кроме того, именно стабилизация морфологической картины исследуемых органов является главной точкой приложения СК, поскольку восстановление клеточного субстрата привело к активации антиоксидантных систем и к снижению гиперкоагуляции. Сравнивая уровни процессов СРО и показатели системы РАСК, можно прийти к выводу, что все эти показатели имеют приблизительно одинаковые значения во всех трех группах: третьей, четвертой и шестой.

Равную силу модулирующего эффекта всех трех факторов на усиление антиоксидантной защиты и уменьшение свертываемости крови можно объяснить следующими причинами. СК оказали среди трех изучаемых изолированных факторов наибольшее влияние на восстановление разрушенных цитостатиками клеток, вследствие чего началось восстановление уровня процессов СРО и системы РАСК, однако восстановления клеток в полном объеме не произошло и сами по себе введенные СК в

отличие от фитомеланина и ЭМИ КВЧ не активировали биохимический обмен антиоксидантов и антикоагулянтов. ЭМИ КВЧ оказало достаточно сильный модулирующий эффект на биохимический обмен антиоксидантов и антикоагулянтов, однако совершенно не оказало модулирующего эффекта на восстановление клеток в отличие от групп животных, где вводились фитомеланин или СК. Введение фитомеланина оказало модулирующий эффект на биохимический обмен антиоксидантов и привело к частичному восстановлению клеточного субстрата, но уровень его восстановления меньше, чем при введении СК, поэтому изолированное действие всех трех исследуемых факторов обладает приблизительно одинаковым эффектом на восстановление уровня процессов СРО и системы РАСК в организме с экспериментальной гипоплазией КKM.

Для более полного сопоставления силы модулирующих эффектов ЭМИ КВЧ, СК и фитомеланина были разделены все группы животных с экспериментальной гипоплазией КKM (2-я, 3-я, 4-я, 5-я, 6-я, 7-я, 8-я, 9-я) таким образом, что часть животных, подвергавшаяся воздействию какого-либо фактора, сравнивалась с другой – не подвергавшейся воздействию этого же фактора.

Таблица 1

Средние значения оксидантов и антиоксидантов всех исследуемых животных с экспериментальной гипоплазией КKM, которым вводились (S) и которым не вводились (-S) стволовые клетки

Показатели	S	-S
Гидроперекиси липидов, ОЕ/мл	1,71±0,17	2,48±0,18
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	1,15±0,08	1,72±0,10
Антиокислительная активность плазмы, %	22,67±0,83	18,42±0,47
Активность каталазы, мкат/л	13,23±0,99	8,14±0,52
Супероксиддисмутаза, ОЕ/ 1 мг белка эритроц.	2,17±0,19	1,66±0,05

Из всех исследуемых групп с экспериментальной гипоплазией КKM введение СК осуществлялось животным 3-й, 5-й, 8-й и 9-й групп (S). СК не вводились животным 2-й, 4-й, 6-й и 7-й групп (-S). В табл. 1 приведены средние значения уровней оксидантов и антиоксидантов, а в табл. 2 представлены средние значения уровней коагулянтов и антикоагулянтов у животных, которым осуществлялось введение СК и животных, которым СК не вводились.

Таблица 2

Средние значения коагулянтов и антикоагулянтов всех исследуемых животных экспериментальной гипоплазией КKM, которым вводились (S) и которым не вводились (-S) стволовые клетки

Показатели	S	-S
Время свертывания крови, с	104,31±6,41	75,15±4,92
Время рекальцификации плазмы, с	38,69±1,27	34,38±1,34
Концентрация фибриногена, мкмоль/л	9,20±0,30	8,09±0,19
Концентрация растворимого фибрина, мкмоль/л	0,34±0,02	0,45±0,03
Концентрация ПДФ, нмоль/л	59,80±5,98	82,47±1,89
Концентрация гепарина, Е/л	0,43±0,03	0,29±0,02
Активность антитромбина III, %	86,24±2,28	78,19±0,97
Активность плазмина, мм ²	8,19±0,54	6,19±0,36
Концентрация α ₂ -макроглобулина, мкмоль/л	4,41±0,18	5,18±0,15
Концентрация α ₁ -антитрипсина, мкмоль/л	43,33±1,25	49,76±2,00

Из всех исследуемых групп с экспериментальной гипоплазией КKM введение фитомеланина осуществлялось животным 6-й, 7-й, 8-й и 9-й групп (P). Фитомеланин не вводился животным 2-й, 3-й, 4-й и 5-й групп (-P). В табл. 3 приведены средние значения уровней оксидантов и антиоксидантов.

В табл. 4 представлены средние значения уровней коагулянтов и антикоагулянтов у животных, которым осуществлялось

введение фитомеланина, и животных, которым фитомеланин не вводился.

Таблица 3

Средние значения оксидантов и антиоксидантов всех исследуемых животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, которым вводился (Р) и которым не вводился (-Р) фитомеланин

Показатели	Р	-Р
Гидроперекиси липидов, ОЕ/мл	1,88±0,18	2,31±0,28
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	1,36±0,14	1,51±0,19
Антиокислительная активность плазмы, %	21,34±1,13	19,74±1,27
Активность каталазы, мкат/л	11,58±1,47	9,79±1,42
Супероксиддисмутаза, ОЕ/ 1 мг белка эритроц.	2,06±0,23	1,77±0,10

Таблица 4

Средние значения коагулянтов и антикоагулянтов всех исследуемых животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, которым вводился (Р) и которым не вводился (-Р) фитомеланин

Показатели	Р	-Р
Время свертывания крови, с	95,88±8,41	84,19±9,03
Время рекальцификации плазмы, с	37,69±1,36	35,38±1,81
Концентрация фибриногена, мкмоль/л	8,91±0,35	8,38±0,35
Концентрация растворимого фибрина, мкмоль/л	0,38±0,03	0,42±0,04
Концентрация ПДФ, нмоль/л	66,86±7,54	75,41±6,23
Концентрация гепарина, Е/л	0,38±0,04	0,34±0,05
Активность антитромбина III, %	84,08±2,74	80,36±2,27
Активность плазмينا, мм ²	7,66±0,60	6,72±0,67
Концентрация α ₂ -макроглобулина, мкмоль/л	4,63±0,25	4,95±0,23
Концентрация α ₁ -антитрипсина, мкмоль/л	44,85±1,57	48,24±2,64

Таблица 5

Средние значения оксидантов и антиоксидантов всех исследуемых животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, которые подверглись (Е) и которые не подверглись (-Е) облучению ЭМИ КВЧ

Показатели	Е	-Е
Гидроперокси липидов, ОЕ/мл	1,92±0,22	2,27±0,27
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	1,36±0,14	1,51±0,18
Антиокислительная активность плазмы, %	21,16±1,27	19,93±1,19
Активность каталазы, мкат/л	11,48±1,46	9,89±1,46
Супероксиддисмутаза, ОЕ/ 1 мг белка эритроц.	1,97±0,19	1,86±0,18

Таблица 6

Средние значения коагулянтов и антикоагулянтов животных, подвергшихся (Е) и не подвергшихся (-Е) облучению ЭМИ КВЧ

Показатели	Е	-Е
Время свертывания крови, с	95,88±8,14	84,19±9,27
Время рекальцификации плазмы, с	37,75±1,32	35,31±1,81
Концентрация фибриногена, мкмоль/л	8,88±0,34	8,41±0,38
Концентрация растворимого фибрина, мкмоль/л	0,37±0,03	0,43±0,04
Концентрация ПДФ, нмоль/л	67,00±6,98	75,27±6,90
Концентрация гепарина, Е/л	0,39±0,04	0,33±0,04
Активность антитромбина III, %	83,62±2,49	80,82±2,69
Активность плазмина, мм ²	7,62±0,59	6,76±0,69
Концентрация α ₂ -макроглобулина, мкмоль/л	4,66±0,24	4,92±0,26
Концентрация α ₁ -антитрипсина, мкмоль/л	44,54±1,55	48,55±2,53

Из всех исследуемых групп с экспериментальной гипоплазией ККМ воздействию ЭМИ КВЧ подвергались животные 4-й, 5-й, 7-й и 9-й групп (Е). Облучение ЭМИ КВЧ не проводилось животным 2-й, 3-й, 6-й и 8-й групп (-Е). В табл. 5 приведены средние значения уровней оксидантов и антиоксидантов, а в табл. 6 представлены средние значения уровней коагулянтов и антикоагулянтов животных, которые подвергались воздействию ЭМИ КВЧ, и животных, которым облучение ЭМИ КВЧ не проводилось.

При сравнении силы модулирующих эффектов (табл. 1-6) трех исследуемых факторов путем разделения всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ на 2 части – подвергавшихся воздействию данного фактора и не подвергавшихся его воздействию – выявляются следующие закономерности:

1) Все три исследуемых фактора при их воздействии на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ обладают модулирующим эффектом на восстановление показателей уровня СРО и системы РАСК.

2) Сила модулирующих эффектов исследуемых факторов неодинакова. В большей степени восстановление показателей уровня СРО и системы РАСК произошло у тех животных, которым вводились СК. Факторы ЭМИ КВЧ и фитомеланин обладают приблизительно равным модулирующим эффектом, однако меньшим по сравнению с введением СК.

Первая выявленная закономерность полностью совпадает с той, что была получена при изучении действия модулирующих факторов по отдельным группам животных. Согласно второй выявленной закономерности СК обладают большим модулирующим эффектом в отношении восстановления показателей СРО и системы РАСК у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, чем фитомеланин и ЭМИ КВЧ. При изучении же действия модулирующих факторов по отдельным группам были получены данные, что все три фактора обладают приблизительно одинаковым эффектом. Причиной такого расхождения в выводах о силе модулирующих эффектов исследуемых нами факторов является сама методика. В случае сравнения факторов по отдельным группам учитывалось только их изолированное действие на организм. В случае же сравнения путем разделения всех животных с экспери-

ментальной гипоплазией ККМ на тех, которые подвергались и не подвергались воздействию данного фактора, во внимание брались также группы животных, которые были подвергнуты сочетанному действию модулирующих факторов.

Таким образом, причины, приведшие к расхождению результатов, полученных по этим двум методикам, будут известны после изучения сочетанного действия модулирующих факторов в различных комбинациях, что будет описано ниже.

У животных пятой группы после введения цитостатиков, стволовых клеток и облучения ЭМИ КВЧ в тканях исследуемых органов наблюдались следующие изменения.

В ткани красного костного мозга формировалась гиперплазия клеточных элементов, увеличение количества плюрипотентных клеток и пролиферирующих клеток II-III ряда. Аномальные бластные клетки с гипертрофированными ядрами отсутствуют (рис. 18). Ткань селезенки характеризуется гипертрофией и гиперплазией лимфоидных фолликулов, наблюдается диффузная инфильтрация пульпы лимфоидными клетками (рис. 19).

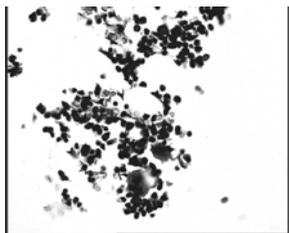


Рис. 18. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс пятой группы, $\times 230$



Рис. 19. Микроскопическая картина селезенки крыс пятой группы, $\times 460$

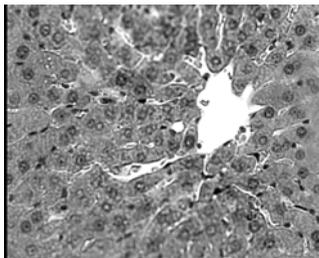


Рис. 20. Микроскопическая картина печени крыс пятой группы, $\times 115$

В ткани печени выявлено увеличение количества синусоидальных клеток, появление макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации в портальных полях, присутствует выраженная митотическая активность гепатоцитов во всех зонах классической печеночной дольки. Морфологические признаки нарушения микроциркуляции отсутствуют (рис. 20).

Таким образом, сочетанное влияние ЭМИ КВЧ и СК на организм с экспериментальной гипоплазией КKM оказало сильное модулирующее воздействие на восстановление исследуемых органов. Такие показатели, как высокий уровень пролиферации клеток, практически полное отсутствие признаков нарушений их дифференцировки, полное отсутствие нарушений микроциркуляции, приближают морфологическую картину исследуемых тканей к показателям контрольной группы. Данные результаты нельзя объяснить обычной суммой отдельно взятых модулирующих эффектов ЭМИ КВЧ и СК, так как при изолированном введении СК в организм с экспериментальной гипоплазией КKM наблюдался более низкий уровень клеточной пролиферации, имелись признаки нарушения дифференцировки и признаки нарушения микроциркуляции, а изолированное облучение ЭМИ КВЧ вообще не оказало никакого модулирующего эффекта. Это позволяет сделать вывод о том, что ЭМИ КВЧ оказало стимулирующее влияние на пролиферацию и дифференцировку СК.

При исследовании уровня активности СРО в пятой группе экспериментальных животных были получены следующие результаты. Концентрация гидроперекисей липидов составила $(1,50 \pm 0,18)$ ОЕ/мл, малонового диальдегида – $(1,06 \pm 0,11)$ мкмоль/л, антиокислительная активность плазмы – $(23,60 \pm 0,49)$ %, активность каталазы – $(14,10 \pm 0,18)$ мкат/л, активность супероксиддисмутазы – $(2,02 \pm 0,09)$ ОЕ/ 1 мг белка эритроцита.

При сравнении активности СРО животных пятой группы с животными первой и второй групп видно, что концентрации гидроперекисей липидов и малонового диальдегида у животных пятой группы значительно снизились по сравнению с таковыми во второй группе и лишь незначительно превышают показатели первой (контрольной) группы. Антиокислительная активность плазмы и активность супероксиддисмутазы по сравнению с показателями животных второй группы значительно повысились и

практически достигают контрольных значений, а активность каталазы даже превышает соответствующий показатель, полученный в контрольной группе.

Таким образом, сочетанное воздействие СК и ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM приводит к практически полному восстановлению уровня СРО. Уровень оксидантов лишь незначительно превысил контрольные значения, а уровень антиоксидантов практически не отличается от показателей первой группы. Данные результаты объясняются тем, что сочетанное действие СК и ЭМИ КВЧ привело к почти полному восстановлению клеточного субстрата КKM, селезенки и печени в организме с экспериментальной гипоплазией КKM. Кроме того, при анализе механизмов сочетанного действия СК и ЭМИ КВЧ на уровень СРО необходимо отметить суммирующий эффект – кроме восстановления клеточного субстрата под действием ЭМИ КВЧ произошло активирование антиоксидантных систем.

Изучение уровня активности коагулянтов и антикоагулянтов у животных пятой группы дало следующие результаты. Среднее время свертывания крови составило $(111,00 \pm 3,30)$ с, время рекальцификации плазмы – $(39,50 \pm 2,33)$ с, концентрация фибриногена – $(9,40 \pm 0,25)$ мкмоль/л, концентрация фибрина – $(0,32 \pm 0,03)$ мкмоль/л, концентрация ПДФ – $(55,28 \pm 3,59)$ нмоль/л, концентрация гепарина – $(0,47 \pm 0,03)$ Е/л, активность антитромбина III – $(86,95 \pm 2,39)$ %, активность плазмина – $(8,70 \pm 0,29)$ мм², концентрация α_2 -макроглобулина – $(4,35 \pm 0,13)$ мкмоль/л, концентрация α_1 -антитрипсина – $(41,93 \pm 0,99)$ мкмоль/л.

При сравнении показателей свертывающей и противосвертывающей систем животных пятой группы с животными первой и второй групп отмечаются следующие закономерности. Время свертывания крови и время рекальцификации плазмы у крыс пятой группы значительно повысились относительно данных показателей у крыс второй группы и остаются лишь незначительно ниже значений, полученных в первой (контрольной) группе, следовательно, при сочетанном действии стволовых клеток и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, происходит значительное снижение уровня свертываемости крови, он почти достигает контрольных значений. Концентрация фибриногена значительно выше, чем у животных второй группы и прак-

тически достигает данного показателя, полученного у животных контрольной группы. Концентрация фибрина, напротив, значительно снизилась относительно данного показателя во второй группе, но остается несколько выше концентрации фибрина у животных первой группы. Таким образом, скорость третьей фазы коагуляционного гемостаза при сочетанном воздействии СК и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, значительно снижается. Концентрация ПДФ у животных пятой группы по сравнению с данным показателем во второй группе резко снизилась, но остается несколько выше контрольных значений, следовательно, активность фибринолиза при сочетанном воздействии СК и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, значительно снижается и лишь немного превышает норму. Концентрация гепарина, а также активность антитромбина III и плазмينا по сравнению с данными показателями у животных второй группы значительно повысились, практически достигают контрольных значений, следовательно, сочетанное воздействие СК и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, приводит к практически полному восстановлению активности гепарин-антитромбиновой и плазминоген-плазминовой систем.

Таким образом, сочетанное воздействие СК и ЭМИ КВЧ обладает сильным модулирующим влиянием, обеспечивающим ослабление активности свертывающей и усиление активности противосвертывающей систем организма с экспериментальной гипоплазией КKM, что приводит к практически полному восстановлению системы PASC, показатели коагулянтов и антикоагулянтов у животных пятой группы ненамного отличаются от значений, полученных в контрольной группе. Механизм сочетанного действия данных факторов реализуется через практически полное восстановление клеточного субстрата КKM, селезенки и печени, а также через прямую активацию антикоагулянтных систем под действием ЭМИ КВЧ.

Сочетанное воздействие введения СК и облучения ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM привело к значительному восстановлению морфологической картины КKM, селезенки и печени. Она отличается высоким уровнем пролиферации клеток, практически полным отсутствием признаков нарушений дифференцировки и микроциркуляции, что делает ее

сопоставимой с морфологической картиной тканей исследуемых органов, полученной в контрольной группе. Так как изолированное действие ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM не вызывало модулирующего эффекта восстановления морфологической картины КKM, селезенки и печени, то результаты, полученные при сочетанном действии двух факторов, нельзя объяснить простой суммой их эффектов. Механизм сочетанного действия СК и ЭМИ КВЧ заключается в том, что ЭМИ КВЧ оказало модулирующий эффект на пролиферацию и дифференцировку самих стволовых клеток и, как следствие этого, произошло значительное восстановление клеточного субстрата.

Сочетанное действие СК и ЭМИ КВЧ на регуляцию процессов СРО и системы РАСК в организме с экспериментальной гипоплазией КKM привело к практически полному восстановлению уровня оксидантов, антиоксидантов, коагулянтов и антикоагулянтов. Данные показатели лишь незначительно отличаются от контрольных значений. Механизм сочетанного действия СК и ЭМИ КВЧ на регуляцию уровня процессов СРО и системы РАСК в организме с экспериментальной гипоплазией КKM заключается в сумме эффектов: значительного восстановления клеточного субстрата и прямого действия ЭМИ КВЧ на активацию антиоксидантных и антикоагулянтных систем.

У животных седьмой группы, которым сначала вводили цитостатик, после чего фитомеланин и подвергали облучению ЭМИ КВЧ, в тканях исследуемых органов наблюдались следующие изменения.

Морфологическая картина красного костного мозга характеризуется увеличением плюрипотентных клеток и пролиферацией колониеобразующих единиц по сравнению с той, что была получена у животных второй группы. Уровень пролиферации клеток лишь незначительно превышает таковой, наблюдаемый у животных шестой группы (с изолированным введением фитомеланина), однако признаки нарушения дифференцировки клеток в случае сочетанного применения фитомеланина и ЭМИ КВЧ выражены меньше (рис. 21).

В ткани селезенки сохранены признаки гипоплазии, количество и размер лимфоидных фолликулов несколько увеличены по сравнению с морфологической картиной, полученной у живот-

ных второй группы. По сравнению с животными шестой группы увеличение уровня пролиферации лимфоидных фолликулов выражен незначительно (рис. 22).

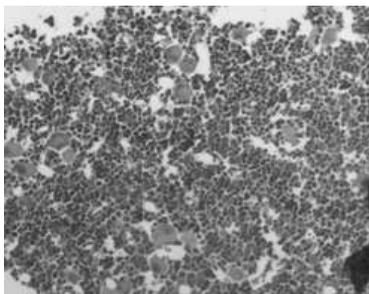


Рис. 21. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс седьмой группы, $\times 230$

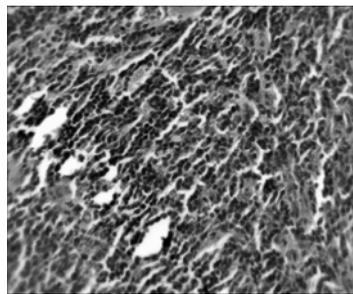


Рис. 22. Микроскопическая картина селезенки крыс седьмой группы, $\times 230$

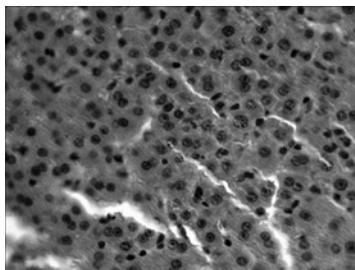


Рис. 23. Микроскопическая картина печени крыс седьмой группы, $\times 230$

Морфологическая картина ткани печени в отличие от таковой, полученной у животных второй группы, характеризуется увеличением числа гепатоцитов, сохранением признаков нарушений микроциркуляции (рис. 23).

Таким образом, сочетанное воздействие фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM оказало модулирующий эффект на восстановление тканей КKM, селезенки и печени лишь в незначительной степени, чем изолированное введение фитомеланина.

При исследовании уровня активности СРО в седьмой группе экспериментальных животных были получены следующие результаты. Концентрация гидроперекисей липидов составила $(2,19 \pm 0,09)$ ОЕ/мл, малонового диальдегида – $(1,61 \pm 0,05)$ мкмоль/л, антиокислительная активность плазмы – $(19,25 \pm 0,23)$ %, активность каталазы – $(8,55 \pm 0,13)$ мкат/л, активность супероксиддисмутазы – $(1,71 \pm 0,02)$ ОЕ/1 мг белка эритроц.

При сравнении активности СРО животных седьмой группы с животными первой и второй групп видно, что концентрации гидроперекисей липидов и малонового диальдегида у животных седьмой группы снизились по сравнению с таковыми во второй группе, но значительно превышают показатели первой (контрольной) группы. Антиокислительная активность плазмы, а также активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и супероксиддисмутазы по сравнению с показателями животных второй группы повысились, однако остаются значительно ниже показателей первой (контрольной) группы.

При сравнении активности СРО животных седьмой группы с животными шестой (подвергшиеся введению цитостатика и изолированному введению фитомеланина) и четвертой (подвергшимся введению цитостатика и изолированному воздействию ЭМИ КВЧ) групп видно, что сочетанное воздействие фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM имеет лишь незначительно больший по своей силе модулирующий эффект на снижение уровня оксидантов и увеличение уровня антиоксидантов, чем изолированное применение этих факторов.

Точкой приложения фитомеланина и ЭМИ КВЧ в регуляции уровня СРО является прямое воздействие на активацию антиоксидантных систем. В случае сочетанного действия этих факторов ЭМИ КВЧ оказало модулирующее действие на обмен антиоксидантов и, возможно, самого фитомеланина. Этим объясняется тот факт, что показатели оксидантов и антиоксидантов животных седьмой группы все же несколько выше, чем таковые, полученные у животных шестой и четвертой групп. Этим же объясняется и несколько большая сила модулирующего эффекта сочетанного действия ЭМИ КВЧ и фитомеланина на восстановление клеточного субстрата КKM, селезенки и печени, чем изолированного

применения фитомеланина, так как более стабильный уровень СРО приводит к большей сохранности клеточных мембран.

В то же время величина модулирующего эффекта сочетанного действия фитомеланина и ЭМИ КВЧ на восстановление уровня СРО в организме, пораженном цитостатиками, лишь ненамного превышает таковую при изолированном применении этих факторов. Таким образом, если в пятой группе сочетанное действие двух факторов дало модулирующие эффекты, намного превышающие простую сумму эффектов изолированного действия факторов, то в шестой группе, наоборот, сочетанное действие двух факторов дало модулирующие эффекты, оказавшиеся намного ниже суммы эффектов изолированного действия факторов. Причина данного явления заключается в том, что в случае сочетанного действия ЭМИ КВЧ и СК на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ ЭМИ КВЧ оказало модулирующий эффект на пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток, что привело к почти полному восстановлению клеточного субстрата и, как следствие, к восстановлению уровня процессов СРО и системы РАСК. В случае же сочетанного действия фитомеланина и ЭМИ КВЧ излучение также оказало влияние на активацию обмена антиоксидантов, в том числе и самого фитомеланина, однако при большой активности антиоксиданты могут сами начать обладать прооксидантным действием, поэтому степень восстановления уровня СРО и, как следствие, клеточного субстрата ККМ, селезенки и печени у животных седьмой группы лишь незначительно больше, чем у животных шестой и четвертой групп.

Изучение уровня активности коагулянтов и антикоагулянтов у животных седьмой группы дало следующие результаты. Среднее время свертывания крови составило $(80,25 \pm 7,69)$ с, время рекальцификации плазмы – $(35,75 \pm 0,94)$ с, концентрация фибриногена – $(8,25 \pm 0,19)$ мкмоль/л, концентрация фибрина – $(0,43 \pm 0,02)$ мкмоль/л, концентрация ПДФ – $(80,93 \pm 3,14)$ нмоль/л, концентрация гепарина – $(0,33 \pm 0,03)$ Е/л, активность антитромбина III – $(79,25 \pm 1,28)$ %, активность плазмина – $(6,55 \pm 0,36)$ мм², концентрация α_2 -макроглобулина – $(5,15 \pm 0,19)$ мкмоль/л, концентрация α_1 -антитрипсина – $(46,63 \pm 1,34)$ мкмоль/л. При сравнении показателей свертывающей и противосвертывающей систем животных седьмой группы с животными первой и второй групп отмечаются

следующие закономерности. Время свертывания крови и время рекальцификации плазмы у крыс седьмой группы повысились относительно данных показателей у крыс второй группы, но остаются значительно ниже, чем показатели в первой (контрольной) группе, следовательно, при сочетанном воздействии фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, происходит некоторое снижение гиперкоагуляции. Концентрация фибриногена выше, чем у животных второй группы, но ниже, чем у животных контрольной группы. Концентрация фибрина, напротив, снизилась относительно данного показателя во второй группе, но остается выше концентрации фибрина у животных первой группы.

Таким образом, скорость третьей фазы коагуляционного гемостаза при сочетанном действии фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, несколько снижается. Концентрация ПДФ у животных седьмой группы по сравнению с данным показателем во второй группе снизилась, но остается значительно выше контрольных значений, следовательно, активность фибринолиза при сочетанном действии фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, снижается, хотя и остается значительно выше нормы. Концентрация гепарина, а также активность антитромбина III и плазмина по сравнению с данными показателями у животных второй группы повысились, но остаются значительно ниже показателей первой группы, следовательно, сочетанное действие фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, оказывает стимулирующий эффект на увеличение активности гепарин-антитромбиновой и пламиноген-плазминовой систем, хотя она по-прежнему остается значительно ниже контрольных значений.

При сравнении активности системы РАСК животных седьмой группы с животными шестой (подвергшимися введению цитостатика и изолированному введению фитомеланина) и четвертой (подвергшимся введению цитостатика и изолированному воздействию ЭМИ КВЧ) групп видно, что сочетанное воздействие фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ имеет лишь незначительно больший по своей силе модулирующий эффект снижения уровня коагу-

лянтов и увеличение уровня антикоагулянтов, чем изолированное применение этих факторов.

Низкая степень увеличения модулирующего эффекта на восстановление системы РАСК при сочетанном воздействии фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM относительно их изолированного воздействия объясняется низкой степенью увеличения модулирующего эффекта на восстановления клеточного субстрата КKM, селезенки и печени.

В отличие от сочетанного воздействия СК и ЭМИ КВЧ, сочетанное воздействие фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM дало модулирующие эффекты на восстановление уровня процессов СРО, системы РАСК, а также морфологического субстрата КKM, селезенки и печени, оказавшиеся намного ниже суммы эффектов изолированного действия данных факторов. Причина данного явления заключается в том, что в случае сочетанного действия ЭМИ КВЧ и СК на организм с экспериментальной гипоплазией КKM ЭМИ КВЧ наблюдается модулирующий эффект на пролиферацию и дифференцировку СК, что привело к почти полному восстановлению клеточного субстрата исследуемых тканей и, как следствие, к восстановлению уровня процессов СРО и системы РАСК. В случае же сочетанного действия фитомеланина и ЭМИ КВЧ, излучение также оказало влияние на активацию обмена антиоксидантов, в том числе и самого фитомеланина, однако при большой активности антиоксиданты могут сами начать обладать прооксидантным действием, поэтому степень восстановления уровня процессов СРО и, как следствие, клеточного субстрата КKM, селезенки и печени, а также системы РАСК у животных седьмой группы лишь незначительно больше, чем у животных шестой и четвертой групп.

У животных восьмой группы, которым сначала вводили цитостатик, после чего СК и фитомеланин, в тканях исследуемых органов наблюдались следующие изменения.

В ткани красного костного мозга наблюдается гиперплазия клеточных элементов, увеличение количества плюрипотентных клеток и пролиферирующих клеток II-III ряда, наблюдается наличие единичных миелобластов (рис. 24).

Ткань селезенки характеризуется гипертрофией и гиперплазией лимфоидных фолликулов, имеется наличие единичных селезеночных макрофагов (рис. 25).

В ткани печени выявлено увеличение количества синусоидальных клеток, присутствует выраженная митотическая активность гепатоцитов во всех зонах классической печеночной дольки. Морфологические признаки нарушения микроциркуляции отсутствуют (рис. 26).

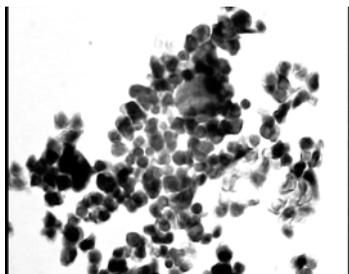


Рис. 24. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс восьмой группы, $\times 230$

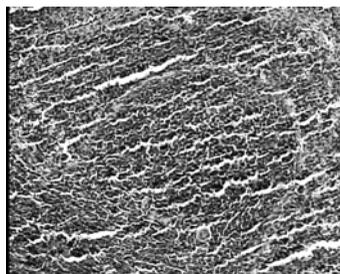


Рис. 25. Микроскопическая картина селезенки крыс восьмой группы, $\times 460$

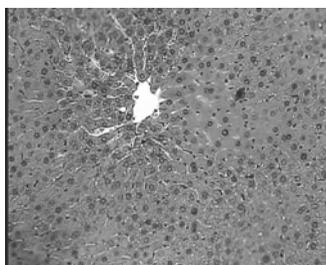


Рис. 26. Микроскопическая картина печени крыс восьмой группы, $\times 115$

Таким образом, сочетанное воздействие СК и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ оказало сильный модулирующий эффект на восстановление исследуемых тканей. Сила этого эффекта значительно выше, чем та, которая была получена при изолированном применении СК (жи-

вотные третьей группы) или фитомеланина (животные шестой группы), однако несколько меньше той, что была получена при применении сочетанного воздействия СК и ЭМИ КВЧ (животные пятой группы).

В отличие от морфологической картины тканей ККМ, селезенки и печени, наблюдаемой у животных третьей и шестой групп, у животных восьмой группы процессы пролиферации клеток выражены значительно выше и отсутствуют признаки нарушений микроциркуляции. В отличие от морфологической картины тканей исследуемых органов, наблюдаемой у животных пятой группы, у животных восьмой группы процессы пролиферации клеток выражены несколько меньше и сохранены признаки нарушения дифференцировки. Таким образом, в отличие от силы модулирующего эффекта сочетанного действия СК и ЭМИ КВЧ на восстановление клеточного субстрата исследуемых органов, полученной у животных пятой группы, силу модулирующего эффекта сочетанного действия СК и фитомеланина можно объяснить простой суммой модулирующих эффектов изолированного действия СК и фитомеланина (через восстановление уровня СРО и стабилизацию клеточных мембран).

При исследовании уровня активности СРО в восьмой группе экспериментальных животных были получены следующие результаты. Концентрация гидроперекисей липидов составила $(1,55 \pm 0,16)$ ОЕ/мл, малонового диальдегида – $(1,10 \pm 0,14)$ мкмоль/л, антиокислительная активность плазмы – $(23,40 \pm 1,12)$ %, активность каталазы – $(14,33 \pm 0,64)$ мкат/л, активность супероксиддисмутазы – $(2,40 \pm 0,36)$ ОЕ/ 1 мг белка эритроц.

При сравнении активности СРО животных восьмой группы с животными первой и второй групп видно, что концентрации гидроперекисей липидов и малонового диальдегида у животных восьмой группы значительно снизились по сравнению с таковыми во второй группе и лишь ненамного превышают показатели первой (контрольной) группы. Антиокислительная активность плазмы по сравнению с данным показателем животных второй группы значительно повысилась и практически достигает контрольных значений, а активности каталазы и супероксиддисмутазы даже превышают соответствующие показатели, полученные в контрольной группе. Таким образом, сочетанное воздействие СК и фитомелани-

на на организм с экспериментальной гипоплазией КKM приводит к практически полному восстановлению уровня СРО. Уровень оксидантов лишь ненамного превысил контрольные значения, а показатели антиоксидантов практически не отличаются от показателей первой группы и даже превышают их. Данные результаты объясняются тем, что сочетанное действие СК и фитомеланина на восстановление уровня СРО в организме с экспериментальной гипоплазией КKM реализуется через сумму модулирующих эффектов СК (через восстановление клеточного субстрата) и фитомеланина (прямое воздействие на антиоксидантные системы, восстановление клеточного субстрата).

Изучение уровня активности коагулянтов и антикоагулянтов у животных восьмой группы дало следующие результаты. Среднее время свертывания крови составило $(111,50 \pm 4,12)$ с, время рекальцификации плазмы – $(39,75 \pm 1,67)$ с, концентрация фибриногена – $(9,55 \pm 0,19)$ мкмоль/л, концентрация фибрина – $(0,33 \pm 0,03)$ мкмоль/л, концентрация ПДФ – $(52,48 \pm 3,23)$ нмоль/л, концентрация гепарина – $(0,46 \pm 0,03)$ Е/л, активность антитромбина III – $(89,13 \pm 1,51)$ %, активность плазмина – $(8,83 \pm 0,32)$ мм², концентрация α_2 -макроглобулина – $(4,20 \pm 0,21)$ мкмоль/л, концентрация α_1 -антитрипсина – $(42,60 \pm 1,35)$ мкмоль/л.

При сравнении показателей свертывающей и противосвертывающей систем животных восьмой группы с животными первой и второй групп отмечаются следующие закономерности. Время свертывания крови и время рекальцификации плазмы у крыс восьмой группы значительно повысились относительно данных показателей у крыс второй группы и остаются лишь ненамного ниже значений, полученных в первой (контрольной) группе, следовательно, при сочетанном действии СК и фитомеланина на организм, пораженный цитостатиками, происходит значительное снижение уровня свертываемости крови, он почти достигает контрольных значений. Концентрация фибриногена значительно выше, чем у животных второй группы и практически достигает данного показателя, полученного у животных контрольной группы. Концентрация фибрина, напротив, значительно снизилась относительно данного показателя во второй группе, но остается несколько выше концентрации фибрина у животных первой группы. Таким образом, скорость третьей фа-

зы коагуляционного гемостаза при сочетанном воздействии СК и фитомеланина на организм, пораженный цитостатиками, значительно снижается. Концентрация ПДФ у животных восьмой группы по сравнению с данным показателем во второй группе резко снизилась, но остается несколько выше контрольных значений, следовательно, активность фибринолиза при сочетанном воздействии СК и фитомеланина на организм, пораженный цитостатиками, значительно снижается и лишь немного превышает норму. Концентрация гепарина, а также активность антитромбина III и плазмينا по сравнению с данными показателями у животных второй группы значительно повысились и практически достигают контрольных значений, следовательно, сочетанное воздействие стволовых клеток и фитомеланина на организм, пораженный цитостатиками, приводит к практически полному восстановлению активности гепарин-антитромбиновой и плазминоген-плазминовой систем.

Таким образом, сочетанное воздействие СК и фитомеланина обладает сильным модулирующим эффектом на ослабление активности свертывающей и усиление активности противосвертывающей систем организма с экспериментальной гипоплазией КKM, что приводит к практически полному восстановлению системы PASC: показатели коагулянтов и антикоагулянтов у животных восьмой группы ненамного отличаются от значений, полученных в контрольной группе. Механизм сочетанного действия данных факторов реализуется через суммирование модулирующих эффектов СК и фитомеланина, направленных на восстановление клеточного субстрата КKM, селезенки и печени.

Таким образом, сочетанное воздействие СК и фитомеланина обладает сильным модулирующим эффектом на восстановление тканей КKM, селезенки и печени в организме с экспериментальной гипоплазией КKM, хотя и несколько меньшим по силе, чем при сочетанном воздействии СК и ЭМИ KBЧ. Причина данного явления кроется в механизмах действия сочетания различных факторов. В отличие от силы модулирующего эффекта сочетанного действия СК и ЭМИ KBЧ на восстановление клеточного субстрата исследуемых органов, полученной у животных пятой группы, силу модулирующего эффекта сочетанного действия СК и фитомеланина можно объяснить простой суммой модулирующих эффектов

изолированного действия СК и фитомеланина (через восстановление уровня СРО и стабилизацию клеточных мембран).

Сочетанное воздействие СК и фитомеланина на регуляцию процессов СРО и системы РАСК в организме с экспериментальной гипоплазией КKM привело к практически полному восстановлению уровня оксидантов, антиоксидантов, коагулянтов и антикоагулянтов. Данные показатели лишь незначительно отличаются от контрольных значений. Механизм сочетанного действия СК и фитомеланина на регуляцию уровня процессов СРО и системы РАСК в организме с экспериментальной гипоплазией КKM заключается в сумме эффектов изолированного действия СК (восстановление клеточного субстрата) и фитомеланина (активация антиоксидантных систем и стабилизация клеточных мембран).

Для более полного сопоставления силы модулирующих эффектов сочетанного воздействия ЭМИ КВЧ, СК и фитомеланина в различных комбинациях разделим все группы животных с экспериментальной гипоплазией КKM, подвергавшиеся воздействию двух и более модулирующих факторов (5-я, 7-я, 8-я, 9-я) на три части:

1) (S+E) – животные, которые были подвергнуты введению СК и облучению ЭМИ КВЧ (5-я и 9-я группы);

2) (P+E) – животные, которые были подвергнуты введению фитомеланина и облучению ЭМИ КВЧ (7-я и 9-я группы);

3) (S+P) – животные, которые были подвергнуты введению СК и фитомеланина (8-я и 9-я группы).

В табл. 7 приведены средние значения уровней оксидантов и антиоксидантов, а в табл. 8 представлены средние значения уровней коагулянтов и антикоагулянтов животных, которые подвергались воздействию двух модулирующих факторов из трех возможных в различных комбинациях.

При сравнении силы модулирующих эффектов сочетанного действия СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ в различных комбинациях на восстановление уровня процессов СРО и системы РАСК в организме с экспериментальной гипоплазией КKM по данной методике (табл. 7, 8) видно, что сочетанное воздействие СК и ЭМИ КВЧ, а также сочетанное воздействие СК и фитомеланина обладает более сильным модулирующим эффектом на восстановление уровня оксидантов и антиоксидантов, коагулянтов и антикоагулян-

тов, чем сочетанное воздействие фитомеланина и ЭМИ КВЧ. Вывод о сравнительной силе модулирующих эффектов при сочетанном действии факторов, сделанный при их изучении по данной методике, полностью совпадает с тем, который был сделан при сравнении сочетанного действия факторов по отдельным группам.

Таблица 7

Средние значения оксидантов и антиоксидантов животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, которые были подвергнуты введению стволовых клеток и облучению ЭМИ КВЧ (S+E), введению фитомеланина и облучению ЭМИ КВЧ (P+E), введению стволовых клеток и фитомеланина (S+P)

Показатели	S+E	P+E	S+P
Гидроперикиси липидов, ОЕ/мл	1,52±0,10	1,86±0,25	1,54±0,09
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	1,10±0,10	1,37±0,20	1,11±0,11
Антиокислительная активность плазмы, %	23,61±0,30	21,44±1,64	23,51±0,56
Активность каталазы, мкат/л	14,33±0,43	11,55±2,26	14,44±0,49
Супероксиддисмутаза, ОЕ/ 1 мг белка эритроц.	2,25±0,27	2,09±0,35	2,43±0,27

После сравнения силы модулирующих эффектов при сочетанном действии факторов в различных комбинациях становятся понятными расхождения в выводах о силе действия факторов СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ, взятых по отдельности. При сравнении факторов путем деления всех животных на подвергавшихся воздействию данного фактора и неподвергавшихся его воздействию был сделан вывод о том, что СК обладают большим модулирующим эффектом в отношении восстановления показателей СРО и системы РАСК у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, чем фитомеланин и ЭМИ КВЧ.

Средние значения коагулянтов и антикоагулянтов животных с экспериментальной гипоплазией КKM, которые были подвергнуты введению стволовых клеток и облучению ЭМИ КВЧ (S+E), введению фитомеланина и облучению ЭМИ КВЧ (P+E), введению стволовых клеток и фитомеланина (S+P)

Показатели	S+E	P+E	S+P
Время свертывания крови, с	111,38±2,22	96,00±12,30	111,63±2,48
Время рекальцификации плазмы, с	39,88±1,31	38,00±1,85	40,00±1,05
Концентрация фибриногена, мкмоль/л	9,50±0,21	8,93±0,53	9,58±0,18
Концентрация растворимого фибрина, мкмоль/л	0,32±0,02	0,37±0,05	0,32±0,02
Концентрация ПДФ, нмоль/л	53,63±2,75	66,45±10,97	52,23±2,36
Концентрация гепарина, Е/л	0,46±0,02	0,39±0,05	0,45±0,02
Активность антитромбина III, %	88,21±1,68	84,36±3,93	89,30±1,11
Активность плазмина, мм ²	8,75±0,23	7,68±0,87	8,81±0,24
Концентрация α ₂ -макроглобулина, мкмоль/л	4,24±0,13	4,64±0,40	4,16±0,13
Концентрация α ₁ -антитрипсина, мкмоль/л	41,80±0,86	44,15±2,07	42,14±1,01

При изучении же действия модулирующих факторов по отдельным группам были получены данные, что все три фактора обладают приблизительно одинаковым эффектом. Было сделано предположение, что причиной такого расхождения в выводах о силе модулирующих эффектов исследуемых нами факторов является сама методика. В случае сравнения факторов по отдельным группам учитывалось только их изолированное действие на организм. В случае же сравнения путем разделения всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM на тех, которые подвергались и не подвергались воздействию данного фактора, во внимание брались также группы животных, которые были подвергнуты сочетанному действию модулирующих факторов. После проведенных нами в этой главе исследований становится понятным,

что при делении животных на тех, кому вводились СК, и тех, кому они не вводились, брались только те группы с сочетанным действием, в которых модулирующий эффект оказался наибольшим: сочетанное действие СК и фитомеланина и сочетанное действие СК и ЭМИ КВЧ. Во всех остальных случаях в выборку попадала седьмая группа животных – подвергшаяся сочетанному воздействию фитомеланина и ЭМИ КВЧ, обладающему наименьшим модулирующим эффектом.

У животных девятой группы, которым сначала вводили цитостатик, после чего СК, фитомеланин и подвергали облучению ЭМИ КВЧ, в тканях исследуемых органов наблюдались следующие изменения.

В ткани красного костного мозга наблюдаются выраженная гиперплазия клеточных элементов, а также увеличение количества плюрипотентных клеток и пролиферирующих клеток II-III ряда. Крупные бластные клетки, указывающие на нарушение процессов дифференцировки, отсутствуют (рис. 27).

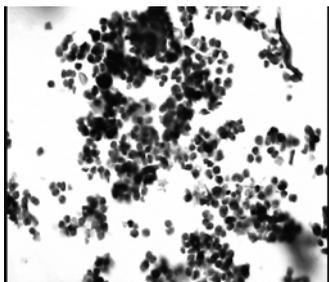


Рис. 27. Микроскопическая картина красного костного мозга крыс девятой группы, x230



Рис. 28. Микроскопическая картина селезенки крыс девятой группы, x230

Ткань селезенки характеризуется выраженной гипертрофией и гиперплазией лимфоидных фолликулов, наблюдается диффузная инфильтрация пульпы лимфоидными клетками (рис. 28). В ткани печени выявлены значительное увеличение количества синусоидальных клеток, появление макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации в портальных полях, присутствует выраженная митотическая активность гепатоцитов во всех зонах классической

печеночной долики. Морфологические признаки нарушений микроциркуляции отсутствуют (рис. 29).

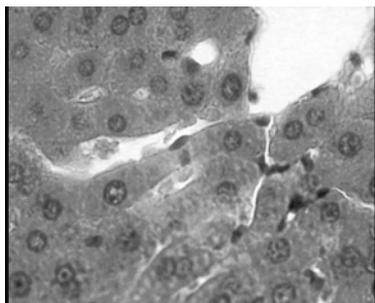


Рис. 29. Микроскопическая картина печени крыс девятой группы, x460

Таким образом, сочетанное воздействие ЭМИ КВЧ, СК и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией КKM оказало сильное модулирующее воздействие на восстановление исследуемых органов. Такие показатели, как высокий уровень пролиферации клеток, отсутствие признаков нарушений их дифференцировки, а также отсутствие нарушений микроциркуляции приближают морфологическую картину исследуемых тканей к показателям контрольной группы. При сравнении морфологической картины исследуемых органов животных девятой группы с той, которая наблюдалась в предыдущих группах, похожие изменения отмечаются только в пятой группе. Это объясняется схожим механизмом сочетанного действия факторов. И в пятой, и в девятой группах животных значительный модулирующий эффект на восстановление морфологического субстрата реализуется через стимулирующее действие ЭМИ КВЧ на пролиферацию и дифференцировку СК. В девятой экспериментальной группе на восстановление органов повлияло также воздействие фитомеланина (через активацию антиоксидантных систем и стабилизацию клеточных мембран), но так как морфологическая картина КKM, селезенки и печени животных пятой группы уже практически соответствует таковой, наблюдаемой в первой группе, то дополнительное введение фитомеланина животным

девятой группы не привело к значительному увеличению модулирующего эффекта.

При исследовании уровня активности СРО в девятой группе экспериментальных животных были получены следующие результаты. Концентрация гидроперекисей липидов составила $(1,54 \pm 0,11)$ ОЕ/мл, малонового диальдегида – $(1,13 \pm 0,19)$ мкмоль/л, антиокислительная активность плазмы – $(23,63 \pm 0,43)$ %, активность каталазы – $(14,55 \pm 0,83)$ мкат/л, активность супероксиддисмутазы – $(2,47 \pm 0,45)$ ОЕ/1 мг белка эритроцитов.

При сравнении активности СРО животных девятой группы с животными первой и второй групп видно, что концентрации гидроперекисей липидов и малонового диальдегида у животных девятой группы значительно снизились по сравнению с таковыми во второй группе и лишь ненамного превышают показатели первой (контрольной) группы. Антиокислительная активность плазмы по сравнению с данным показателем животных второй группы значительно повысилась и практически достигает контрольных значений, а активности каталазы и супероксиддисмутазы даже превышают соответствующие показатели, полученные в контрольной группе.

Таким образом, сочетанное воздействие СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM приводит к практически полному восстановлению уровня процессов СРО. Уровень оксидантов лишь ненамного превысил контрольные значения, а уровень антиоксидантов практически не отличается от показателей первой группы. Данные результаты объясняются тем, что сочетанное действие СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ привело к почти полному восстановлению клеточного субстрата КKM, селезенки и печени в организме с экспериментальной гипоплазией КKM. Необходимо также отметить суммирующий эффект: кроме восстановления клеточного субстрата под действием ЭМИ КВЧ и под действием фитомеланина произошло прямое активирование антиоксидантных систем. При сравнении уровня восстановления процессов СРО животных девятой группы с тем, который наблюдался в предыдущих группах, похожие изменения отмечаются только в пятой и восьмой группах. Однако, в отличие от пятой экспериментальной группы животных, девятой группе был дополнительно вве-

ден фитомеланин, а относительно восьмой группы было дополнительно применено воздействие ЭМИ КВЧ. И фитомеланин, и ЭМИ КВЧ при их изолированном воздействии на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ оказывают модулирующий эффект на восстановление уровня процессов СРО, что наблюдалось у животных четвертой и шестой групп. Отсутствие значительного увеличения модулирующего эффекта на увеличение уровня антиоксидантов и снижение уровня оксидантов при добавлении третьего модулирующего фактора в виде ЭМИ КВЧ или фитомеланина объясняется тем, что в избыточном количестве антиоксиданты могут сами начать проявлять прооксидантную активность.

Изучение уровня активности коагулянтов и антикоагулянтов у животных девятой группы дало следующие результаты. Среднее время свертывания крови составило $(111,75 \pm 3,43)$ с, время рекальцификации плазмы – $(40,25 \pm 1,47)$ с, концентрация фибриногена – $(9,60 \pm 0,34)$ мкмоль/л, концентрация фибрина – $(0,32 \pm 0,03)$ мкмоль/л, концентрация ПДФ – $(51,98 \pm 3,92)$ нмоль/л, концентрация гепарина – $(0,45 \pm 0,04)$ Е/л, активность антитромбина III – $(89,48 \pm 1,84)$ %, активность плазмина – $(8,80 \pm 0,40)$ мм², концентрация α_2 -макроглобулина – $(4,13 \pm 0,17)$ мкмоль/л, концентрация α_1 -антитрипсина – $(41,68 \pm 1,56)$ мкмоль/л.

При сравнении показателей свертывающей и противосвертывающей систем животных девятой группы с животными первой и второй групп отмечаются следующие закономерности. Время свертывания крови и время рекальцификации плазмы у крыс девятой группы значительно повысились относительно данных показателей у крыс второй группы и остаются лишь ненамного ниже значений, полученных в первой (контрольной) группе, следовательно, при сочетанном действии СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, происходит значительное снижение уровня свертываемости крови, он почти достигает контрольных значений. Концентрация фибриногена значительно выше, чем у животных второй группы и практически достигает данного показателя, полученного у животных контрольной группы. Концентрация фибрина, напротив, значительно снизилась относительно данного показателя во второй группе, но остается несколько выше концентрации фибрина у животных

первой группы. Таким образом, скорость третьей фазы коагуляционного гемостаза при сочетанном воздействии СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, значительно снижается. Концентрация ПДФ у животных девятой группы по сравнению с данным показателем во второй группе резко снизилась, но остается несколько выше контрольных значений, следовательно, активность фибринолиза при сочетанном воздействии СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, значительно снижается и лишь немного превышает норму. Концентрация гепарина, а также активность антитромбина III и плазмина по сравнению с данными показателями у животных второй группы значительно повысились и практически достигают контрольных значений, следовательно, сочетанное воздействие СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ на организм, пораженный цитостатиками, приводит к практически полному восстановлению активности гепарин-антитромбиновой и плазминоген-плазминовой систем.

Таким образом, сочетанное воздействие СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ обладает сильным модулирующим эффектом на ослабление активности свертывающей и усиление активности противосвертывающей систем организма с экспериментальной гипоплазией КKM, что приводит к практически полному восстановлению системы PASC; показатели коагулянтов и антикоагулянтов у животных девятой группы ненамного отличаются от значений, полученных в контрольной группе. Механизм сочетанного действия данных факторов реализуется через практически полное восстановление клеточного субстрата КKM, селезенки и печени, благодаря активации пролиферации и дифференцировки СК под действием ЭМИ КВЧ, влиянию фитомеланина на уровень процессов СРО и стабилизацию клеточных мембран, а также через прямую активацию антикоагулянтных систем под действием ЭМИ КВЧ. При сравнении уровня восстановления системы PASC животных девятой группы с тем, который наблюдался в предыдущих группах, похожие изменения наблюдаются только в пятой и восьмой группах. Однако относительно пятой экспериментальной группы животным девятой группы был дополнительно введен фитомеланин, а относительно восьмой группы было дополнительно применено воз-

действие ЭМИ КВЧ. И фитомеланин, и ЭМИ КВЧ при их изолированном воздействии на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ оказывают модулирующий эффект на восстановление системы РАСК, что наблюдалось у животных четвертой и шестой групп. Отсутствие значительного увеличения модулирующего эффекта на увеличение уровня антикоагулянтов и снижение уровня коагулянтов в организме с экспериментальной гипоплазией ККМ при добавлении третьего модулирующего фактора в виде фитомеланина объясняется тем, что он не оказывает значительного влияния на увеличение модулирующего эффекта на восстановление морфологического субстрата ККМ, селезенки и печени. Это видно при сравнении морфологической картины тканей исследуемых органов животных пятой и девятой групп. Отсутствие значительного увеличения модулирующего эффекта на увеличение уровня антикоагулянтов и снижение уровня коагулянтов в организме с экспериментальной гипоплазией ККМ при добавлении третьего модулирующего фактора в виде ЭМИ КВЧ указывает на то, что в условиях практически полного восстановления показателей системы РАСК в организме с экспериментальной гипоплазией ККМ стимулирующее действие ЭМИ КВЧ на активацию антиоксидантных систем прекращается.

При сравнении модулирующего эффекта в изучаемых группах животных обращает на себя внимание практически полное восстановление тканей ККМ, селезенки и печени, которое произошло у животных пятой и девятой групп, что объясняется сильным модулирующим эффектом ЭМИ КВЧ на пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток. Вследствие того, что у животных пятой группы восстановление клеточного субстрата произошло до уровня, близкого к показателям контрольной группы, добавление фитомеланина у животных девятой группы не привело к каким-либо изменениям морфологической картины исследуемых органов. У животных восьмой группы произошло значительное восстановление ККМ, селезенки и печени, но меньшее, чем в пятой и девятой группах. В отличие от крыс пятой и девятой групп, где один из модулирующих факторов (ЭМИ КВЧ) оказал сильное воздействие на другой (стволовые клетки) у крыс восьмой группы восстановление клеточного субстрата обусловлено лишь суммой самостоятельно

действующих модулирующих эффектов двух факторов – СК и фитомеланина. У животных седьмой группы, которые подверглись сочетанному действию фитомеланина и ЭМИ КВЧ, уровень восстановления КKM, селезенки и печени оказался наименьшим в сравнении с другими группами, где использовалось сочетанное действие факторов, одним из которых являлись СК. Небольшое увеличение модулирующего эффекта сочетанного действия ЭМИ КВЧ и фитомеланина относительно изолированного применения фитомеланина обусловлено модулирующим действием ЭМИ КВЧ на биохимический обмен фитомеланина.

Наибольшее восстановление уровня процессов СРО произошло у животных пятой, восьмой и девятой групп. Показатели оксидантов и антиоксидантов у крыс этих групп почти приближаются к контрольным значениям. У животных восьмой группы восстановление уровня процессов СРО объясняется суммарным действием СК (через восстановление клеточного субстрата) и фитомеланина (прямое действие на активацию антиоксидантных систем и участие в восстановлении клеток в результате стабилизации клеточных мембран). У животных пятой группы в результате модулирующего влияния ЭМИ КВЧ на пролиферацию и дифференцировку СК произошло почти полное восстановление КKM, селезенки и печени, поэтому показатели СРО так же приближаются к контрольным, кроме того, ЭМИ КВЧ в организме с экспериментальной гипоплазией КKM оказывает и прямое действие на активацию антиоксидантных систем. У крыс девятой группы по сравнению с крысами пятой и восьмой групп отсутствие значительного увеличения модулирующего эффекта на увеличение уровня антиоксидантов и снижение уровня оксидантов при добавлении третьего модулирующего фактора в виде ЭМИ КВЧ или фитомеланина объясняется тем, что в избыточном количестве антиоксиданты могут сами начать проявлять прооксидантную активность. У животных седьмой группы вследствие сохранения признаков гипоплазии в тканях КKM, селезенки и печени, прямой активации антиоксидантных систем под действием фитомеланина и ЭМИ КВЧ оказалось недостаточно для значительного восстановления уровня процессов СРО. Суммарное антиоксидантное действие ЭМИ КВЧ и фитомеланина не повлияло на увеличение модулирующего эффекта, так как в избыточном количе-

стве антиоксиданты могут сами начать проявлять прооксидантную активность, а опосредованного воздействия через восстановление клеток (что наблюдалось у животных с введенными СК) у крыс седьмой группы не было.

Наибольшее восстановление показателей системы РАСК произошло у животных пятой, восьмой и девятой групп. Показатели коагулянтов и антикоагулянтов у крыс этих групп почти приближаются к контрольным значениям. У животных восьмой группы восстановление показателей системы РАСК объясняется суммой самостоятельных эффектов СК и фитомеланина (через стабилизацию процессов СРО и, как следствие, клеточных мембран) на восстановление ККМ, селезенки и печени; у животных пятой и девятой групп – почти полным восстановлением клеточного субстрата исследуемых тканей вследствие сильного модулирующего действия ЭМИ КВЧ на пролиферацию и дифференцировку СК. У крыс девятой группы по сравнению с крысами пятой и восьмой групп не произошло значительного увеличения модулирующего эффекта на увеличение уровня антикоагулянтов и снижение уровня коагулянтов при добавлении третьего модулирующего фактора в виде ЭМИ КВЧ или фитомеланина. Добавление фитомеланина (у животных девятой группы относительно пятой) не способствовало увеличению активности антикоагулянтов, так как действие фитомеланина на антикоагулянты – опосредованное, через стабилизацию клеточных мембран, благодаря снижению уровня процессов СРО, а у животных пятой группы уже произошло почти полное восстановление клеток. Отсутствие эффекта на увеличение активности антикоагулянтов от добавления ЭМИ КВЧ (у животных девятой группы относительно восьмой) дает возможность сделать вывод о блокировании модулирующего действия ЭМИ КВЧ на антикоагулянтные системы при восстановлении показателей системы РАСК до контрольных значений в организме с экспериментальной гипоплазией ККМ. У животных седьмой группы вследствие сохранения признаков гипоплазии в тканях ККМ, селезенки и печени суммарного воздействия фитомеланина (через регуляцию процессов СРО) и ЭМИ КВЧ (непосредственная активация антикоагулянтных систем) оказалось недостаточно для значительного восстановления показателей системы РАСК.

5. Изучение стволовых клеток, индуцированных в кардиогенном направлении

Работа выполнялась в рамках государственного контракта и была направлена на получение альтернативного источника СК для использования в последующем в восстановительной и реабилитационной медицине, в частности, у больных с хроническим повреждением миокарда. Мы выполняли работу со СК, полученными из *менструальной крови* (МенСК). Учитывая выраженную инвазивность способов и методов получения МенСК в настоящее время, нами было спроектирован и создан опытный образец устройства для сбора клеточных фракций из менструальной крови, был получен патент № 93268 от 27 апреля 2010. Данное устройство позволяет неинвазивно получить клеточный материал для выделения в последующем при культуральных работах *эндометриальных* СК.

Работа была проведена на добровольных донорах. Доноры: женщины от 20 до 30 лет, здоровые (без хронических заболеваний сердца, печени, почек и поджелудочной железы). Общее количество доноров составило 9 человек. Перед получением биологического материала кровь доноров проверяли на наличие антител к *HIV-1*, *HIV-2*, гепатиту В, гепатиту С, *VDRL*, вирусу папилломы и трипаносомам.

Анализ образцов проводили при помощи проточного цитометра *FACScalibur* (*BD Biosciences*) с программным обеспечением *CellQuest*.

Фенотип популяции СКЭ не изменился в процессе культивирования после 2,4 и 8 пассажей и оставался стабильным на всех пассажах. Фенотип популяции СКЭ был определён как *CD11b⁻*, *CD14⁻*, *CD34⁻*, *CD45⁻*, *CD44⁺*, *CD79⁺*, *CD90⁺*, *CD105⁺*.

В результате работ были получены убедительные данные о выраженной дифференцировке СК эндометрия в *адипогенном*, *остеогенном*, *миогенном* и, в частности, *кардиомиогенном* направлении. Эти данные свидетельствуют о высоком дифференцировочном потенциале СК эндометрия.

Используя методику иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител, определяли наличие нестина, виментина, гладкомышечного альфа-актина в колониях СК эндометрия

до 8 пассажа. Полученные результаты говорят о высокой экспрессии данных белков, что свидетельствует о направленной дифференцировке СК эндометрия в кардиомиогенном направлении и сохранении потенциала клеток.

В активно пролиферирующих культурах клеток есть риск возникновения *анеуплоидий хромосом* (изменения числа копий последовательностей ДНК). Это может привести к развитию мутации в клеточной популяции или трансформации клеток с нормальным фенотипом в раковые клетки. Наличие *анеуплоидий* проверяли методом сравнительной геномной гибридизации. Результаты компьютерного анализа реакции гибридизации тестируемой и контрольной ДНК с хромосомами метафазной пластинки периферийных лимфоцитов исключили возникновение числового нарушения хромосом в исследуемом образце.

Для подтверждения результатов исследования были выполнены работы на лабораторных животных. Цель исследования заключалась в оценке эффективности клеточного трансплантата СК *эндометрия, индуцированных в кардиогенном направлении* (СКЭ-К) при однократном введении в сердце через 30 суток после перенесённого острого инфаркта миокарда у самцов крыс CD для экспериментального обоснования применения этих клеток при восстановительном лечении травматических и дегенеративных заболеваний миокарда в клинической практике.

Смертность животных была одинаковой в группах после введения физиологического раствора или СКЭ-К (4 животных из 16 и 3 животных из 15, соответственно). Проявление внешних клинических признаков боли и дистресса у инфарктных животных отмечалось в меньшем количестве случаев ко 2-ой неделе после введения СКЭ-К по сравнению с контрольной группой (24 % и 50 %, соответственно). Значения массы тела и толерантность к физической нагрузке животных контрольной и опытной групп в ходе исследования достоверно не отличались.

После введения СКЭ-К клеток по сравнению с контрольной группой был отмечен более высокий уровень среднего АД (через 2 недели, 88 мм рт.ст и 79 мм рт.ст, соответственно) и ЧСС (через 4 недели, 265 уд/мин и 216 уд/мин), а также более высокое значение максимального давления в левом желудочке (136 мм рт.ст. относительно 116 мм рт.ст.). Значения индексов контрактильности

миокарда между группами, получавшими физиологический раствор или СКЭ-К, достоверно не отличались. Однако, скорость прироста давления в левом желудочке ($+dp/dt$) увеличивалась только после введения СКЭ-К по сравнению со значением до введения на 30-й день после инфаркта, что является косвенным фактом восстановления инотропной функции сердца.

Анализ ЭКГ показал, что через 2 недели после введения СКЭ-К по сравнению с контрольной группой увеличивалась амплитуда зубца Р, что связано, вероятно, с развитием лёгочной гипертензии, а через 4 недели наблюдалось уменьшение продолжительности зубца Т, что расценивалось как уменьшение зоны ишемии.

Флюоресцентно меченые СКЭ-К выявлялись в 49 % в миокарде, в 47 % – в селезёнке, в 3 % – в печени, 1 % – в лёгких. Через 2 и 4 недели после трансплантации отмечали одинаковое распределение клеток в органах. В селезёнке, печени и лёгких СКЭ-К выявляли равномерно по всем органам, в сердце клетки локализовались только в области рубцовой ткани, не входили в состав стенок кровеносных сосудов, соединительной ткани, и обнаруживались в непосредственной близости от кардиомиоцитов перифокальной зоны или нормального миокарда. Трансплантация клеток не приводила к уменьшению размера рубца, не изменяла скорость и степень ремоделирования левого желудочка, но приводила к утолщению стенки сердца в области рубца (48,9 % относительно 37,2 % через 2 недели и 29,5 % относительно 27,0 % через 4 недели после введения).

В печени, легких и селезёнке были выявлены умеренные морфологические признаки застойной сердечной недостаточности, которые можно рассматривать как реактивные, в рамках постинфарктного кардиосклероза. Других патологических признаков, очагов воспаления, очагов фиброза, образования оссификатов или опухолевых образований в исследованных органах выявлено не было.

Можно утверждать, что трансплантированные СКЭ-К мигрировали и выживали в исследуемых органах в течение одного месяца, не дифференцировались в клетки кровеносных сосудов и, предположительно, дифференцировались в *кардиомиоциты* и *фибробласты*, и участвуя в формировании рубца.

Таким образом, результаты данного исследования с использованием крысиной модели постинфарктного кардиосклероза демонстрируют, что метод трансвентрикулярной интракоронарной трансплантации СК эндометрия, индуцированных в *кардио-генном* направлении является эффективным, обеспечивает доставку клеток в область повреждения. Трансплантированные клетки предположительно дифференцируются в *кардиомиоциты, фибробласты* и участвуют в формировании рубца в зоне инфарктного повреждения миокарда; при этом наблюдается улучшение функциональных показателей сердечно-сосудистой системы. Однократное интракоронарное введение СКЭ-К клеток крысам CD в дозе 25 млн. кл/кг не вызывает патологических изменений гистоструктуры печени, легких и селезёнки.

В результате работы разработан пошаговый протокол криоконсервации полученных культур СК эндометрия. Разработан оптимальный алгоритм криоконсервации, позволяющий максимально сохранить жизнеспособность клеток.

Произведена оценка свойств СКЭ после реконсервации по разработанному протоколу криоконсервации. Было получены результаты сохранения жизнеспособности выше 95 %, что говорит о качественном алгоритме криоконсервации культур клеток.

На основании полученных данных была произведена разработка технологического регламента по культивированию и получению клеток направленной дифференцировки из СКЭ. Пошаговый протокол позволяет воспроизвести полученные результаты в направленной дифференцировке СК эндометрия.

Данная работа была выполнена в рамках государственного контракта № 02.512.12.2058 от 22 мая 2009 года.

ГЛАВА IV

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ПОМОЩИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО АППАРАТА

1. Изучение зависимостей между уровнями оксидантов и антиоксидантов при применении фитомеланина, ЭМИ КВЧ и стволовых клеток, действующих как модулирующие факторы

Проведен сравнительный корреляционный анализ показателей свободно-радикального окисления, полученных у всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ (Е) относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся воздействию ЭМИ КВЧ (-Е), и определим, как влияет на зависимость между показателями СРО воздействие ЭМИ КВЧ.

Во всех рассматриваемых ниже таблицах (табл. 9-31) выделены высокие коэффициенты корреляции (не ниже 0,80), которые указывают на сильную линейную зависимость между показателями. Все коэффициенты корреляции в таблицах имеют уровень значимости $p < 0,05$, который указывает на то, что вероятность ошибки не превосходит 5 %.

В табл. 9 приведены коэффициенты корреляции для животных, которые не подвергались воздействию ЭМИ КВЧ. Из 10 коэффициентов, приведённых в табл. 9, семь – превосходят значение 0,8, следовательно, между показателями СРО в данной группе существует сильная линейная зависимость.

Наиболее сильная зависимость наблюдается между антиокислительной активностью плазмы и активностью каталазы (0,96). Для данных показателей было также получено уравнение регрессии, выражающее значения антиокислительной активностью плазмы (*АА плазмы*) через значения активности каталазы (*каталаза*):

$$АА\ плазмы = 12,14408 + 0,78645 * каталаза.$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен 0,92694, что указывает на её высокую точность. Все коэффициенты регрессии имеют уровень значимости $p < 0,000001$.

Таблица 9

Коэффициенты корреляции для показателей СРО, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся воздействию ЭМИ КВЧ

Показатели	1	2	3	4	5
Гидроперекиси липидов (1)	1,00	0,91	-0,93	-0,93	-0,78
Малоновый диальдегид (2)	0,91	1,00	-0,89	-0,89	-0,74
АА плазмы (3)	-0,93	-0,89	1,00	0,96	0,75
Активность каталазы (4)	-0,93	-0,89	0,96	1,00	0,84
Супероксид-дисмутаза (5)	-0,78	-0,74	0,75	0,84	1,00

Высокие коэффициенты корреляции получены также для значений гидроперекисей липидов и таких показателей, как малоновый диальдегид (0,91), антиокислительная активность плазмы (-0,93) и активность каталазы (-0,93).

Корреляционная матрица для животных, подвергавшихся воздействию ЭМИ КВЧ (табл. 10), содержит 6 коэффициентов корреляции, превышающих 0,8, что также указывает на наличие сильной линейной зависимости между показателями СРО.

Таблица 10

Коэффициенты корреляции для показателей СРО, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ

Показатели	1	2	3	4	5
Гидроперекиси липидов (1)	1,00	0,85	-0,97	-0,93	-0,71
Малоновый диальдегид (2)	0,85	1,00	-0,91	-0,88	-0,70
АА плазмы (3)	-0,97	-0,91	1,00	0,97	0,75
Активность каталазы (4)	-0,93	-0,88	0,97	1,00	0,77
Супероксид-дисмутаза (5)	-0,71	-0,70	0,75	0,77	1,00

Наибольшие коэффициенты корреляции, как и в рассмотренной выше группе, получены между антиокислительной активностью плазмы и активностью каталазы (0,97), гидроперекисями липидов и антиокислительной активностью плазмы (-0,97), гидроперекисями липидов и активностью каталазы (-0,93).

Регрессионная модель зависимости антиокислительной активности плазмы (*АА плазмы*) от гидроперекисей липидов (*ГП липидов*) имеет следующий вид:

$$АА\ плазмы = 31,97439 - 5,62204 * ГП\ липидов.$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен 0,94121, что указывает на её высокую точность. Также высокую прогнозную точность даёт уравнение регрессии, выражающее зависимость антиокислительной активности плазмы (*АА плазмы*) от активности каталазы (*каталаза*):

$$АА\ плазмы = 11,46971 + 0,84423 * каталаза.$$

Здесь коэффициент детерминации равен 0,94270, а коэффициент корреляции $R=0,97092$ ($p<0,00001$).

Более точная регрессионная модель получена для всех перечисленных показателей. Это модель зависимости антиокислительной активности плазмы (*АА плазмы*) от гидроперекисей липидов (*ГП липидов*) и от активности каталазы (*каталаза*):

$$АА\ плазмы = 21,62444 - 2,87615 * ГП\ липидов + 0,44153 * каталаза.$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен 0,97454. Коэффициент корреляции, $R=0,98719$ ($p<0,00001$), указывает на наличие сильной зависимости антиокислительной активности плазмы от перечисленных выше показателей. Поверхность регрессии данной модели изображена на рис. 30.

Проведём сравнительный корреляционный анализ для показателей свободно-радикального окисления, полученных у всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению фитомеланина (Р) относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению фитомеланина (-Р), и определим, как влияет на зависимость между показателями СРО введение фитомеланина.

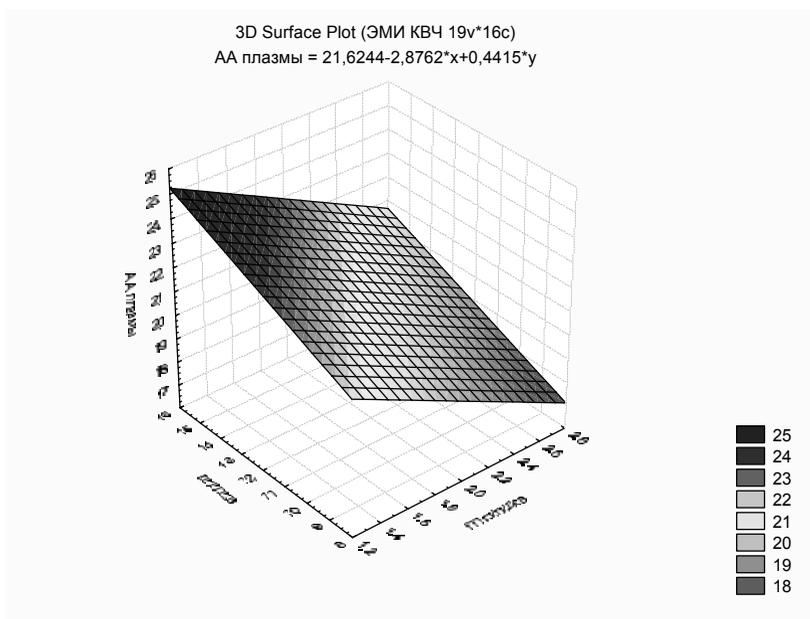


Рис. 30. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя антиокислительной активности плазмы в зависимости от гидроперекисей липидов и активности каталазы

Таблица 11

**Коэффициенты корреляции для показателей СРО,
 полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ,
 не подвергавшихся введению фитомеланина**

Показатели	1	2	3	4	5
Гидроперекиси липидов (1)	1,00	0,93	-0,95	-0,97	-0,89
Малоновый диальдегид (2)	0,93	1,00	-0,92	-0,92	-0,79
AA плазмы (3)	-0,95	-0,92	1,00	0,97	0,81
Активность каталазы (4)	-0,97	-0,92	0,97	1,00	0,86
Супероксид-дисмутаза (5)	-0,89	-0,79	0,81	0,86	1,00

В группе, которая не подвергалась введению фитомеланина, почти все коэффициенты корреляции (9 из 10) превосходят 0,8 (табл. 11). Как и в рассмотренных выше группах, наибольшие коэффициенты получены для гидроперекисей липидов и антиокислительной активности плазмы (-0,95), гидроперекисей липидов и активности каталазы (-0,97). Кроме того, наиболее сильная линейная зависимость наблюдается между такими показателями, как антиокислительная активность плазмы и активность каталазы (-0,97).

Получено уравнение регрессии, выражающее значения активности каталазы (*каталаза*) через значения антиокислительной активности плазмы (*АА плазмы*):

$$\text{каталаза} = -11,5584 + 1,0815 * \text{АА плазмы.}$$

Эта модель обладает высокой прогнозной точностью. Доля «объясненной» дисперсии для неё составляет 93,572 %. Высокую прогнозную точность дает также регрессионная модель зависимости активности каталазы (*каталаза*) от гидроперекисей липидов (*ГП липидов*):

$$\text{каталаза} = 20,98154 - 4,83535 * \text{ГП липидов.}$$

Коэффициент корреляции $R=0,96657$ ($p<0,00001$) так же, как и для рассмотренной выше модели, указывает на наличие сильной линейной зависимости активности каталазы от гидроперекисей липидов. Доля «объяснённой» дисперсии составляет 93,426 %.

Коэффициенты корреляции для показателей СРО, полученных у животных, которым не вводили фитомеланин, приведены в табл. 12. Существенных отличий от группы, не подвергавшейся введению фитомеланина, здесь не наблюдается. Наибольшие коэффициенты корреляции получены для тех же показателей: гидроперекиси липидов и антиокислительная активность плазмы (-0,94), гидроперекиси липидов и активность каталазы (-0,94), антиокислительная активность плазмы и активность каталазы (0,97). Значения коэффициентов корреляции в табл. 12 не много ниже, чем в табл. 11.

Для данной группы также получена регрессионная модель зависимости активности каталазы (*каталаза*) от антиоксидательной активности плазмы (*АА плазмы*):

$$\text{каталаза} = -15,2046 + 1,2550 * \text{АА плазмы.}$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен 0,93857, что указывает на её высокую точность. Коэффициент корреляции, $R=0,96880$ ($p<0,00001$), указывает на наличие сильной зависимости между рассматриваемыми показателями.

Таблица 12

Коэффициенты корреляции для показателей СРО, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению фитомеланина

Показатели	1	2	3	4	5
Гидроперекиси липидов (1)	1,00	0,84	-0,94	-0,94	-0,79
Малоновый диальдегид (2)	0,84	1,00	-0,87	-0,87	-0,84
АА плазмы (3)	-0,94	-0,87	1,00	0,97	0,79
Активность каталазы (4)	-0,94	-0,87	0,97	1,00	0,82
Супероксид-дисмутаза (5)	-0,79	-0,84	0,79	0,82	1,00

Проведен сравнительный корреляционный анализ для показателей свободно-радикального окисления, полученных у всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению СК (S) относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению СК (-S), и определим, как влияет на зависимость между показателями СРО введение СК.

Значимые коэффициенты корреляции для группы, не подвергавшейся введению СК (табл. 13) сравнимы с коэффициентами корреляции, полученными для группы, подвергавшейся введению СК (табл. 14). Табл. 13 содержит 5 коэффициентов корреляции, превышающих 0,8, а табл. 14 содержит 3 таких коэффициента. Эти коэффициенты немного ниже, чем соответствующие коэффициенты, представленные в табл. 9-12.

Сильная линейная зависимость в двух данных группах, как и во всех остальных, наблюдается между значениями гидроперекисей липидов и антиокислительной активностью плазмы. В группе, в которой животным были введены СК, коэффициент корреляции между этими показателями равен -0,93, а в группе, где животным ствольные клетки не вводились, соответствующий коэффициент корреляции равен -0,89. Кроме того, в показателях СРО, полученных у животных, подвергшихся введению СК, наблюдается сильная зависимость между антиокислительной активностью плазмы и активностью каталазы (0,93).

Очень низкие коэффициенты корреляции были получены для ряда показателей, полученных у животных, которым не вводились СК. Это коэффициенты зависимости супероксиддисмутазы от малонового диальдегида, антиокислительной активности плазмы и активности каталазы. Они не являются значимыми и не включены в табл. 13.

Таким образом, воздействие рассмотренных выше факторов: воздействие ЭМИ КВЧ, введение СК и введение фитомеланина животным с экспериментальной гипоплазией КKM не оказывает существенного влияния на зависимость между показателями СРО.

Таблица 13

Коэффициенты корреляции для показателей СРО, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией КKM, не подвергавшихся введению ствольных клеток

Показатели	1	2	3	4	5
Гидроперекиси липидов (1)	1,00	0,86	-0,89	-0,86	-0,59
Малоновый диальдегид (2)	0,86	1,00	-0,88	-0,86	-
АА плазмы (3)	-0,89	-0,88	1,00	0,74	-
Активность каталазы (4)	-0,86	-0,86	0,74	1,00	-
Супероксид-дисмутазы (5)	-0,59	-	-	-	1,00

Проведен сравнительный корреляционный анализ для показателей свободно-радикального окисления, полученных у всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, подвергшихся сочетанному воздействию СК и ЭМИ КВЧ (S+E), соче-

танному воздействию СК и фитомеланина (S+P) и сочетанному воздействию фитомеланина и ЭМИ КВЧ (P+E).

Таблица 14

Коэффициенты корреляции для показателей СРО, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению стволовых клеток

Показатели	1	2	3	4	5
Гидроперекиси липидов (1)	1,00	0,58	-0,93	-0,90	-0,55
Малоновый диальдегид (2)	0,58	1,00	-0,53	-0,51	-0,52
АА плазмы (3)	-0,93	-0,53	1,00	0,93	0,52
Активность каталазы (4)	-0,90	-0,51	0,93	1,00	0,61
Супероксид-дисмутаза (5)	-0,55	-0,52	0,52	0,61	1,00

Введение СК в сочетании с воздействием ЭМИ КВЧ, а также одновременное введение СК и фитомеланина оказывает существенное влияние на зависимость между показателями СРО. Все коэффициенты корреляции, полученные для показателей СРО в этих двух группах, являются низкими, что указывает на слабую зависимость между данными показателями. Исключение составляет группа, которая подвергалась воздействию ЭМИ КВЧ и введению фитомеланина (табл. 15).

Таблица 15

Коэффициенты корреляции для показателей СРО, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся сочетанному воздействию ЭМИ КВЧ и фитомеланина

Показатели	1	2	3	4	5
Гидроперекиси липидов (1)	1,00	0,77	-0,96	-0,98	-0,80
Малоновый диальдегид (2)	0,77	1,00	-0,90	-0,84	-0,79
АА плазмы (3)	-0,96	-0,90	1,00	0,99	0,85
Активность каталазы (4)	-0,98	-0,84	0,99	1,00	0,83
Супероксид-дисмутаза (5)	-0,80	-0,79	0,85	0,83	1,00

Здесь, как и в рассмотренных ранее группах (S, E, P, -S, -E, -P), наблюдается сильная линейная зависимость между показателями СРО. Из 10 коэффициентов корреляции 8 превосходят 0,8 (табл. 15). Наибольшие коэффициенты, как и в группах S, E, P, -S, -E, -P, получены для гидроперекисей липидов и антиокислительной активности плазмы (-0,96), гидроперекисей липидов и активности каталазы (-0,98), антиокислительной активности плазмы и активности каталазы (0,99).

Для данной группы также получена регрессионная модель зависимости между активностью каталазы (*каталаза*) и антиокислительной активностью плазмы (*АА плазмы*):

$$\text{каталаза} = -17,6047 + 1,3600 * \text{АА плазмы}.$$

Эта модель обладает высокой прогнозной точностью. Она описывает 97,287 % дисперсии зависимой переменной. Высокую прогнозную точность дает также регрессионная модель зависимости активности каталазы (*каталаза*) от гидроперекисей липидов (*ГП липидов*):

$$\text{каталаза} = 28,00511 - 8,84683 * \text{ГП липидов}.$$

Коэффициент корреляции $R=0,97922$ ($p<0,00002$) так же, как и для рассмотренной выше модели, указывает на наличие сильной линейной зависимости активности каталазы от гидроперекисей липидов. Доля «объяснённой» дисперсии составляет 95,886 %.

Таким образом, только введение СК в сочетании с облучением ЭМИ КВЧ или введением фитомеланина оказывает существенное влияние на зависимость между показателями СРО в организме с экспериментальной гипоплазией ККМ, ослабляя эту зависимость.

2. Изучение зависимостей между уровнями коагулянтов и антикоагулянтов при применении стволовых клеток, фитомеланина и ЭМИ КВЧ, действующих как модулирующие факторы

Проведен сравнительный корреляционный анализ для показателей системы регуляции агрегатного состояния крови, полу-

ченных у всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ (Е) относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся воздействию ЭМИ КВЧ (-Е), и определено, как влияет на зависимость между показателями системы РАСК воздействие ЭМИ КВЧ.

Корреляционная матрица для показателей коагулянтов и антикоагулянтов, полученных у животных, которые не подвергались облучению ЭМИ КВЧ (табл. 16) содержит 45 коэффициентов корреляции. Из них 31 коэффициент принимает значения, превышающие 0,8. Так, для показателей, отражающих активность коагулянтов, 3 коэффициента корреляции из 6 принимают значения, превышающие 0,8. Наиболее сильная линейная зависимость наблюдается между концентрацией фибриногена и временем свёртывания крови (0,99), а также между концентрацией фибриногена и временем рекальцификации (0,94). Регрессионная модель, выражающая зависимость времени свёртывания крови t свёрт.крови от концентрации фибриногена (*фибриноген*) имеет вид

$$t \text{ свёрт.крови} = -117,864 + 24,018 * \text{фибриноген.}$$

Она описывает 97,076 % дисперсии зависимой переменной и обладает высокой прогнозной точностью.

Из 15 коэффициентов корреляции, характеризующих зависимость между показателями, отражающими активность антикоагулянтов, 11 коэффициентов принимают значения, большие 0,8, что указывает на наличие сильной линейной зависимости между данными показателями. При этом наиболее сильная зависимость была получена для активности плазмينا и активности антитромбина III, коэффициент корреляции между этими показателями равен 0,97. Для данных показателей получено уравнение регрессии

$$\text{антитромбин} = 55,52978 + 3,74305 * \text{плазмин.}$$

Эта модель обладает высокой точностью прогноза, коэффициент детерминации для неё составляет 0,93632.

Таблица 16
Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся воздействию ЭМИ КВЧ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт. крови (1)	1,00	0,93	0,99	-0,78	-0,89	0,97	0,95	0,97	-0,79	-0,87
t рекальциф. (2)	0,93	1,00	0,94	-0,58	-0,73	0,87	0,89	0,94	-0,57	-0,73
Фибриноген (3)	0,99	0,94	1,00	-0,71	-0,88	0,95	0,97	0,99	-0,73	-0,79
Фибрин (4)	-0,78	-0,58	-0,71	1,00	0,85	-0,80	-0,67	-0,69	0,89	0,94
ПДФ (5)	-0,89	-0,73	-0,88	0,85	1,00	-0,89	-0,88	-0,86	0,88	0,82
Гепарин (6)	0,97	0,87	0,95	-0,80	-0,89	1,00	0,95	0,93	-0,80	-0,86
Антитромбин Ш (7)	0,95	0,89	0,97	-0,67	-0,88	0,95	1,00	0,97	-0,70	-0,72
Плазмин (8)	0,97	0,94	0,99	-0,69	-0,86	0,93	0,97	1,00	-0,69	-0,76
α_2 -макро-глобулин (9)	-0,79	-0,57	-0,73	0,89	0,88	-0,80	-0,70	-0,69	1,00	0,85
α_1 -антитрипсин (10)	-0,87	-0,73	-0,79	0,94	0,82	-0,86	-0,72	-0,76	0,85	1,00

Высокими являются также коэффициенты корреляции значений концентрации гепарина с активностью антитромбина III (0,95) и с активностью плазмينا (0,93). Перечисленные выше показатели связывает регрессионная модель, выражающая значения активности антитромбина-III через значения концентрации гепарина и активности плазмина

$$\text{антитромбин} = 56,74030 + 22,60554 * \text{гепарин} + 2,45974 * \text{плазмин}.$$

Коэффициент корреляции для данной модели $R=0,97665$ ($p<0,00001$), что указывает на сильную зависимость между перечисленными показателями. Модель описывает 95,384 % дисперсии зависимой переменной. Поверхность регрессии данной модели изображена на рис. 31.

Рассматривая коэффициенты корреляции, отражающие взаимосвязь между коагулянтами и антикоагулянтами, получаем, что высокими являются 17 коэффициентов из 24. При этом наибольший коэффициент был получен для таких показателей, как активность плазмينا и концентрация фибриногена (0,99). Уравнение регрессии для этих показателей имеет вид

$$\text{фибриноген} = 4,749893 + 0,542106 * \text{плазмин}.$$

Доля «объяснённой» дисперсии для данной модели составляет 98,007 %, что указывает на её высокую точность.

Коэффициент корреляции, характеризующий связь времени свёртывания крови с концентрацией гепарина, составил 0,97, с активностью антитромбина III 0,95, с активностью плазмينا 0,97. Коэффициент, характеризующий зависимость концентрации фибриногена от концентрации гепарина, составил 0,95, от активности антитромбина III 0,97. Все эти коэффициенты указывают на сильную взаимозависимость между рассмотренными показателями.

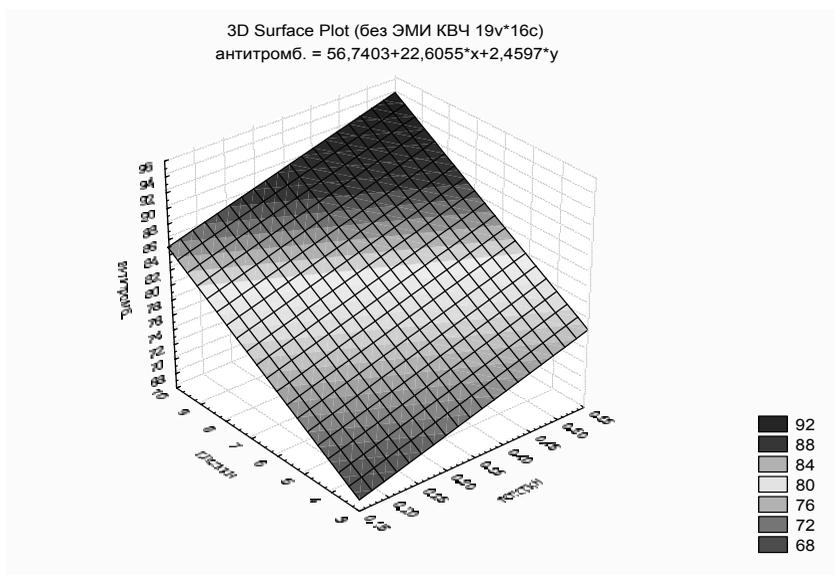


Рис. 31. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя антитромбин, в зависимости от концентрации гепарина и активности плазмينا

В группе животных, подвергшихся облучению ЭМИ КВЧ, наблюдается более сильная зависимость между показателями, отражающими активность коагулянтов, по сравнению с группой, которая не подвергалась воздействию ЭМИ КВЧ (табл. 17). Так, из 6 коэффициентов корреляции, отражающих активность коагулянтов, 5 коэффициентов превышают 0,8, что указывает на наличие сильной линейной взаимосвязи. Наибольшее значение среди них имеет коэффициент корреляции между временем свёртывания крови и концентрацией фибриногена (0,98). Для данных показателей получено уравнение регрессии

$$t_{\text{свёрт. крови}} = -114,041 + 23,652 * \text{фибриноген.}$$

Эта модель обладает высокой точностью прогноза, коэффициент детерминации для неё составляет 0,95227.

Таблица 17

Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ

Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт. крови (1)	1,00	0,89	0,98	-0,87	-0,90	0,97	0,97	0,99	-0,87	-0,81
t рекальциф. (2)	0,89	1,00	0,92	-0,78	-0,71	0,87	0,90	0,88	-0,66	-0,68
Фибриноген (3)	0,98	0,92	1,00	-0,84	-0,88	0,97	0,99	0,98	-0,86	-0,81
Фибрин (4)	-0,87	-0,78	-0,84	1,00	0,92	-0,82	-0,84	-0,86	0,86	0,88
ПДФ (5)	-0,90	-0,71	-0,88	0,92	1,00	-0,87	-0,88	-0,91	0,96	0,92
Гепарин (6)	0,97	0,87	0,97	-0,82	-0,87	1,00	0,95	0,98	-0,81	-0,80
Антитромбин III (7)	0,97	0,90	0,99	-0,84	-0,88	0,95	1,00	0,98	-0,83	-0,80
Плазмин (8)	0,99	0,88	0,98	-0,86	-0,91	0,98	0,98	1,00	-0,85	-0,81
α_2 -макроглобулин (9)	-0,87	-0,66	-0,86	0,86	0,96	-0,81	-0,83	-0,85	1,00	0,90
α_1 --антитрипсин (10)	-0,81	-0,68	-0,81	0,88	0,92	-0,80	-0,80	-0,81	0,90	1,00

Для данной группы наблюдается также более сильная зависимость между показателями, отражающими активность антикоагулянтов, по сравнению с рассмотренной выше группой. Все 15 коэффициентов корреляции, характеризующих зависимость между показателями, отражающими активность антикоагулянтов в этой группе, являются значимыми и превосходят 0,8. Наибольшими из них являются коэффициенты корреляции для активности антитромбина III и активности плазмينا (0,98), для концентрации гепарина и активности плазмينا (0,98).

Высокую точность даёт уравнение регрессии, описывающее зависимость активности плазмينا от концентрации гепарина и активности антитромбина III

$$\text{плазмин} = -4,96651 + 7,93533 * \text{гепарин} + 0,11362 * \text{антитромбин.}$$

Коэффициент корреляции для данной регрессионной модели $R=0,99199$ ($p<0,00001$). Доля «объяснённой» дисперсии составляет 98,404 %, что также указывает на высокую точность модели. Её поверхность регрессии изображена на рис. 32.

Среди коэффициентов корреляции, отражающих взаимосвязь между коагулянтами и антикоагулянтами, 21 коэффициент из 24 превышает 0,8. При этом наибольшие коэффициенты были получены для времени свертывания крови и активности плазмينا (0,99), для концентрации фибриногена и активности антитромбина III (0,99), а также для концентрации фибриногена и активности плазмينا (0,98). Уравнения регрессии, полученные для наиболее сильных зависимостей между временем свертывания крови и активностью плазмينا, а также между концентрацией фибриногена и активностью антитромбина III имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} \text{плазмин} &= 0,689558 + 0,072273 * t \text{ свёрт. крови;} \\ \text{фибриноген} &= -2,24750 + 0,13301 * \text{антитромбин.} \end{aligned}$$

Доля «объяснённой» дисперсии для первой модели составляет 98,228 %, а для второй 97,369 %, что указывает на их высокую точность.

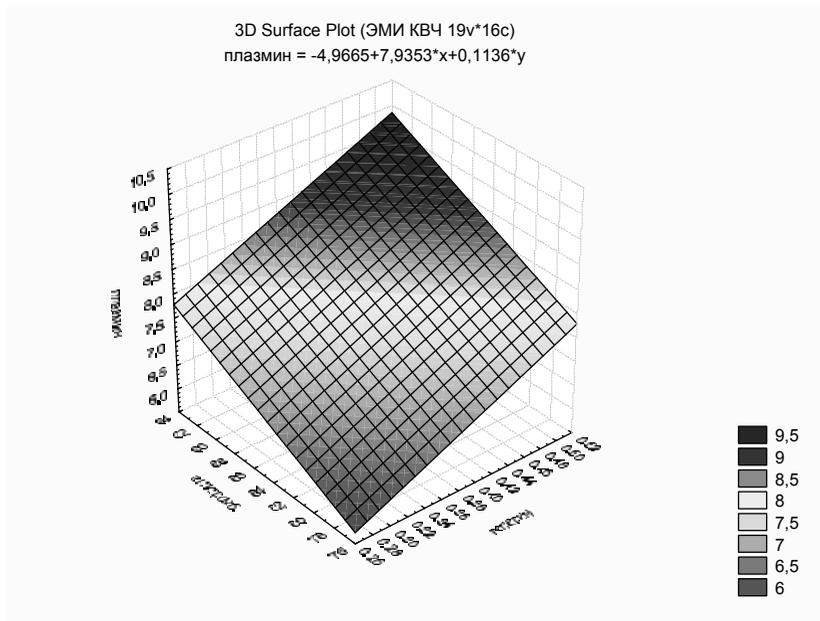


Рис. 32. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *плазмин*, в зависимости от концентрации гепарина и активности антитромбина III

Таким образом, воздействие ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM оказывает существенное влияние на корреляционную зависимость между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов, усиливая эту зависимость.

Проведен сравнительный корреляционный анализ для показателей системы PACEK, полученных у всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, подвергшихся введению фитомеланина (P) относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, не подвергавшихся введению фитомеланина (-P), и определено, как влияет на зависимость между показателями системы PACEK введение фитомеланина.

Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению фитомеланина

Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт. крови (1)	1,00	0,90	0,98	-0,84	-0,90	0,97	0,94	0,97	-0,76	-0,86
t рекальциф. (2)	0,90	1,00	0,93	-0,64	-0,65	0,83	0,88	0,92	-0,46	-0,68
Фибриноген (3)	0,98	0,93	1,00	-0,76	-0,85	0,94	0,97	0,99	-0,66	-0,78
Фибрин (4)	-0,84	-0,64	-0,76	1,00	0,87	-0,85	-0,70	-0,72	0,93	0,95
ПДФ (5)	-0,90	-0,65	-0,85	0,87	1,00	-0,89	-0,79	-0,84	0,91	0,85
Гепарин (6)	0,97	0,83	0,94	-0,85	-0,89	1,00	0,94	0,94	-0,78	-0,83
Антитромбин III (7)	0,94	0,88	0,97	-0,70	-0,79	0,94	1,00	0,97	-0,58	-0,69
Плазмин (8)	0,97	0,92	0,99	-0,72	-0,84	0,94	0,97	1,00	-0,63	-0,74
α_2 -макроглобулин (9)	-0,76	-0,46	-0,66	0,93	0,91	-0,78	-0,58	-0,63	1,00	0,92
α_1 --антитрипсин (10)	-0,86	-0,68	-0,78	0,95	0,85	-0,83	-0,69	-0,74	0,92	1,00

Корреляционная матрица для группы животных, не подвергавшихся введению фитомеланина (табл. 18) содержит 4 высоких коэффициента корреляции, отражающих активность коагулянтов. Наиболее сильная зависимость, как и в двух рассмотренных выше группах (Е, -Е), наблюдается между концентрацией фибриногена и временем свёртывания крови (0,98). Регрессионная модель для данных показателей имеет следующий вид:

$$t \text{ свёрт.крови} = -127,279 + 25,250 * \text{фибриноген.}$$

Здесь коэффициент детерминации равен 0,96487, что указывает на высокую прогнозную точность модели.

Для показателей, отражающих активность антикоагулянтов в данной группе, значимыми и превышающими значение 0,8 являются 9 коэффициентов из 15. Наибольшим из них является коэффициент корреляции для значений активности антитромбина III и активности плазмينا (0,97). Получена регрессионная модель, связывающая эти показатели:

$$\text{антитромбин} = 58,46013 + 3,25896 * \text{плазмин.}$$

Доля «объяснённой» дисперсии в данном случае составляет 93,196 %, что указывает на высокую прогнозную точность модели.

Высокие коэффициенты корреляции получены также для концентрации гепарина и активности плазмينا (0,94), для концентрации гепарина и активности антитромбина III (0,94). Такие же коэффициенты являются наибольшими для группы, не подвергавшейся воздействию ЭМИ КВЧ (-Е), и для группы, подвергшейся облучению ЭМИ КВЧ (Е).

Среди коэффициентов корреляции, отражающих взаимосвязь между коагулянтами и антикоагулянтами, 16 коэффициентов из 24 превышают 0,8. Наибольшие значения, как и в рассмотренных выше группах, принимают коэффициенты корреляции для времени свертывания крови и активности плазмينا (0,97), для времени свертывания крови и концентрации гепарина (0,97), для концентрации фибриногена и активности плазмينا (0,99), а также для концентрации фибриногена и активности антитромбина III (0,97). Регрессионные модели, отражающие зависимости между перечисленными показателями, обладают высокой прогнозной точностью. Так, уравнение регрессии для времени свертывания крови и концентрации гепарина описывает 94,02 5% дисперсии зависимой переменной:

$$t \text{ свёрт. крови} = 19,0765 + 194,3612 * \text{гепарин.}$$

Для регрессионной модели, связывающей концентрацию фибриногена и активность плазмينا, доля «объяснённой» дисперсии составляет 98,310 %, а для модели, связывающей концентрацию фибриногена и активность антитромбина III, она составляет 94,109 %:

$$\begin{aligned} \text{фибриноген} &= 4,900587 + 0,517122 * \text{плазмин;} \\ \text{фибриноген} &= -3,66839 + 0,14987 * \text{антитромбин.} \end{aligned}$$

В случае введения фитомеланина коэффициенты корреляции значительно выше, чем при его отсутствии (табл. 19). Исключение составляют коэффициенты, отражающие активность коагулянтов. Так же, как и для рассмотренной выше группы, 4 коэффициента превышают 0,8, причём это коэффициенты между теми же показателями. Здесь наибольшим коэффициентом корреляции, как и в табл. 18, является коэффициент между концентрацией фибриногена и временем свёртывания крови (0,98). Ниже приведено уравнение регрессии, выражающее значение времени свёртывания крови ($t \text{ свёрт. крови}$) через значения концентрации фибриногена (фибриноген):

$$t \text{ свёрт. крови} = -112,828 + 23,417 * \text{фибриноген.}$$

Эта модель обладает высокой прогнозной точностью, коэффициент детерминации для неё составляет 0,96538.

Все коэффициенты корреляции, характеризующие зависимость между показателями, отражающими активность антикоагулянтов, являются значимыми и превышают 0,8. Наиболее сильная линейная взаимосвязь, как и в рассмотренных выше группах, наблюдается между активностью антитромбина III и активностью плазмينا (0,99), концентрацией гепарина и активностью плазмينا (0,98), концентрацией гепарина и активностью антитромбина III (0,99). Высокую точность прогноза даёт уравнение регрессии, описывающее зависимость активности антитромбина III от концентрации гепарина:

$$\text{антитромбин} = 57,06874 + 70,39090 * \text{гепарин.}$$

Здесь коэффициент детерминации равен 0,97235, а коэффициент корреляции $R=0,98608$ ($p<0,00001$).

Таблица 19

Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению фитомеланина

Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт.крови (1)	1,00	0,94	0,98	-0,80	-0,91	0,98	0,99	0,98	-0,88	-0,84
t рекальциф. (2)	0,94	1,00	0,94	-0,73	-0,83	0,93	0,93	0,91	-0,78	-0,81
Фибриноген (3)	0,98	0,94	1,00	-0,79	-0,91	0,99	0,99	0,98	-0,88	-0,84
Фибрин (4)	-0,80	-0,73	-0,79	1,00	0,93	-0,75	-0,82	-0,83	0,83	0,84
ПДФ (5)	-0,91	-0,83	-0,91	0,93	1,00	-0,89	-0,93	-0,94	0,93	0,91
Гепарин (6)	0,98	0,93	0,99	-0,75	-0,89	1,00	0,99	0,98	-0,84	-0,85
Антитромбин III (7)	0,99	0,93	0,99	-0,82	-0,93	0,99	1,00	0,99	-0,88	-0,85
Плазмин (8)	0,98	0,91	0,98	-0,83	-0,94	0,98	0,99	1,00	-0,88	-0,84
α_2 -макроглобулин (9)	-0,88	-0,78	-0,88	0,83	0,93	-0,84	-0,88	-0,88	1,00	0,80
α_1 --антитрипсиин (10)	-0,84	-0,81	-0,84	0,84	0,91	-0,85	-0,85	-0,84	0,80	1,00

Более точной является регрессионная модель зависимости активности антитромбина III от концентрации гепарина и активности плазмينا:

$$\text{антитромбин} = 52,13001 + 27,07299 * \text{гепарин} + 2,81626 * \text{плазмин}.$$

Множественный коэффициент корреляции для таких показателей, как активность антитромбина-III, концентрация гепарина и активность плазмينا, $R=0,99487$ ($p<0,00001$), а доля «объяснённой» дисперсии составляет 98,976 %. Поверхность регрессии для модели изображена на рис. 33.

Среди 24 коэффициентов корреляции, отражающих зависимость между коагулянтами и антикоагулянтами, только 2 коэффициента принимают значения, меньшие 0,8. Это коэффициенты, характеризующие взаимосвязь времени рекальцификации с α_2 -макроглобулином, а также значений растворимого фибрина и концентрации гепарина. Наибольшие коэффициенты, как и в рассмотренных выше группах, были получены для таких показателей, как время свёртывания крови и концентрация фибриногена. Коэффициент корреляционной зависимости времени свёртывания крови от концентрации гепарина составил 0,98, от активности антитромбина III – 0,99, от активности плазмينا – 0,98. Коэффициент, характеризующий зависимость концентрации фибриногена от концентрации гепарина, составил 0,99, от активности антитромбина III – 0,99, от активности плазмينا – 0,98. Для показателей, между которыми существует наиболее сильная зависимость, были получены регрессионные модели, обладающие высокой прогнозной точностью. Уравнение регрессии для времени свёртывания крови и активности антитромбина III описывает 97,304 % дисперсии зависимой переменной:

$$t \text{ свёрт. крови} = -159,042 + 3,032 * \text{антитромбин}.$$

Для уравнения регрессии, которое связывает значения концентрации фибриногена и активности антитромбина III, доля «объяснённой» дисперсии составляет 98,231 %, а для модели, связывающей значения концентраций фибриногена и гепарина, она составляет 97,038 %:

$$\begin{aligned} \text{фибриноген} &= -1,83421 + 0,12781 * \text{антитромбин}; \\ \text{фибриноген} &= 5,432512 + 9,068374 * \text{гепарин}. \end{aligned}$$

Таким образом, введение фитомеланина животным с экспериментальной гипоплазией ККМ, так же как и воздействие ЭМИ КВЧ, усиливает линейную зависимость между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов.

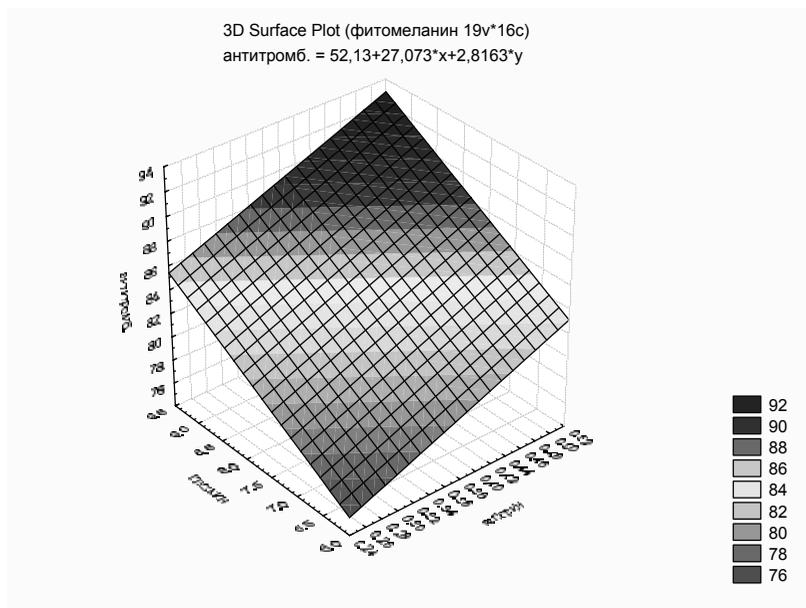


Рис. 33. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *антитромбин*, в зависимости от концентрации гепарина и активности плазмينا

Проведен сравнительный корреляционный анализ для показателей системы РАСК, полученных у всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению СК (S) относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению СК (-S), и определено, как влияет на зависимость между показателями системы РАСК введение стволовых клеток.

В отличие от приведённых выше корреляционных матриц, соответствующая матрица для показателей системы РАСК, по-

лученных у животных, которым не вводились СК, содержит большое количество незначимых коэффициентов корреляции со значениями, меньшими 0,5. Это указывает на слабую линейную зависимость между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов, что не характерно ни для одной из рассмотренных выше групп. Незначимые коэффициенты не включены в табл. 20 коэффициентов корреляции для данной группы.

Табл. 20 содержит 3 превышающих 0,8 значимых коэффициентов корреляции, отражающих активность коагулянтов. Это коэффициенты корреляции для времени свёртывания крови и времени рекальцификации (0,91), времени свёртывания крови и концентрации фибриногена (0,95), времени рекальцификации и концентрации фибриногена (0,96). Регрессионная модель, выражающая зависимость между временем рекальцификации *t рекальциф* и концентрацией фибриногена *фибриноген*, имеет вид

$$t \text{ рекальциф} = -20,6054 + 6,7982 * \text{фибриноген}.$$

Она описывает 91,707 % дисперсии зависимой переменной и обладает достаточно высокой прогнозной точностью.

Большую точность прогноза имеет уравнение регрессии для таких показателей, как концентрация фибриногена, время свёртывания крови и время рекальцификации:

$$\begin{aligned} \text{фибриноген} = & 4,130621 + 0,017380 * t \text{ свёрт. крови} + \\ & + 0,076809 * t \text{ рекальциф}. \end{aligned}$$

Множественный коэффициент корреляции для данных показателей $R=0,97614$ ($p<0,00001$), а доля «объяснённой» дисперсии составляет 95,285 %. Поверхность регрессии для модели изображена на рис. 34.

Таблица 20

Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению стволовых клеток

Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт. крови (1)	1,00	0,91	0,95	-	-	0,88	0,90	0,89	-	-0,63
t рекальциф. (2)	0,91	1,00	0,96	-	-	0,75	0,95	0,94	-	-
Фибриноген (3)	0,95	0,96	1,00	-	-	0,79	0,93	0,96	-	-0,56
Фибрин (4)	-	-	-	1,00	0,81	-	-	-	0,73	0,84
ПДФ (5)	-	-	-	0,81	1,00	-	-	-	0,72	0,79
Гепарин (6)	0,88	0,75	0,79	-	-	1,00	0,77	0,74	-	-0,70
Антитромбин III (7)	0,90	0,95	0,93	-	-	0,77	1,00	0,92	0,09	-
Плазмин (8)	0,89	0,94	0,96	-	-	0,74	0,92	1,00	-	-
α_2 -макроглобулин (9)	-	-	-	0,73	0,72	-	-	-	1,00	0,66
α_1 -антитрипсин (10)	-0,63	-	-0,56	0,84	0,79	-0,70	-	-	0,66	1,00

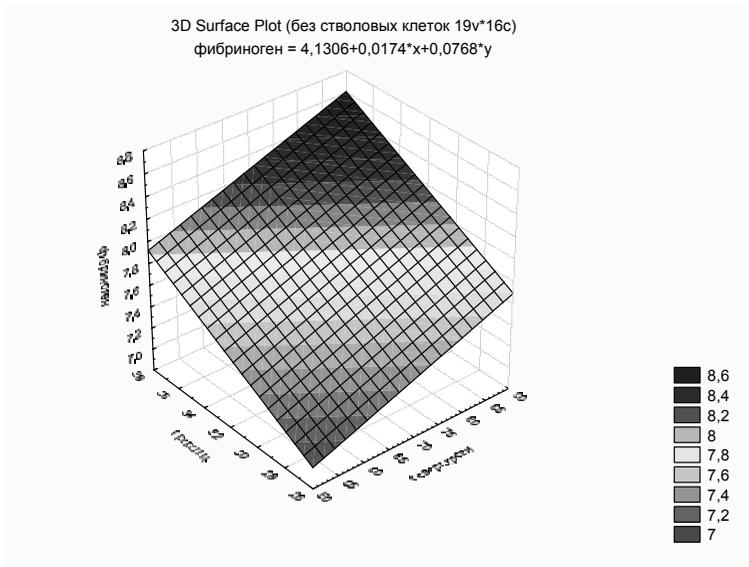


Рис. 34. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *фибриноген*, в зависимости от времени свёртывания крови и времени рекальцификации

Для данной группы получен только 1 высокий коэффициент корреляции, отражающий взаимосвязь между антикоагулянтами. Это коэффициент для активности антитромбина III и активности плазмينا (0,92).

Среди коэффициентов корреляции, отражающих взаимосвязь между коагулянтами и антикоагулянтами, 9 коэффициентов из 24 превышают 0,8. При этом наиболее сильная взаимосвязь наблюдается между временем рекальцификации и активностью антитромбина III (0,95), временем рекальцификации и активностью плазмина (0,94), концентрацией фибриногена и активностью антитромбина III (0,93), концентрацией фибриногена и активностью плазмина (0,96). Для значений концентрации фибриногена и активности плазмина получен наибольший коэффициент корреляции. Уравнение регрессии для данных по-

казателей также имеет достаточно высокую точность прогноза. Оно описывает 92,389 % дисперсии зависимой переменной:

$$\text{фибриноген} = 4,940022 + 0,508683 * \text{плазмин.}$$

Достаточной точностью прогноза обладает регрессионная модель, полученная для времени рекальцификации, активности антитромбина III и активности плазмينا:

$$t \text{ рекальциф} = -35,9838 + 0,7741 * \text{антитромбин} + 1,5887 * \text{плазмин.}$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен 0,93693. Коэффициент корреляции, $R=0,96795$ ($p<0,00001$), указывает на наличие сильной зависимости времени рекальцификации от активности антитромбина III и активности плазмينا. Поверхность регрессии данной модели изображена на рис. 35.

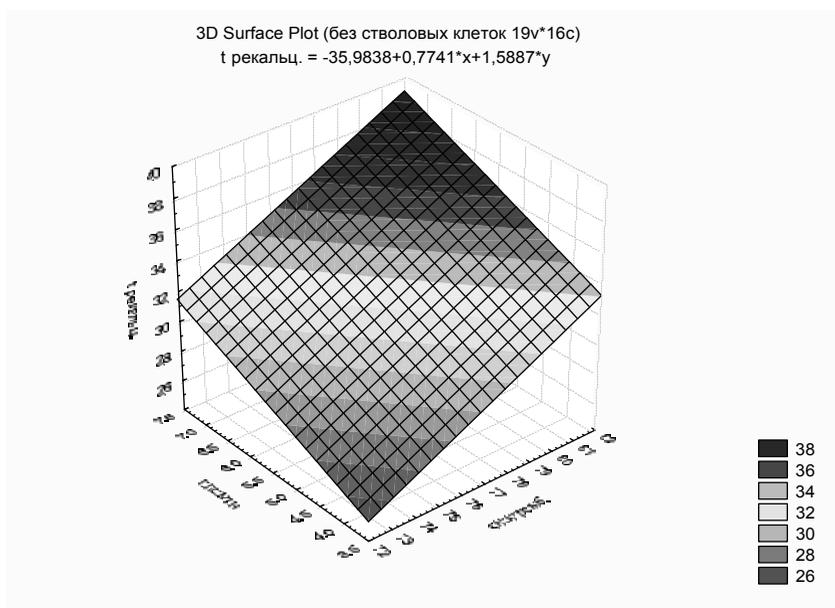


Рис. 35. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *t рекальциф*, в зависимости от активности антитромбина-III и активности плазмينا

Если для группы животных, не подвергавшихся введению СК (-S), характерна слабая линейная зависимость между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов, то в случае введения СК происходит усиление этой зависимости (табл. 21). Так, из 6 коэффициентов корреляции для показателей, отражающих активность коагулянтов, значимыми и превышающими 0,8 являются 4 коэффициента.

Наибольший коэффициент корреляции получен для времени свёртывания крови и концентрации фибриногена (0,98). Регрессионная модель для данных показателей имеет вид:

$$t \text{ свёрт. крови} = -86,6523 + 20,7570 * \text{фибриноген}.$$

Она описывает 95,319 % дисперсии зависимой переменной и обладает высокой прогнозной точностью.

Из 15 коэффициентов корреляции, отражающих активность антикоагулянтов, 10 коэффициентов превышают 0,8. Наибольшие коэффициенты корреляции получены для тех же показателей, что и в группах, которые подвергались или не подвергались воздействию ЭМИ КВЧ и введению фитомеланина (E, -E, P, -P).

Наиболее сильная линейная зависимость наблюдается между активностью антитромбина III и активностью плазмينا (0,96), концентрацией гепарина и активностью плазмينا (0,97), концентрацией гепарина и активностью антитромбина III (0,93). Уравнение регрессии, выражающее зависимость активности антитромбина III от активности плазмينا, имеет следующий вид:

$$\text{антитромбин} = 53,06238 + 4,05269 * \text{плазмин}.$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен 0,92230, что указывает на её достаточную точность.

Более высокой точностью прогноза обладает регрессионная модель зависимости активности плазмينا от концентрации гепарина и активности антитромбина III:

$$\text{плазмин} = -4,39227 + 9,86973 * \text{гепарин} + 0,09708 * \text{антитромбин}.$$

Таблица 21

Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению стволовых клеток

Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт. крови (1)	1,00	0,87	0,98	-0,83	-0,92	0,96	0,95	0,99	-0,81	-0,85
t рекальциф. (2)	0,87	1,00	0,89	-0,75	-0,72	0,85	0,86	0,86	-0,63	-0,73
Фибриноген (3)	0,98	0,89	1,00	-0,76	-0,85	0,96	0,98	0,97	-0,77	-0,79
Фибрин (4)	-0,83	-0,75	-0,76	1,00	0,87	-0,74	-0,72	-0,79	0,74	0,90
ПДФ (5)	-0,92	-0,72	-0,85	0,87	1,00	-0,81	-0,81	-0,89	0,92	0,90
Гепарин (6)	0,96	0,85	0,96	-0,74	-0,81	1,00	0,93	0,97	-0,67	-0,76
Антитромбин III (7)	0,95	0,86	0,98	-0,72	-0,81	0,93	1,00	0,96	-0,71	-0,71
Плазмин (8)	0,99	0,86	0,97	-0,79	-0,89	0,97	0,96	1,00	-0,78	-0,81
α_2 -макроглобулин (9)	-0,81	-0,63	-0,77	0,74	0,92	-0,67	-0,71	-0,78	1,00	0,81
α_1 -антитрипсин (10)	-0,85	-0,73	-0,79	0,90	0,90	-0,76	-0,71	-0,81	0,81	1,00

Множественный коэффициент корреляции для таких показателей, как активность плазмينا, концентрация гепарина и активность антитромбина III, $R=0,98329$ ($p<0,00001$), а доля «объяснённой» дисперсии составляет 96,686 %. Поверхность регрессии для модели изображена на рис. 36.

$$t \text{ свёрт. крови} = 7,82058 + 11,78527 * \text{плазмин}$$

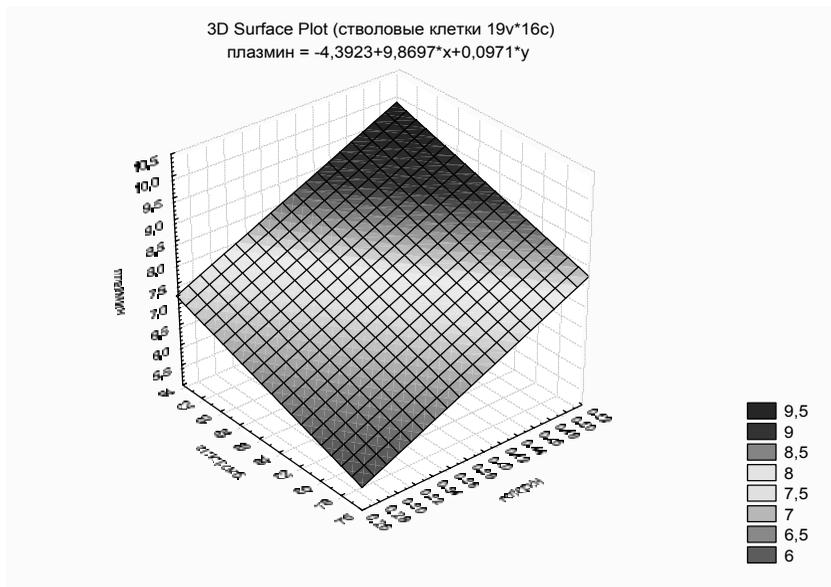


Рис. 36. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *плазмин*, в зависимости от концентрации гепарина и активности антитромбина-III

Из 24 коэффициентов корреляции, характеризующих зависимость между коагулянтами и антикоагулянтами, значимыми и превышающими 0,8, являются 15. Здесь, как и в группах, рассмотренных выше, наибольшие коэффициенты были получены для значений времени свёртывания крови и концентрации фибриногена.

Коэффициент корреляции, характеризующий взаимосвязь времени свёртывания крови с концентрацией гепарина, составил 0,96, с активностью антитромбина III – 0,95, с активностью плазмينا – 0,99. Уравнение регрессии для времени свёртывания крови и активности плазмينا описывает 98,444 % дисперсии зависимой переменной:

Коэффициент, характеризующий зависимость концентрации фибриногена от концентрации гепарина, составил 0,96, от активности антитромбина III – 0,98, от активности плазмينا – 0,97. Регрессионная модель зависимости концентрации фибриногена от активности антитромбина III имеет следующий вид:

$$\text{фибриноген} = -1,95108 + 0,12930 * \text{антитромбин.}$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен 0,95380, что указывает на её высокую точность.

Таким образом, введение СК в организм с экспериментальной гипоплазией КKM так же вызывает усиление зависимостей между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов, как и облучение ЭМИ КВЧ и введение фитомеланина.

Проведём сравнительный корреляционный анализ для показателей системы PАСК, полученных у всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, подвергшихся сочетанному воздействию СК и ЭМИ КВЧ (S+E), сочетанному воздействию СК и фитомеланина (S+P) и сочетанному воздействию фитомеланина и ЭМИ КВЧ (P+E).

Введение СК в сочетании с воздействием ЭМИ КВЧ способствует ослаблению зависимости между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов в организме с экспериментальной гипоплазией КKM. В табл. 22 приведены только значимые коэффициенты корреляции, указывающие на наличие сильной линейной взаимосвязи между показателями. Из 45 коэффициентов корреляции корреляционная матрица содержит только 9, превышающих 0,8. 2 коэффициента получены для показателей, отражающих активность коагулянтов, 3 коэффициента – для показателей, отражающих активность антикоагулянтов, 4 коэффициента корреляции характеризуют зависимость между коагулянтами и антикоагулянтами. Наиболее сильная линейная зависимость наблюдается, как и в рассмотренных ранее группах, между временем свёртывания крови и концентрацией фибриногена (0,91), временем

свёртывания крови и активностью плазмينا (0,91), а также между концентрацией фибриногена и активностью антитромбина III (0,91). Для таких показателей, как растворимый фибрин и α_1 -антитрипсин, высоких коэффициентов корреляции не получено.

Аналогичный результат получается в случае введения СК в сочетании с введением фитомеланина. Значимые коэффициенты корреляции, приведённые в табл. 23, указывают на отсутствие сильной зависимости между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов.

Из 45 коэффициентов корреляции только 9 превышают 0,8. 1 коэффициент получен для показателей, отражающих активность коагулянтов, 3 коэффициента для показателей, отражающих активность антикоагулянтов, 5 коэффициентов корреляции характеризуют зависимость между коагулянтами и антикоагулянтами. При этом наибольшие коэффициенты получены для значений времени свёртывания крови и концентрации гепарина (0,94), времени свёртывания крови и активности антитромбина III (0,94), активности антитромбина III и концентрации фибриногена (0,94), для концентрации гепарина и активности плазмينا (0,94), для концентрации гепарина и активности антитромбина III (0,96). Для таких показателей, как концентрация ПДФ и α_2 -макроглобулин, высоких коэффициентов корреляции не получено.

В отличие от двух рассмотренных выше групп (S+E, S+P), в группе, которая подвергалась воздействию ЭМИ КВЧ и введению фитомеланина (P+E), наблюдается сильная линейная зависимость между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов (табл. 24). Все коэффициенты корреляции, отражающие активность коагулянтов, являются высокими и превосходят 0,8. Наиболее сильная зависимость получена для времени свёртывания крови и концентрации фибриногена (0,97), для времени рекальцификации и концентрации фибриногена (0,97). Регрессионные модели, выражающие зависимость между временем свёртывания крови и концентрацией фибриногена, а также между временем рекальцификации и концентрацией фибриногена имеют высокую точность прогноза. Первая из них описывают 94,256 % дисперсии зависимой переменной, а вторая 93,905 % дисперсии зависимой переменной:

$$\begin{aligned}t \text{ свёрт. крови} &= -104,623 + 22,479 * \text{фибриноген}; \\t \text{ рекальциф} &= 7,852369 + 3,377886 * \text{фибриноген}.\end{aligned}$$

Таблица 22

Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся сочетанному воздействию стволовых клеток и ЭМИ КВЧ

Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт. крови (1)	1,00	0,74	0,91	-	-	0,89	0,86	0,91	-	-
t рекальциф. (2)	0,74	1,00	0,80	-	-	-	-	-	-	-
Фибриноген (3)	0,91	0,80	1,00	-	-	0,72	0,91	0,79	-	-
Фибрин (4)	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-
ПДФ (5)	-	-	-	-	1,00	-	-	-	0,83	-
Гепарин (6)	0,89	-	0,72	-	-	1,00	-	0,86	-	-
Антитромбин III (7)	0,86	-	0,91	-	-	-	1,00	0,83	-	-
Плазмин (8)	0,91	-	0,79	-	-	0,86	0,83	1,00	-	-
α_2 -макроглобулин (9)	-	-	-	-	0,83	-	-	-	1,00	-
α_1 -антитрипсин (10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00

Таблица 23

Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся сочетанному воздействию ствольных клеток и фитомеланина

Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт. крови (1)	1,00	-	0,86	-	-	0,94	0,94	0,93	-	-
t рекальциф. (2)	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Фибриноген (3)	0,86	-	1,00	-	-	0,90	0,94	0,77	-	-
Фибрин (4)	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	0,77
ПДФ (5)	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-
Гепарин (6)	0,94	-	0,90	-	-	1,00	0,96	0,94	-	-
Антитромбин III (7)	0,94	-	0,94	-	-	0,96	1,00	0,92	-	-
Плазмин (8)	0,93	-	0,77	-	-	0,94	0,92	1,00	-	-
α_2 -макроглобулин (9)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-
α_1 -антитрипсин (10)	-	-	-	0,77	-	-	-	-	-	1,00

Из 15 коэффициентов корреляции для показателей, отражающих активность антикоагулянтов, 13 коэффициентов превышают 0,8. Как и во всех рассмотренных выше группах, наибольшие значения принимают коэффициенты корреляции для активности антитромбина III и активности плазмينا (0,99), концентрации гепарина и активности плазмينا (0,98), концентрации гепарина и активности антитромбина III (0,98).

Уравнение регрессионной зависимости активности антитромбина III от активности плазмينا имеет следующий вид:

$$\text{антитромбин} = 49,91889 + 4,48777 * \text{плазмин}.$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен 0,98855, что указывает на её высокую точность. Также высокую прогнозную точность даёт уравнение регрессии, связывающее такие показатели, как концентрация гепарина и активность антитромбина III:

$$\text{гепарин} = -0,704953 + 0,012964 * \text{антитромбин}.$$

Коэффициент детерминации для данной модели также является высоким и составляет 0,95691.

Из 24 коэффициентов корреляции, характеризующих зависимость между коагулянтами и антикоагулянтами, только 3 коэффициента не превышают 0,8. Как и в группах, рассмотренных выше, наибольшие коэффициенты в данной группе были получены для значений времени свёртывания крови и концентрации фибриногена. Коэффициент корреляции, характеризующий связь времени свёртывания крови с концентрацией гепарина составил 0,97, с активностью антитромбина III – 0,98, с активностью плазмينا – 0,99. Уравнение регрессии для времени свёртывания крови и активности антитромбина III описывает 96,527 % дисперсии зависимой переменной:

$$t \text{ свёрт. крови} = -163,633 + 3,078 * \text{антитромбин}.$$

Таблица 24

Коэффициенты корреляции для показателей системы РАСК, полученных у животных с экспериментальной гипоплазией КЖМ, подвергшихся сочетанному воздействию ЭМИ КВЧ и фитомеланина

Показатели	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t сверт. крови (1)	1,00	0,95	0,97	-0,82	-0,90	0,97	0,98	0,99	-0,92	-0,78
t рекальциф. (2)	0,95	1,00	0,97	-0,80	-0,83	0,93	0,95	0,92	-0,88	-0,75
Фибриноген (3)	0,97	0,97	1,00	-0,79	-0,89	0,98	0,99	0,97	-0,91	-0,80
Фибрин (4)	-0,82	-0,80	-0,79	1,00	0,94	-0,73	-0,84	-0,82	0,89	0,87
ПДФ (5)	-0,90	-0,83	-0,89	0,94	1,00	-0,87	-0,92	-0,92	0,97	0,95
Гепарин (6)	0,97	0,93	0,98	-0,73	-0,87	1,00	0,98	0,98	-0,88	-0,77
Антитромбин III (7)	0,98	0,95	0,99	-0,84	-0,92	0,98	1,00	0,99	-0,91	-0,80
Плазмин (8)	0,99	0,92	0,97	-0,82	-0,92	0,98	0,99	1,00	-0,91	-0,79
α_2 -макроглобулин (9)	-0,92	-0,88	-0,91	0,89	0,97	-0,88	-0,91	-0,91	1,00	0,95
α_1 -антитрипсин (10)	-0,78	-0,75	-0,80	0,87	0,95	-0,77	-0,80	-0,79	0,95	1,00

Коэффициент корреляции, характеризующий зависимость концентрации фибриногена от концентрации гепарина, составил 0,98, от активности антитромбина III – 0,99, от активности плазмينا – 0,97. Эти коэффициенты указывают на сильную взаимозависимость между рассмотренными показателями. Были получены регрессионные модели зависимости концентрации фибриногена от концентрации гепарина, активности антитромбина III и активности плазмина:

$$\begin{aligned} \text{фибриноген} &= 5,02396 + 10,03482 * \text{гепарин}; \\ \text{фибриноген} &= -2,34272 + 0,13356 * \text{антитромбин}; \\ \text{фибриноген} &= 4,358949 + 0,594925 * \text{плазмин}. \end{aligned}$$

Эти модели имеют высокую прогнозную точность. Коэффициент детерминации для первой модели составляет 0,96629, для второй – 0,97462 и для третьей – 0,94913.

Таким образом, при изучении влияния сочетанного воздействия модулирующих факторов СК, ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ в различных комбинациях можно сделать вывод о том, что только сочетанное воздействие фитомеланина и ЭМИ КВЧ способствует усилению зависимости между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов. Сочетанное воздействие СК и ЭМИ КВЧ, а также сочетанное воздействие СК и фитомеланина приводит к ослаблению данной зависимости.

3. Изучение зависимостей между показателями уровня СРО и системы РАСК при применении стволовых клеток, фитомеланина и ЭМИ КВЧ, действующих как модулирующие факторы

Проведен сравнительный корреляционный анализ между показателями СРО и системы РАСК, полученными у всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ (Е), относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся воздействию ЭМИ КВЧ (-Е), и определим, как влияет на зависимость между показателями СРО и системы РАСК воздействие ЭМИ КВЧ.

В корреляционной матрице для группы, не подвергавшейся облучению ЭМИ КВЧ (табл. 25), 37 коэффициентов корреляции из 50 превышают 0,8. Наиболее сильной является зависимость показателей, отражающих активность коагулянтов и антикоагулянтов от значений гидроперекисей липидов, антиокислительной активности плазмы и активности каталазы. При этом наибольшие коэффициенты корреляции получены для значений активности каталазы и таких показателей, как время свёртывания крови (0,96), концентрация ПДФ (-0,94) и концентрация гепарина (0,96). Уравнение регрессии, описывающее зависимость между активностью каталазы, ПДФ и концентрацией гепарина, имеет вид

$$\text{каталаза} = 10,24689 - 0,09143 * \text{ПДФ} + 19,78275 * \text{гепарин}.$$

Также получена регрессионная модель, выражающая значения активности каталазы через значения времени свёртывания крови и ПДФ:

$$\text{каталаза} = 8,939955 + 0,091590 * t \text{ свёрт.крови} - 0,089771 * \text{ПДФ}.$$

Эта модель обладает высокой прогнозной точностью. Коэффициент детерминации для неё составляет 0,95536, а множественный коэффициент корреляции $R=0,97743$ ($p<0,00001$). Поверхность регрессии изображена на рис. 38.

Коэффициент корреляции для данной регрессионной модели $R=0,97775$ ($p<0,00001$). Доля «объяснённой» дисперсии составляет 95,600 %, что указывает на высокую точность модели. Поверхность регрессии изображена на рис. 37.

Для группы, подвергшейся облучению ЭМИ КВЧ (табл. 26), получаем аналогичный результат. 40 коэффициентов корреляции из 50 превышают 0,8. Высокими являются коэффициенты корреляции для всех показателей ПОЛ, за исключением супероксиддисмутазы. Наибольшие коэффициенты получены для активности каталазы и ПДФ (-0,96), антиокислительной активности плазмы и активности плазмина (0,96).

Таблица 25
Коэффициенты корреляции между показателями СРО и системы РАСК, полученными у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся воздействию ЭМИ КВЧ

Показатели	Гидроперекиси липидов	Малонный диальдегид	Антиокислительная активность плазмы	Активность каталазы	Супероксид-дисмутаза
t сверт.крови	-0,91	-0,88	0,91	0,96	0,78
t рекальциф.	-0,79	-0,82	0,76	0,81	0,66
Фибриноген	-0,88	-0,83	0,89	0,93	0,76
Фибрин	0,88	0,82	-0,82	-0,88	-0,81
ПДФ	0,85	0,79	-0,89	-0,94	-0,91
Гепарин	-0,89	-0,87	0,92	0,96	0,75
Антитромбин III	-0,82	-0,78	0,88	0,90	0,75
Плазмин	-0,84	-0,81	0,87	0,91	0,75
α_2 -макрोगлобулин	0,88	0,79	-0,87	-0,88	-0,78
α_1 -антитрипсин	0,93	0,90	-0,86	-0,92	-0,76

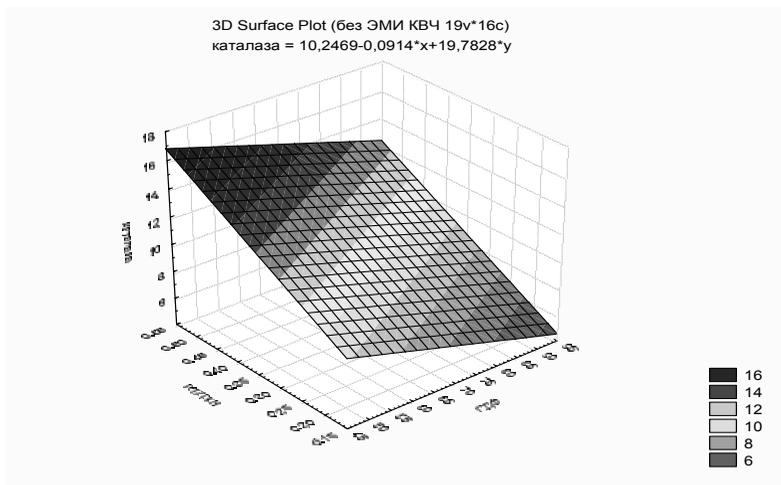


Рис. 37. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *каталаза*, в зависимости от ПДФ и концентрации гепарина

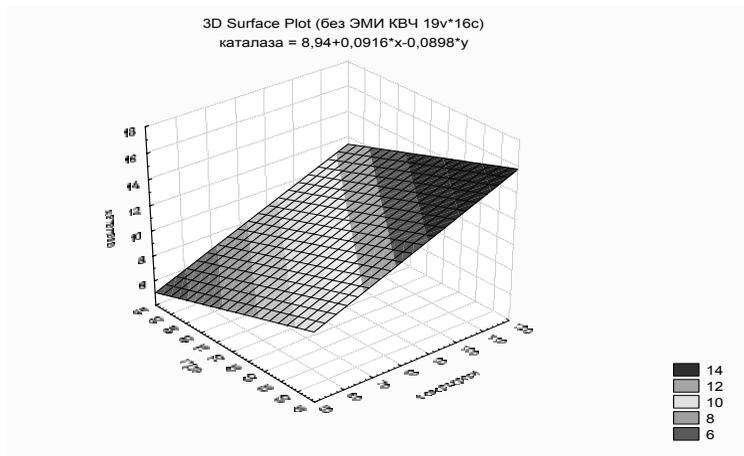


Рис. 38. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *каталаза* в зависимости от времени свёртывания крови и ПДФ

Коэффициенты корреляции между показателями СРО и системы РАСК, полученными у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ

Показатели	Гидроперекиси липидов	Малоновый диальдегид	Антиокислительная активность плазмы	Активность каталазы	Супероксиддисмутаза
t сверт.крови	-0,90	-0,92	0,95	0,95	0,69
t рекальциф.	-0,75	-0,77	0,80	0,82	0,61
Фибриноген	-0,86	-0,88	0,93	0,95	0,69
Фибрин	0,88	0,86	-0,90	-0,93	-0,77
ПДФ	0,90	0,92	-0,95	-0,96	-0,81
Гепарин	-0,88	-0,92	0,93	0,91	0,62
Антитромбин III	-0,86	-0,87	0,93	0,93	0,71
Плазмин	-0,90	-0,93	0,96	0,95	0,69
α_2 -макроглобулин	0,83	0,84	-0,89	-0,93	-0,82
α_1 -антитрипсин	0,83	0,84	-0,89	-0,90	-0,78

Для значений активности каталазы и ПДФ получено уравнение регрессии:

$$\text{каталаза} = 24,93144 - 0,20075 * \text{ПДФ}.$$

Эта модель обладает достаточно высокой точностью прогноза, коэффициент детерминации для неё составляет 0,92690.

Более точным является уравнение регрессии, связывающее такие показатели, как активность каталазы, время свёртывания крови и ПДФ:

$$\text{каталаза} = 11,57309 + 0,08018 * t \text{ свёрт.крови} - 0,11611 * \text{ПДФ}.$$

Коэффициент корреляции для данной модели $R=0,98151$ ($p<0,00001$), что указывает на сильную зависимость между перечисленными показателями. Модель описывает 96,336 % дисперсии зависимой переменной. Поверхность регрессии изображена на рис. 39.

Также получена регрессионная модель зависимости антиокислительной активности плазмы и активности плазмينا:

$$AA \text{ плазмы} = 5,609345 + 2,041431 * \text{плазмин.}$$

Доля «объяснённой» дисперсии для приведённого выше уравнения составляет 91,733 %, что указывает на достаточно высокую прогнозную точность модели.

Таким образом, воздействие ЭМИ КВЧ на организм с экспериментальной гипоплазией КKM не оказывает влияния на зависимость между показателями СРО и системы РАСК.

Проведём сравнительный корреляционный анализ между показателями СРО и системы РАСК, полученными у всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, подвергшихся введению фитомеланина (Р) относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, не подвергавшихся введению фитомеланина (-Р), и определим, как влияет на зависимость между показателями СРО и системы РАСК введение фитомеланина.

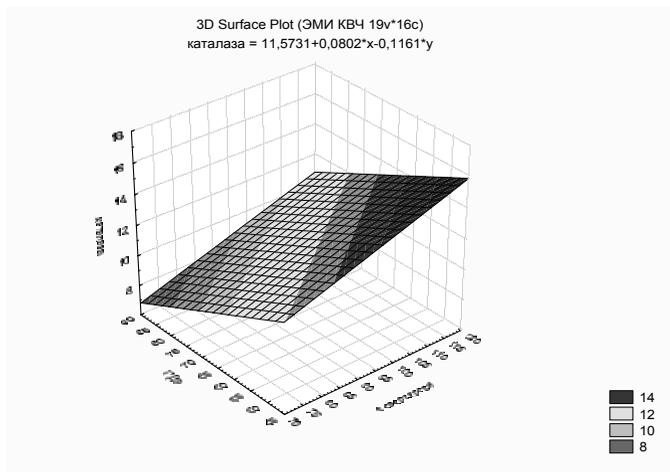


Рис. 39. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *каталаза* в зависимости от времени свёртывания крови и ПДФ

Как и при облучении ЭМИ КВЧ, здесь также не наблюдается существенных различий между корреляционной матрицей, полученной для группы, которой не вводился фитомеланин

(табл. 27), и корреляционной матрицей для группы, которая подвергалась введению фитомеланина (табл. 28).

Так же, как и в предыдущем случае (группы Е и –Е), получаем немного больше высоких коэффициентов корреляции в группе, в которой вводился фитомеланин: табл. 27 содержит 40 коэффициентов, превышающих 0,8, а табл. 28 – 44 таких коэффициента. При отсутствии фитомеланина (группа –Р) наибольшая линейная зависимость наблюдается между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов от активности каталазы. При этом наибольшие коэффициенты корреляции получены, как и в группе, не подвергавшейся воздействию ЭМИ КВЧ (-Е), для активности каталазы и таких показателей, как время свёртывания крови (0,97), ПДФ (-0,95) и концентрация гепарина (0,96). Регрессионная модель, зависимости между активностью каталазы и временем свёртывания крови:

$$\text{каталаза} = -2,98894 + 0,15184 * t \text{ свёрт. крови.}$$

Она описывает 93,295 % дисперсии зависимой переменной и обладает достаточно высокой прогнозной точностью.

Таблица 27

Коэффициенты корреляции между показателями СРО и системы РАСК, полученными у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению фитомеланина

	Гидро-пероксилипидов	Малонный диальдегид	Антиокислительная активность плазмы	Активность каталазы	Супероксиддисмутаза
t сверт. крови	-0,93	-0,90	0,93	0,97	0,79
t рекальциф.	-0,73	-0,78	0,73	0,77	0,54
Фибриноген	-0,88	-0,84	0,89	0,92	0,72
Фибрин	0,91	0,85	-0,82	-0,90	-0,85
ПДФ	0,91	0,81	-0,91	-0,95	-0,85
Гепарин	-0,92	-0,88	0,94	0,96	0,75
Антитромбин III	-0,84	-0,79	0,89	0,87	0,66
Плазмин	-0,86	-0,82	0,88	0,90	0,71
α_2 -макроглобулин	0,88	0,78	-0,81	-0,87	-0,84
α_1 -антитрипсин	0,90	0,89	-0,83	-0,92	-0,81

Большую точность прогноза имеет уравнение регрессии для таких показателей, как активность каталазы, ПДФ и концентрация гепарина:

$$\text{каталаза} = 12,11062 - 0,10625 * \text{ПДФ} + 17,00099 * \text{гепарин}.$$

Коэффициент детерминации для данной модели равен $0,95811$, что указывает на её высокую точность. Коэффициент корреляции $R=0,97883$ ($p<0,0001$) указывает на наличие сильной зависимости активности каталазы от перечисленных выше показателей. Поверхность регрессии изображена на рис. 40.

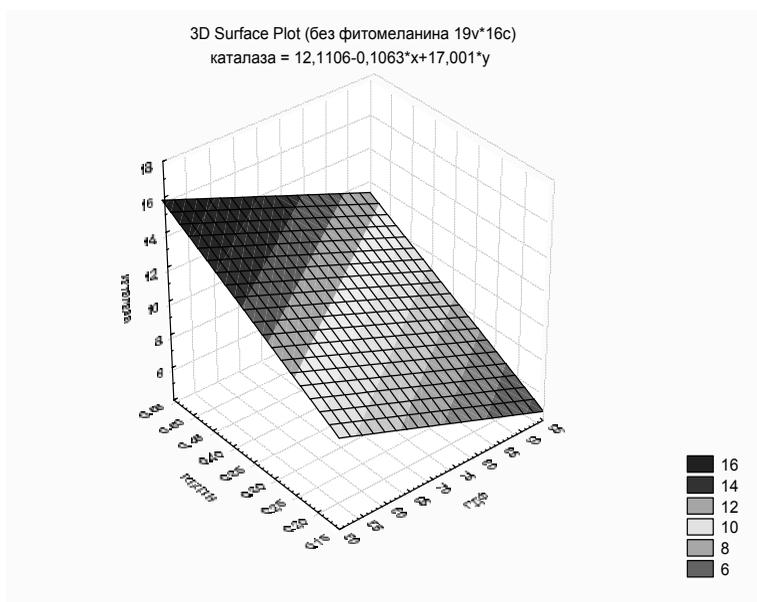


Рис. 40. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя каталаза в зависимости от ПДФ и концентрации гепарина

В случае введения фитомеланина (группа Р) наиболее сильная взаимосвязь наблюдается также между показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов и актив-

ностью каталазы. Наибольшие коэффициенты корреляции в данной группе получены для активности каталазы и ПДФ (-0,96), а также для активности каталазы и активности антитромбина III (0,96).

Таблица 28

Коэффициенты корреляции между показателями СРО и системы РАСК, полученными у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению фитомеланина

Показатели	Гидро-перекиси липидов	Малонвый диальдегид	Антиокислительная активность плазмы	Активность каталазы	Супероксиддисмутаза
t сверт. крови	-0,91	-0,91	0,91	0,94	0,76
t рекальциф.	-0,87	-0,83	0,80	0,87	0,73
Фибриноген	-0,90	-0,89	0,92	0,95	0,73
Фибрин	0,85	0,80	-0,87	-0,92	-0,89
ПДФ	0,92	0,94	-0,95	-0,96	-0,88
Гепарин	-0,86	-0,90	0,89	0,92	0,72
Антитромбин III	-0,91	-0,91	0,93	0,96	0,75
Плазмин	-0,89	-0,93	0,93	0,95	0,76
α_2 -макроглобулин	0,89	0,88	-0,94	-0,92	-0,82
α_1 -антитрипсин	0,84	0,83	-0,87	-0,88	-0,86

Уравнение регрессии, выражающее значения активности каталазы через значения ПДФ, имеет следующий вид:

$$\text{каталаза} = 24,04894 - 0,18647 * \text{ПДФ}.$$

Модель обладает высокой прогнозной точностью. Доля «объясненной» дисперсии для неё составляет 91,849 %. Высокую точность имеет также регрессионная модель зависимости активности каталазы от активности антитромбина III:

$$\text{каталаза} = -31,5421 + 0,5129 * \text{антитромбин}.$$

Коэффициент корреляции $R=0,95620$ ($p<0,00001$) так же, как и для рассмотренной выше модели, указывает на наличие сильной линейной зависимости между активностью каталазы и

активностью антитромбина III. Доля «объяснённой» дисперсии составляет 91,431 %.

Таким образом, введение фитомеланина в организм с экспериментальной гипоплазией КKM, так же как и воздействие на него ЭМИ КВЧ, не оказывает существенного влияния на зависимость между показателями СРО и системы РАСК.

Проведен сравнительный корреляционный анализ между показателями СРО и системы РАСК, полученными у всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, подвергшихся введению СК (S), относительно всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, не подвергавшихся введению фитомеланина (-S), и определим, как влияет на зависимость между показателями СРО и системы РАСК введение СК.

В отличие от групп, рассмотренных выше (E, -E, P, -P), для группы, не подвергавшейся введению СК (-S), характерна слабая зависимость между показателями СРО и системы РАСК. Среди коэффициентов корреляции, полученных для данной группы, только 5 превосходят значение 0,8. Для значений супероксиддисмутазы получено наибольшее число незначимых коэффициентов корреляции, они не приведены в табл. 29.

Введение СК существенным образом влияет на усиление зависимости между показателями СРО и показателями, отражающими активность коагулянтов и антикоагулянтов (табл. 30). Корреляционная матрица для данной группы содержит 22 значимых коэффициента, превышающих 0,8. Как и в рассмотренных выше группах (E, -E, P, -P), наибольшие коэффициенты получены для активности каталазы. При этом наиболее сильная линейная зависимость наблюдается между активностью каталазы и временем свёртывания крови (0,94), между активностью каталазы и концентрацией фибриногена (0,92), а также между активностью каталазы и активностью плазмينا (0,92) и между активностью каталазы и концентрацией ПДФ (0,92). Для таких показателей, как гидроперекиси липидов и антиокислительная активность плазмы, также получены высокие коэффициенты корреляции.

Регрессионная модель зависимости активности каталазы от ПДФ и активности плазмينا имеет следующий вид:

$$\text{каталаза} = 11,77231 - 0,08770 * \text{ПДФ} + 0,81875 * \text{плазмин.}$$

Таблица 29

Коэффициенты корреляции между показателями СРО и системы РАСК, полученными у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению стволовых клеток

Показатели	Гидро-перекиси липидов	Малоно-вый ди-альдегид	Антиокис-лительная активность плазмы	Актив-ность каталазы	Супер-оксид-дисму-таза
t сверт.крови	-0,73	-0,81	0,65	0,79	-
t рекальциф.	-0,61	-0,73	0,58	0,64	-
Фибриноген	-0,67	-0,78	0,61	0,72	-
Фибрин	0,76	0,64	-0,58	-0,81	-0,65
ПДФ	0,58	0,55	-	-0,70	-0,53
Гепарин	-0,73	-0,78	0,72	0,77	-
Антитромбин III	-0,53	-0,67	0,56	0,54	-
Плазмин	-0,59	-0,71	0,58	0,67	-
α_2 -макроглобулин	-	-	-	-0,59	-
α_1 -антитрипсин	0,88	0,81	-0,72	-0,90	-0,60

Таблица 30

Коэффициенты корреляции между показателями СРО и системы РАСК, полученными у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению стволовых клеток

Показатели	Гидро-перекиси липидов	Малоновый диальдегид	Антиокис-лительная активность плазмы	Актив-ность каталазы	Супер-оксид-дисмутаза
t сверт.крови	-0,87	-0,66	0,88	0,94	0,53
t рекальциф.	-0,67	-0,55	0,63	0,77	-
Фибриноген	-0,82	-0,58	0,86	0,92	0,50
Фибрин	0,79	0,59	-0,75	-0,86	-0,67
ПДФ	0,88	0,71	-0,86	-0,92	-0,72
Гепарин	-0,80	-0,67	0,84	0,87	-
Антитромбин III	-0,79	-0,56	0,83	0,88	0,51
Плазмин	-0,86	-0,68	0,88	0,92	0,51
α_2 -макроглобулин	0,87	0,55	-0,86	-0,87	-0,71
α_1 -антитрипсин	0,72	0,57	-0,79	-0,89	-0,68

Коэффициент корреляции для данной модели $R=0,94567$ ($p<0,00001$), что указывает на наличие сильной зависимости между показателями. Модель описывает 89,430 % дисперсии зависимой переменной. Поверхность регрессии изображена на рис. 41.

Таким образом, введение СК животным с экспериментальной гипоплазией КKM существенным образом влияет на усиление зависимости между показателями СРО и системы РАСК.

Проведен сравнительный корреляционный анализ между показателями СРО и системы РАСК, полученными у всех животных с экспериментальной гипоплазией КKM, подвергшихся сочетанному воздействию СК и ЭМИ КВЧ (S+E), сочетанному воздействию СК и фитомеланина (S+P) и сочетанному воздействию фитомеланина и ЭМИ КВЧ (P+E).

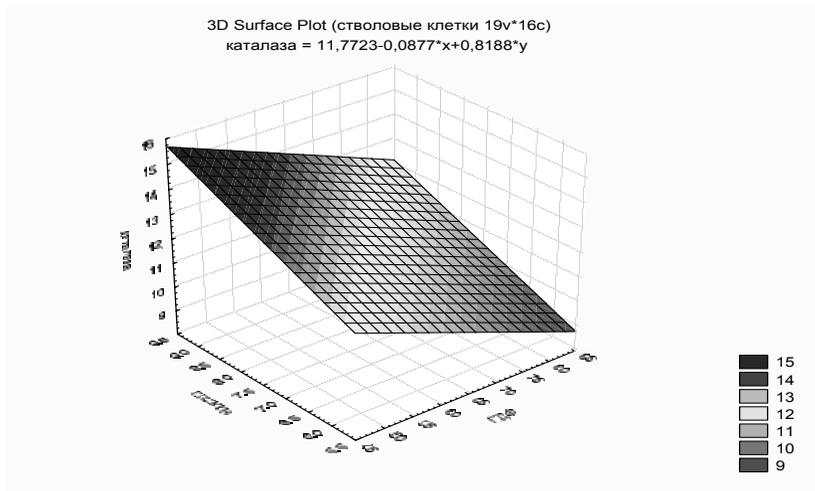


Рис. 41. Поверхность регрессии, описывающая прогнозный эффект для показателя *каталаза*, в зависимости от ПДФ и активности плазмينا

Введение СК в сочетании с воздействием ЭМИ КВЧ, а также одновременное введение СК и фитомеланина вызывает ослабление зависимости между показателями, отражающими активность СРО и системы РАСК. Все коэффициенты корреляции, полученные для

показателей СРО и системы РАСК в этих двух группах, являются низкими. Исключение составляет группа, которая подвергалась воздействию ЭМИ КВЧ и введению фитомеланина (табл. 31).

Таблица 31

Коэффициенты корреляции между показателями СРО и системы РАСК, полученными у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся сочетанному воздействию ЭМИ КВЧ и фитомеланина

	Гидро-перекиси липидов	Малоновый диальдегид	Антиокислительная активность плазмы	Активность каталазы	Супероксиддисмутаза
t сверт.крови	-0,91	-0,89	0,95	0,94	0,75
t рекальциф.	-0,91	-0,77	0,91	0,94	0,72
Фибриноген	-0,89	-0,87	0,94	0,95	0,71
Фибрин	0,96	0,77	-0,94	-0,94	-0,87
ПДФ	0,93	0,92	-0,99	-0,96	-0,87
Гепарин	-0,82	-0,92	0,91	0,90	0,70
Антитромбин III	-0,91	-0,90	0,96	0,96	0,73
Плазмин	-0,89	-0,93	0,95	0,93	0,73
α_2 -макроглобулин	0,92	0,89	-0,97	-0,96	-0,87
α_1 -антитрипсин	0,83	0,86	-0,91	-0,89	-0,92

42 значимых коэффициента корреляции в данной группе превосходят 0,8, что указывает на наличие сильной линейной зависимости между рассматриваемыми показателями. Наиболее сильная зависимость в данной группе характерна для антиокислительной активности плазмы. Все коэффициенты корреляции для данного показателя превосходят 0,9, причём наибольший коэффициент получен для антиокислительной активности плазмы и ПДФ (0,99). Уравнение регрессии для антиокислительной активности плазмы и ПДФ описывает 97,102 % дисперсии зависимой переменной:

$$AA \text{ плазмы} = 31,20140 - 0,14694 * ПДФ.$$

Все регрессионные модели значимы по критерию Фишера ($p < 0,001$).

Таким образом, при изучении влияния сочетанного воздействия модулирующих факторов СК, ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией КKM в различных комбинациях можно сделать вывод о том, что только сочетанное воздействие фитомеланина и ЭМИ КВЧ сопровождается сильной зависимостью между показателями, отражающими активность СРО и системы РАСК. При введении СК в сочетании с ЭМИ КВЧ или с введением фитомеланина сильной зависимости между рассматриваемыми показателями не наблюдается.

4. Математическое моделирование процессов СРО и РАСК на основании данных корреляционного анализа между базовыми лабораторными показателями, отражающими активность этих систем.

Построение систем дифференциальных уравнений.

Приведенные в данном пункте математические модели и системы дифференциальных уравнений построены на основании данных проведенного корреляционного анализа между различными показателями СРО и системы РАСК, полученными у всех групп экспериментальных животных.

Модель, полученная для лабораторных показателей животных с экспериментальной гипоплазией КKM, подвергшихся введению фитомеланина.

В результате корреляционного анализа для группы, в которой вводился фитомеланин (Р), были отобраны показатели, между которыми существовала наиболее сильная линейная взаимосвязь, на основании чего были построены наиболее точные линии регрессии, связывающие показатели ПОЛ и систем коагулянтов и антикоагулянтов. Это зависимости активности каталазы от концентрации фибриногена, ПДФ, активности антитромбина III и активности плазмينا:

$$\text{каталаза} = -23,7293 + 3,9619 * \text{фибриноген};$$

$$\begin{aligned} \text{каталаза} &= 24,04894 - 0,18647 * \text{ПДФ}; \\ \text{каталаза} &= -31,5421 + 0,5129 * \text{антитромбин}; \\ \text{каталаза} &= -6,13126 + 2,31347 * \text{плазмин}. \end{aligned}$$

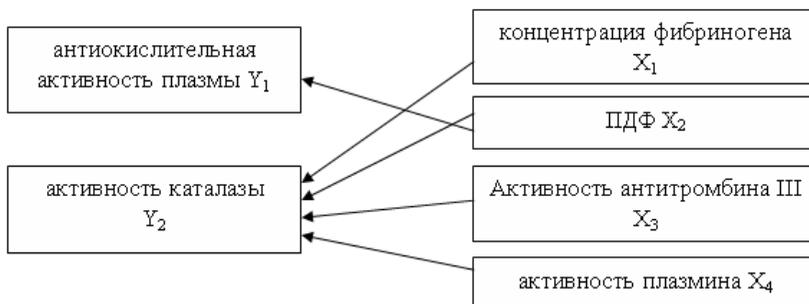
Эти модели имеют высокую прогнозную точность. Коэффициент детерминации для первой модели составляет $0,90737$, для второй – $0,918491$, для третьей – $0,91431$ и для четвёртой – $0,90457$.

Кроме того, высокую прогнозную точность даёт уравнение зависимости антиокислительной активности плазмы от ПДФ:

$$AA \text{ плазмы} = 30,83853 - 0,14200 * \text{ПДФ}.$$

Модель описывает $89,387\%$ дисперсии зависимой переменной.

Наиболее сильная зависимость в данном случае получена для следующих показателей:



Все представленные на схеме зависимости являются линейными и могут быть выражены системой дифференциальных уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} = A \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_1} = B \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_2} = C \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_3} = D \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_4} = E \end{array} \right. \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} = A \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_3} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_4} = B + C + D + E \end{array} \right.$$

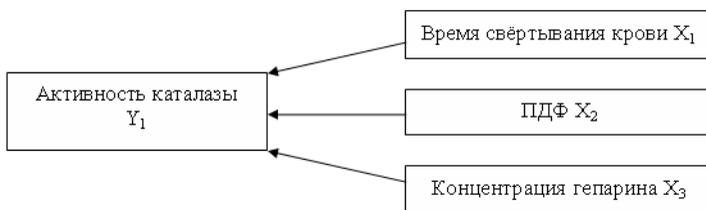
Модель, полученная для лабораторных показателей животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению фитомеланина.

Приведем наиболее точные линии регрессии, связывающие показатели ПОЛ и систем коагулянтов и антикоагулянтов в группе, не подвергавшейся введению фитомеланина (-Р). Это зависимости активности каталазы от времени свёртывания крови, ПДФ и концентрации гепарина:

$$\begin{aligned} \text{каталаза} &= -2,98894 + 0,15184 * t \text{ свёрт. крови;} \\ \text{каталаза} &= 12,11062 - 0,10625 * \text{ПДФ} + 17,00099 * \text{гепарин.} \end{aligned}$$

Эти модели имеют высокую прогнозную точность. Коэффициент детерминации для первой модели составляет 0,93295, для второй - 0,95811.

Таким образом, наиболее сильные взаимосвязи наблюдаются между следующими показателями:



Так как эти зависимости являются линейными, то можно описать их с помощью следующей системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} = A \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} = B \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = C \end{cases} \Rightarrow \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = A + B + C$$

В результате получается одно уравнение зависимости активности каталазы от перечисленных выше показателей:

$$\frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = M, \text{ где } M=A+B+C=const.$$

Модель, полученная для лабораторных показателей животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ

Для группы, облучённой ЭМИ КВЧ (Е), были отобраны наиболее точные линии регрессии, связывающие показатели ПОЛ и систем коагулянтов и антикоагулянтов. Для активности каталазы были получены зависимости от времени свёртывания крови, концентрации фибриногена, ПДФ и активности плазмينا:

$$\begin{aligned} \text{каталаза} &= 11,57309 + 0,08018 * t \text{ свёрт.крови} - 0,11611 * \text{ПДФ}; \\ \text{каталаза} &= -24,9283 + 4,1025 * \text{фибриноген}; \\ \text{каталаза} &= -6,18701 + 2,31905 * \text{плазмин}. \end{aligned}$$

Эти модели имеют высокую прогнозную точность. Коэффициент детерминации для первой модели составляет $0,96336$, для второй – $0,89655$, для третьей – $0,89499$.

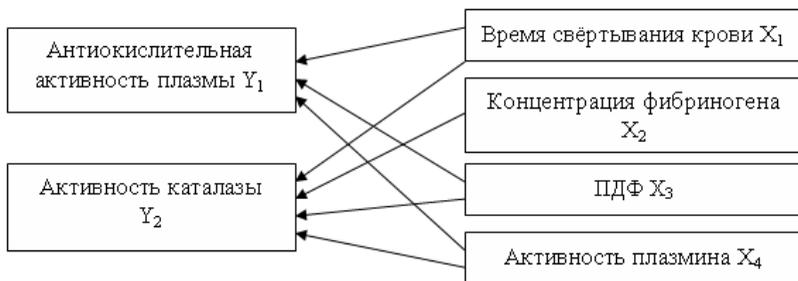
Высокую точность прогноза имеют также модели, полученные для антиокислительной активности плазмы. Это уравнения регрессии, которые выражают данный показатель через значения времени свёртывания крови, ПДФ и активности плазмينا:

$$\begin{aligned} \text{АА плазмы} &= 7,011287 + 0,147601 * t \text{ свёрт.крови}; \\ \text{АА плазмы} &= 18,04734 - 0,08373 * \text{ПДФ} + 1,14521 * \text{плазмин}. \end{aligned}$$

Доля «объяснённой» дисперсии для первой модели составляет $90,180\%$, для второй $95,381\%$.

Таким образом, наиболее сильная зависимость наблюдается между следующими показателями:

Все представленные на схеме зависимости являются линейными и могут быть выражены следующей системой дифференциальных уравнений:



$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} = A \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = B \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_4} = C \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_1} = D \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_2} = E \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_3} = F \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_4} = M \end{array} \right. \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_4} = A + B + C \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_3} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_4} = D + E + F + M \end{array} \right.$$

Модель, полученная для лабораторных показателей животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся воздействию ЭМИ КВЧ

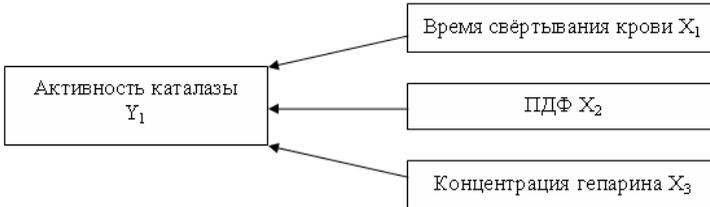
На основании корреляционной матрицы для данной группы (-Е) были получены линии регрессии для показателей, между которыми существует наиболее сильная зависимость. Это регрессионные модели зависимости активности каталазы от времени свёртывания крови, ПДФ и концентрации гепарина:

$$\begin{aligned} \text{каталаза} &= 10,24689 - 0,09143 * \text{ПДФ} + 19,78275 * \text{гепарин}; \\ \text{каталаза} &= 8,939955 + 0,091590 * t \text{ свёрт.крови} - 0,089771 * \text{ПДФ}. \end{aligned}$$

Доля «объяснённой» дисперсии для первого уравнения составляет 95,600 %, а для второго 95,536 %.

Таким образом, как и для группы, в которой не вводился фитомеланин, наиболее сильные зависимости наблюдаются между следующими показателями:

Так как эти зависимости являются линейными, они могут быть описаны с помощью системы дифференциальных уравнений:



$$\begin{cases} \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} = A \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} = B \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = C \end{cases} \Rightarrow \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = A + B + C$$

где коэффициенты А, В и С обозначают скорости изменения рассмотренных выше показателей ПОЛ в зависимости от показателей системы коагулянтов и антикоагулянтов. Мы получили одно уравнение: $\frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = M$, где $M=A+B+C=const$.

Модель полученная для лабораторных показателей животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся введению стволовых клеток

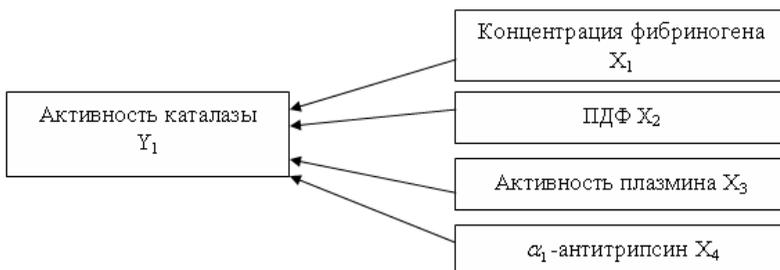
В результате корреляционного анализа в группе, подвергавшейся введению СК (S), были получены более низкие коэффициенты корреляции между показателями ПОЛ и систем коагулянтов и антикоагулянтов, чем в других группах. Уравнения регрессии получены для показателей, между которыми существует наиболее сильная зависимость. Это регрессионные модели

зависимости активности каталазы от концентрации фибриногена, ПДФ, активности плазмينا и α_1 -антитрипсина:

$$\begin{aligned} \text{каталаза} &= -14,8223 + 3,0493 * \text{фибриноген}; \\ \text{каталаза} &= 11,77231 - 0,08770 * \text{ПДФ} + 0,81875 * \text{плазмин}; \\ \text{каталаза} &= 43,85799 - 0,70680 * \text{трипсин}. \end{aligned}$$

Модели имеют достаточно высокую прогнозную точность. Коэффициент детерминации для первой модели составляет 0,85522, для второй – 0,89430, для третьей – 0,79598.

Таким образом, наиболее сильная зависимость получена для следующих показателей:



Все представленные на схеме зависимости являются линейными и могут быть выражены системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} = A \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} = B \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = C \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_4} = D \end{cases} \Rightarrow \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_4} = A + B + C + D$$

В результате получено одно уравнение:

$$\frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_4} = M, \text{ где } M=A+B+C+D=const.$$

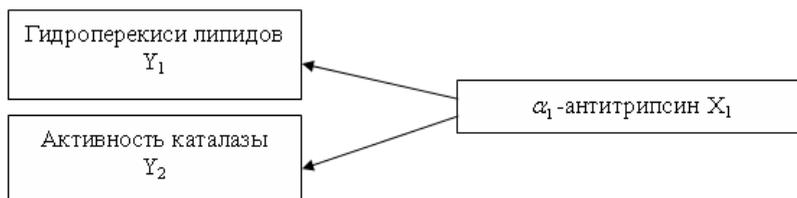
Модель, полученная для лабораторных показателей животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, не подвергавшихся введению стволовых клеток

Для этой группы характерна слабая зависимость между системами коагулянтов и антикоагулянтов и показателями ПОЛ, прогнозная точность регрессионных моделей в данной группе ниже, чем во всех рассмотренных группах. Наиболее точными являются уравнения зависимости гидроперекисей липидов и активности каталазы от α_1 -антитрипсина:

$$\begin{aligned} \text{ГП липидов} &= -1,39702 + 0,07792 * \text{трипсин}; \\ \text{каталаза} &= 19,82182 - 0,23468 * \text{трипсин}. \end{aligned}$$

Первая модель описывает 76,972 %, а вторая – 80,45 % дисперсии зависимой переменной.

Таким образом, наиболее сильные взаимосвязи наблюдаются между следующими показателями:



Так как эти зависимости являются линейными, то можно описать их с помощью следующей системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} = A \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_1} = B \end{cases} \Rightarrow \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_1} = A + B$$

где коэффициенты А и В обозначают скорости изменения рассмотренных выше показателей ПОЛ в зависимости от α_1 -антитрипсина. Мы получили одно уравнение:

$$\frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_1} = M, \text{ где } M=A+B=const.$$

Модель, полученная для лабораторных показателей животных с экспериментальной гипоплазией ККМ, подвергшихся сочетанному воздействию на них ЭМИ КВЧ и фитомеланина

Приведем наиболее точные линии регрессии, связывающие показатели ПОЛ и систем коагулянтов и антикоагулянтов в данной группе (Р+Е). Высокую прогнозную точность имеют уравнения зависимости активности каталазы от концентрации фибриногена, ПДФ, активности антитромбина III и α_2 -макроглобулина:

$$\begin{aligned} \text{каталаза} &= -24,3886 + 4,0267 * \text{фибриноген}; \\ \text{каталаза} &= 24,61296 - 0,19658 * \text{ПДФ}; \\ \text{каталаза} &= -34,7723 + 0,5491 * \text{антитромбин}; \\ \text{каталаза} &= 36,73725 - 5,43121 * \text{глобулин}; \end{aligned}$$

Коэффициент детерминации для первой модели составляет 0,89947, для второй – 0,91423, для третьей – 0,91375 и для четвертой – 0,91411.

Сильная линейная зависимость наблюдается также между антиокислительной активностью плазмы и такими показателями, как время свёртывания крови, ПДФ, активность антитромбина III, активность плазмина и α_2 -макроглобулин:

$AA \text{ плазмы} = 9,370048 + 0,125703 * t \text{ свёрт. крови};$

$AA \text{ плазмы} = 31,20140 - 0,14694 * ПДФ;$

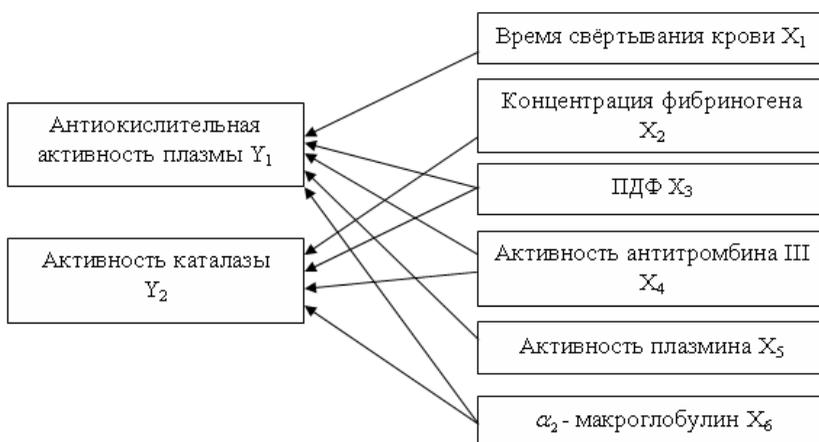
$AA \text{ плазмы} = -12,3427 + 0,4004 * \text{антитромбин};$

$AA \text{ плазмы} = 7,709787 + 1,788627 * \text{плазмин};$

$AA \text{ плазмы} = 39,93959 - 3,98967 * \text{глобулин}.$

Первая модель описывает 89,335 %, вторая 97,102 %, третья 92,381 %, четвёртая 90,477 % и пятая 93,776 % дисперсии зависимой переменной.

Наиболее сильная зависимость наблюдается между следующими показателями:



Все представленные на схеме зависимости являются линейными и могут быть выражены следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} = A \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} = B \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_4} = C \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_5} = D \\ \frac{\partial Y_1}{\partial X_6} = E \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_2} = F \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_3} = M \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_4} = N \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_6} = L \end{array} \right. \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y_1}{\partial X_1} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_3} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_4} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_5} + \frac{\partial Y_1}{\partial X_6} = A + B + C + D + E \\ \frac{\partial Y_2}{\partial X_2} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_3} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_4} + \frac{\partial Y_2}{\partial X_6} = F + M + N + L \end{array} \right.$$

Таким образом, приведенные в данном пункте математические модели и дифференциальные уравнения подтверждают выявленные у животных с экспериментальной гипоплазией ККМ патогенетические взаимосвязи между процессами свободно-радикального окисления и регуляции агрегатного состояния крови.

5. Изучение распространения законов «золотого сечения» и «золотого вурфа» на патогенетические взаимосвязи между показателями СРО и системы РАСК, полученными в экспериментах

В приведённых далее табл. 32-40 показаны полученные отношения для лабораторных показателей, отражающих процессы СРО и РАСК, активность которых измерялась в одних и тех же единицах измерения, при этом значения, наиболее близкие к обобщённым «золотым сечениям», выделены полужирным шрифтом, а наиболее близкие к «антиузлам» – полужирным курсивом.

Таблица 32

**Соотношения между показателями системы РАСК, полученными
в группах 1-5**

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Концентрация фибриногена, мкмоль/л (А)	10,50	7,60	8,25	8,25	9,40
α_2 -макроглобулин, мкмоль/л (В)	3,93	5,48	4,95	5,03	4,35
α_1 -антитрипсин, мкмоль/л ©	39,20	55,98	47,13	47,95	41,93
A/(A+B)	0,728	0,581	0,625	0,621	0,684
C/(A+C)	0,789	0,880	0,851	0,853	0,817

Таблица 33

**Соотношения между показателями системы РАСК, полученными
в группах 6-9**

Показатели	Группа 6	Группа 7	Группа 8	Группа 9
Концентрация фибриногена, мкмоль/л (А)	8,25	8,25	9,55	9,60
α_2 -макроглобулин, мкмоль/л (В)	5,05	5,15	4,20	4,13
α_1 -антитрипсин, мкмоль/л ©	48,50	46,63	42,60	41,68
A/(A+B)	0,620	0,616	0,695	0,699
C/(A+C)	0,855	0,850	0,817	0,813

Таблица 34

**Процентный состав обобщённых «золотых» сечений
при оценке соотношений показателей в системе PASC по группам**

Группы	ЗС (концентрация фибриногена + α_2 -макроглобулин), %	антиузы (концентрация фибриногена + α_2 -макроглобулин), %	ЗС (концентрация фибриногена + α_1 -антитрипсин), %	антиузы (концентрация фибриногена + α_1 -антитрипсин), %
Группа 1	100,0	0,0	25,0	75,0
Группа 2	0,0	100,0	25,0	50,0
Группа 3	100,0	0,0	25,0	25,0
Группа 4	100,0	0,0	25,0	75,0
Группа 5	100,0	0,0	75,0	25,0
Группа 6	75,0	0,0	25,0	75,0
Группа 7	100,0	0,0	100,0	0,0
Группа 8	50,0	50,0	75,0	25,0
Группа 9	25,0	75,0	75,0	0,0

Таблица 35

**Соотношения между показателями СРО, полученными
в группах 1-5**

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Супероксиддисмутаза, ОЕ/1 мг белка эритроцитов (А)	2,04	1,57	1,80	1,68	2,02
Гидроперекиси липидов, ОЕ/мл (В)	1,17	3,03	2,26	2,47	1,50
А+В	3,21	4,60	4,06	4,15	3,52
А/А+В	0,635	0,342	0,444	0,404	0,574

**Соотношения между показателями СРО, полученными
в группах 6-9**

Показатели	Группа 6	Группа 7	Группа 8	Группа 9
Супероксиддисмутаза, ОЕ/1мг белка эритроцитов (А)	1,69	1,71	2,40	2,47
Гидроперекиси липидов, ОЕ/мл (В)	2,24	2,19	1,55	1,54
А+В	3,93	3,89	3,94	4,00
А/А+В	0,429	0,439	0,608	0,616

Сравнивая полученные результаты (табл. 32-36) можно выявить следующие закономерности:

1. В контрольной группе обнаружено большое число соотношений между показателями, близких к классическим или к обобщенным «золотым сечениям». Это, с одной стороны, характеризует соответствие базовых лабораторных показателей систем РАСК и СРО норме, с другой стороны – является признаком устойчивости данных систем.

2. В группе животных, у которых была смоделирована экспериментальная гипоплазия КKM (вторая группа), наблюдается близость большинства соотношений к «антиузлам», что характеризует такую систему как неустойчивую, неравновесную.

3. Исследование соотношений лабораторных показателей в группах 3-9, в которых на животных с экспериментальной гипоплазией воздействовали различными модулирующими факторами, не дало ясного ответа о состоянии систем РАСК и СРО в этих группах, так как для одних и тех же групп при расчете соотношений показателей разными способами были получены разные результаты. Так, например, при расчете соотношений показателей между фибриногеном, α_2 -макроглобулином и α_1 -антитрипсином для четвертой группы была получена близость к классическому «золотому сечению». При расчете соотношений супероксиддисмутазой и гидроперекисями липидов для этой же

группы вообще не было выявлено каких-либо значимых с позиции правила «золотого сечения» результатов.

Для решения этих противоречий в группах 3-9, а также для подтверждения закономерностей в группах 1 и 2, по формуле (1) рассчитывалась относительная энтропия между лабораторными показателями. Результаты расчетов приведены в табл. 37-38.

Таблица 37

**Энтропия, рассчитанная для лабораторных показателей
в группах 1-9**

Показатели	Группа 1 (доли)	Группа 2 (доли)	Группа 3 (доли)	Группа 4 (доли)	Группа 5 (доли)
Концентрация фибриногена, мкмоль/л (А)	0,196	0,110	0,137	0,135	0,169
α_2 -макроглобулин, мкмоль/л (В)	0,073	0,079	0,082	0,082	0,078
α_1 -антитрипсин, мкмоль/л ©	0,731	0,811	0,781	0,783	0,753
Энтропия	0,673	0,559	0,610	0,607	0,649

Таблица 38

**Энтропия, рассчитанная для лабораторных показателей
в группах 6-9**

Показатели	Группа 6 (доли)	Группа 7 (доли)	Группа 8 (доли)	Группа 9 (доли)
Концентрация фибриногена, мкмоль/л (А)	0,133	0,137	0,169	0,173
α_2 -макроглобулин, мкмоль/л (В)	0,082	0,086	0,075	0,074
α_1 -антитрипсин, мкмоль/л ©	0,785	0,777	0,756	0,752
Энтропия	0,604	0,619	0,642	0,647

Результаты расчетов энтропии для лабораторных показателей в экспериментальных группах показали, что система про-

цессов СРО и РАСК является устойчивой в контрольной (первой) группе (энтропия близка к обобщенному «золотому сечению»), а также в третьей, четвертой, шестой и седьмой группах. Неравновесное состояние системы характерно для показателей второй, пятой, восьмой и девятой групп (энтропия близка к «антиузлам»).

Таким образом, в контрольной группе система показателей СРО и РАСК является устойчивой и близка к норме; в случае введения в организм цитостатиков такая система становится неравновесной. Устойчивость системы достигается при изолированном применении модулирующих факторов, а также при сочетанном применении фитомеланина и ЭМИ КВЧ, то есть факторов, обладающих наименьшей силой модулирующего эффекта. При воздействии факторов с наибольшей силой модулирующего эффекта (сочетанное воздействие ствольных клеток и ЭМИ КВЧ, ствольных клеток и фитомеланина, а также СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ) система показателей снова теряет равновесие и устойчивость.

Для оценки близости соотношений полученных показателей к нормальным значениям по формуле (2) вычислялись вурфы. Расчет вурфов показал, что наиболее близкие к «золотому вурфу» соотношения между показателями получены для первой, третьей, пятой, восьмой и девятой групп, то есть в контрольной группе и во всех группах, где применялись СК (табл. 39-40).

Таблица 39

Вурфы, рассчитанные для показателей СРО и системы РАСК в группах 1-5

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Растворимый фибрин, мкмоль/л ©	0,25	0,53	0,42	0,42	0,32
α_2 -макроглобулин, мкмоль/л (А)	3,93	5,48	4,95	5,03	4,35
Малоновый диальдегид, мкмоль/л (В)	0,81	2,03	1,33	1,63	1,06
W	1,238	1,178	1,233	1,184	1,225

Вурфы, рассчитанные для показателей СРО и системы РАСК в группах 6-9

Показатели	Группа 6	Группа 7	Группа 8	Группа 9
Растворимый фибрин, мкмоль/л ©	0,43	0,43	0,33	0,32
α_2 -макроглобулин, мкмоль/л (А)	5,05	5,15	4,20	4,13
Малоновый диальдегид, мкмоль/л (В)	1,61	1,61	1,10	1,13
W	1,189	1,191	1,225	1,207

Резюме

Была описана экспериментальная гипоплазия ККМ у животных, моделируемая путем внутривенного введения им цитостатика фторурацила, произведено сравнение относительной силы и разобраны механизмы изолированного, а также сочетанного действия в различных комбинациях на СРО и систему РАСК трех модулирующих факторов: СК, фитомеланина и ЭМИ КВЧ в условиях данной модели, проведен сравнительный корреляционный анализ и построены поверхности регрессии между показателями оксидантов и антиоксидантов, коагулянтов и антикоагулянтов, а также между показателями СРО и системы РАСК, полученными у животных, подвергшихся воздействию данных факторов. С помощью методов математического моделирования построены математические модели, подтверждающие полученные патогенетические взаимосвязи между активностью свободно-радикальных процессов и состоянием системы регуляции агрегатного состояния крови. Полученные зависимости между лабораторными показателями являются линейными и были описаны при помощи системы дифференциальных уравнений. Также было изучено распространение правил «золотого сечения» и «золотого вурфа» при оценке соотношений между показателями СРО и системы РАСК, полученными у всех экспериментальных животных.

Сравнение силы изолированного и сочетанного в разных комбинациях действия указанных выше модулирующих факторов на восстановление уровня процессов СРО и системы РАСК в условиях экспериментальной гипоплазии КKM с результатами корреляционного анализа, а также с установлением соотношений между данными показателями при помощи правила «золотого сечения» и «золотого вурфа» привело к обнаружению следующих закономерностей:

1. Экспериментальная гипоплазия КKM, развивающаяся на фоне введения цитостатиков, представляет собой неравновесную систему, что, возможно, связано с продолжающимся активным распадом клеток

2. Факторы, характеризующиеся относительно слабым модулирующим эффектом на восстановление уровня показателей СРО и системы РАСК в условиях экспериментальной гипоплазии КKM, а именно введение СК, введение фитомеланина, воздействие ЭМИ КВЧ, сочетанное воздействие ЭМИ КВЧ и фитомеланина, приводят или к усилению зависимостей, или к отсутствию влияния на зависимости между показателями СРО и системы РАСК и делают состояние системы данных показателей равновесным. Устойчивость такой системы обусловлена, вероятно, снижением активности распада клеточного субстрата.

3. Факторы, характеризующиеся относительно сильным (практически до уровня показателей контрольной группы) модулирующим эффектом на восстановление уровня показателей СРО и системы РАСК в условиях экспериментальной гипоплазии КKM, а именно сочетанное воздействие ЭМИ КВЧ и СК и сочетанное воздействие СК и фитомеланина, приводят к ослаблению зависимостей между показателями СРО и системы РАСК, то есть при воздействии этих факторов наблюдается неравновесное состояние системы, что подтверждается состоянием клеточного субстрата КKM, селезенки и печени, находящегося в состоянии активной пролиферации и дифференцировки при изучении морфологической картины данных органов в соответствующих экспериментальных группах. Таким образом, неустойчивость данной системы, образующаяся, несмотря на снижение уровня распада клеточного субстрата, приводит к сильному

усилению пролиферации клеток, которое также характеризуется нестабильностью.

4. Анализ соотношений показателей процессов СРО и системы РАСК с использованием законов «золотого вурфа» и «классических золотых сечений» позволил установить, что наиболее близкое к показателям контрольной группы соотношение наблюдается во всех группах, где животным с экспериментальной гипоплазией вводились стволовые клетки. Следовательно, механизм восстановления уровня СРО и системы РАСК посредством первичного восстановления клеточного субстрата является наиболее эффективным, другие механизмы (прямое воздействие на активность антиоксидантов и антикоагулянтов) могут рассматриваться лишь как вспомогательные.

ГЛАВА V

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КАРДИОЛОГИИ

1. Клинические результаты

Результаты применения клеточных технологий при кардиомиопатиях. Данная группа пациентов составили 13 человек, из них 9 человек – основная группа и 4 человека – контрольная. Средний возраст пациентов составил 35 ± 9 лет. В основной группе было 7 мужчин и 2 женщины, в контрольной – 1 женщина и 3 мужчин. У всех больных заболевание возникло после вирусной инфекции. Критерии включения:

- связь заболевания с вирусной инфекцией;
- фракция выброса (ФВ) менее 35 по данным Эхо-КГ;
- отсутствие онкологических и аутоиммунных заболеваний;
- добровольное согласие.

В данной группе пациентов, под контролем витальных показателей, клетки вводились системно, после установки внутривенного катетера размером 20G в кубитальную вену. Повторное введение клеток выполнялось через 30 ± 3 дней.

Учитывая характер и тяжесть заболевания, мы использовали только *фетальные клетки*, которые являются более эффективными по сравнению с аутологичными. Достаточно молодой возраст и тяжёлая патология не внушали оптимизма от использования *аутологичных клеток*, что явилось доводом для применения только *фетальных клеток*. По причинам тяжести заболевания и повторности выполнения процедуры решено было отказаться от других способов введения клеток: интракоронарного, интрамиокардиального и эндокардиального, остановившись на самом минимально травматичном методе введения. Процедуры, как первичные, так и вторичные, все пациенты, перенесли без особенностей. Осложнений не выявлено. Диагностика проводилась с использованием инструментария и приборов, которые имеются практически во всех стационарах. В частности, на контрольных точках до введения (P_0) через 1(P_1), 3(P_2) и 6(P_3) месяцев выполнялись исследование биохимических показателей крови, общие анализы крови и мочи, Эхо-КГ, нагрузочные пробы, опрос по

стандартизированным европейским опросникам. Достоверно значимых изменений в общих анализах крови и мочи не выявлено. В биохимических показателях отмечено уменьшение белков воспаления, в частности С-реактивного белка. Результаты Эхо-КГ показали достоверное увеличение *фракции выброса* (ФВ) от 5 до 12 абсолютных единиц, что составило в относительных единицах улучшение сократительной функции сердца до 43%. У некоторых пациентов отмечено уменьшение размеров сердца, оцениваемое по Эхо-КГ, хотя об этом говорить с достоверностью из-за небольшого количества наблюдений мы не можем. Те не менее тонус сердечной мышцы, за счёт которого увеличивается ФВ, возрастает. К 3-ем месяцам увеличилась устойчивость к физической нагрузке и её продолжительности. К 6 месяцу ни у одного из пациентов основной группы ухудшения состояния не зафиксировано. Дополнительных госпитализаций не потребовалось. Результаты опросников представлены в табл. 41.

Таблица 41

Результаты показателей обследования основной группы

Показатели	Основная группа		Контрольная	
	SF36(PH/MH)	EQ-5	SF36(PH/MH)	EQ-5
P ₀	37,52/38,85	0,401/40	34,37/59,32	0,508/45
P ₁	44,04/60,10	0,437/45	34,37/59,32	0,508/45
P ₂	47,58/69,60	0,508/56	34,37/59,32	0,508/45
P ₃	46,77/66,08	0,508/55	34,37/59,32	0,508/45

Примечание: Здесь и далее SF36 – опросник; EQ-5 – опросник; PH-оценка физического компонента здоровья; MH-оценка психологического компонента здоровья. Контрольные точки P₀-до введения клеток, P₁-через месяц после введения клеток, P₂-через 3 месяца, P₃-через 6 месяцев после введения клеток.

Механизмы коррекции патофизиологических нарушений при *кардиомиопатиях* при помощи клеточных технологий вытекают из особенностей повреждения миокарда. В частности, вирусная инфекция приводит к тяжёлым поражениям сердца. Естественно, что самостоятельно вирус вызвать поражение миокарда может в редких случаях, как правило, при совокупности

многих факторов, среди которых можно выделить генетические особенности. В развёрнутых стадиях сердечная недостаточность приводит к ухудшению качества жизни пациента с тяжёлыми ограничениями ежедневной активности пациента и высокими затратами на лечение. Патофизиологическая основа сердечной недостаточности – гибель *кардиомиоцитов*, которая приводит к недостаточной насосной функции сердца. В терминальных стадиях сердечной недостаточности обычно требуется более радикальное лечение – трансплантация сердца, которая в настоящее время в России сведена практически к нулю по многим причинам, в частности законодательной и экономической. При такой ситуации *клеточные технологии* (КТ) являются обнадеживающей возможностью продления и, самое важное, изменения качества жизни пациентов.

Преимуществом вводимых нами клеток являлась их гетерогенность, т.е. в своём составе они содержали не только гемопоэтические прогениторы, но также и мезенхимальные. Таким образом, нам удалось одномоментно воздействовать практически на все звенья восстановления сократительной способности миокарда. Поступление в кровь реципиента большого количества «свежих» цитокинов запускает целый каскад реакций, что приводит к увеличению выживаемости *кардиомиоцитов* реципиента и, соответственно, к улучшению сократительной функции миокарда. Каскад реакций заключается в а) уменьшении оксидативного стресса, б) увеличении экспрессии паракринных факторов, антиапоптозных и ангиогенных факторов.

2. Направления клеточной терапии в кардиологии

В последние десятилетия концепция восстановления миокарда очень быстро перешла от лабораторных разработок и научных изысканий в клинику для проведения клинических исследований. Проведённый анализ данных исследований подтверждает, что применение КТ приводит к улучшению фракции выброса левого желудочка (Иванов Д.В., 2009). Первичная цель всех исследований при использовании стволовых и прогениторных клеток была в улучшении функций миокарда и уменьшение

повреждённой, рубцово-изменённой ткани миокарда жизнеспособными *кардиомиоцитами*. Наиболее вероятно, что успех клеточной терапии при ишемизированном миокарде связан с паракринными и проангиогенными эффектами введённых клеток. Продолжается поиск оптимального пути введения клеток, дозировки, отбор пациентов для применения КТ, а также идентификация новых более эффективных клеточных популяций. Рассмотрим возможные направления дальнейших исследований.

2.1. Собственные СК сердца

Несколькими независимыми группами исследователей было обнаружено присутствие небольшого кластера клеток *Sca-1+*, *c-Kit+* и клеток *SP (side population)+* в предсердии и верхушке сердца. Данную группу сердца назвали *собственные СК сердца* (ССКС), и они наиболее часто обнаруживаются во время первых двух недель постнатального периода, который исчисляется сразу после родов. Доказано, что асимметричное деление ССКС приводит к появлению новых *кардиомиоцитов* (Messina E. et al., 2004). ССКС обладают свойством самообновления. У взрослого человека данная группа клеток находится в состоянии покоя в своих нишах. При возникновении ишемии ткани миокарда ССКС активируются благодаря паракринным эффектам и начинают делиться. Как правило, в повседневной жизни объем повреждений при инфаркте миокарда и скорость повреждений таковы, что не удаётся компенсировать дефекты благодаря делению собственных СК сердца.

Экспериментальными работами доказано, что ССКС могут быть эффективно изолированы из миокарда с помощью чрескожной биопсии и благодаря культуральным работам размножены до количества необходимого для восстановления миокарда. Работы на экспериментальных животных показали улучшение сократимости, уменьшение размеров инфарктной зоны. В настоящее время имеется несколько клинических исследований, в которых оценили безопасность и эффективность использования ССКС у больных с ишемической кардиомиопатией (www.clinicaltrials.gov; NCT00474461, NCT00981006). Данный вид клеток может быть

введён интракоронарно в инфарктную зону или произведено непосредственное обкалывание СК малофункциональной, но жизнеспособной области миокарда.

2.2. Генетически обработанные прогениторные клетки

Большое количество клинических исследований выполняется с использованием *аутологичных клеток*, полученных из костного мозга пациента. Данные исследования выполняются с использованием гетерогенной популяции клеток. Как правило, мононуклеарные клетки, полученные из костного мозга с помощью центрифугирования, содержат коммитированные клетки, небольшое количество прогениторных клеток и даже незначительное количество СК. Степень улучшения сократимости миокарда и улучшение перфузии поражённой области чрезвычайно разнообразно и скорее всего клинические эффекты, полученные в исследованиях с использованием *аутологичных* костномозговых клеток зависят от функциональной способности и количества прогениторных и СК, которые удаётся получить от пациента. Большая вариабельность результатов зависит от возраста пациента, длительности заболевания, тяжести болезни и др. Многочисленными работами показано, что у пациентов с сахарным диабетом эндотелиальные прогениторы, полученные из их костного мозга, имеют более низкую функциональную способность по сравнению с клетками от пациентов без сахарного диабета. У пациентов с сахарным диабетом отмечено также незначительное количество циркулирующих плюрипотентных клеток. У пациентов с ишемической кардиомиопатией в костном мозге мало эндотелиальных прогениторных клеток и их миграционная способность резко ухудшена (Kissel C.K. et al., 2007; Wojakowski W. et al., 2009). В других работах продемонстрировано укорочение теломер в прогениторных клетках, полученных из костного мозга и периферической крови у пациентов с поражением коронарных артерий (Spyridopoulos I. et al., 2008, 2009). В последнее время мнение, что введённые клетки вносят непосредственный вклад в восстановление миокарда, было изменено. Считается, что функциональное улучшение, полученное в клинических ис-

следованиях, обусловлено косвенными паракринными эффектами введенных клеток. Возможность генетической обработки клеток представляется теперь наиболее возможной и может улучшить функциональные способности вводимых клеток, включая высвобождение клетками вазоактивных и протективных субстанций. Другое направление для генетической инженерии – усиление сигнальных путей, приводящее к улучшению клеточной выживаемости, *хоуминга* и приживаемости клеток.

Важным фактором для мобилизации прогениторных клеток и получения эффекта клеточной терапии является *эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS)*, которая увеличивает миграционную способность клеток, повышенная выработка или усиление которой улучшает миграцию СК, вызванную *SCDF-1*, который является основным хемокином, регулирующим мобилизацию клеток, *хоуминг* и приживание. Данная тактика усилила ангиогенез на лабораторных животных (Kupatt S. et al., 2007). В клинике эта методика была апробирована в исследовании *ENACT-AMI (расширенная ангиогенная клеточная терапия острого инфаркта миокарда)*, когда использовались эндотелиальные прогениторные клетки с повышенной выработкой *eNOS*. Клетки были выделены с помощью афереза и трансфицированы человеческим *eNOS*-геном. Были получены положительные результаты у пациентов с использованием генетически модифицированных клеток в виде улучшения фракции выброса левого желудочка после 6 месяцев.

2.3. Аллогенные костномозговые клетки

К аллогенным клеткам относятся и *фетальные клетки* и *клетки пуповинной крови*. В данном разделе мы остановимся именно на *аллогенных клетках* из костного мозга донора. Функциональная недостаточность аутологичных клеток, полученных у пациентов с хронической сердечной недостаточностью ограничивает получение положительного результата, а генетическая модификация таких клеток не всегда возможна. Реально использование *аллогенных клеток* от здоровых доноров, содержащих МСК, поскольку они иммунопривилегированы и не отторгаются

из-за высвобождения иммуномодулирующих факторов и ингибирования Т-клеточной пролиферации. МСК составляют малую часть клеток костного мозга (0,001–0,01 % клеток), но они могут быть получены также из жировой ткани, размножены *in vitro* и криоконсервированы. Таким образом, у пациентов с острым повреждением миокарда или левожелудочковой недостаточностью появляется возможность дополнительного способа лечения, не дожидаясь результатов культивирования собственных клеток. На рынке появились клеточные продукты типа «*Prochymal*», которые проходят клинические испытания у пациентов с сердечной недостаточностью. Потенциал МСК, предифференцированных в кардиомиоцитарном направлении, продолжает изучаться. Благодаря биоинженерии, МСК могут быть преобразованы для повышенной экспрессии факторов, увеличивающих дифференцировку и приживаемость. Ещё одно направление потенциального интереса для аллогенной трансплантации – *взрослые мультипотентные прогениторные клетки* (MAPC).

2.4. Популяция *VSELs* клеток

В костном мозге взрослого человека содержатся популяции клеток, которые могут вносить свой вклад в восстановление миокарда и эндотелия, а также небольшая популяция негемопоэтических клеток, демонстрирующих морфологические и функциональные свойства *эмбриональных плюрипотентных СК* (*PSC*). Маленький размер (3–6 μm), наличие *PSC* маркеров, чёткие морфологические признаки (открытый хроматин, большое ядро, узкая оправа цитоплазмой с множественными митохондриями) и способность дифференцироваться в 3 зародышевых листка – позволило назвать данные клетки «очень маленькими эмбрионально-подобными стволовыми клетками» (*VSELs*-клетки) (Kucia M. et al., 2006, 2008). Предполагается, что *VSELs*-клетки происходят из СК эпибласта и формируют пул покоящихся *PSC*, находящихся в костном мозге, сердце и других органах во время раннего органогенеза. Присутствие *VSELs*-клеток было обнаружено в пуповинной крови и периферической крови взрослых (Ratajczak M.Z. et al., 2009). Во время острого инфарк-

та миокарда и экспериментального инфаркта миокарда у мышей отмечается быстрая мобилизация *VSELs*-клеток из костного мозга в периферическую кровь. На циркулирующих *VSELs*-клетках найдены плюрипотентные маркеры, такие как ранний кардиальный и эндотелиальный транскрипционный факторы (Wojakowski W. et al., 2009). Эти находки подтверждают, что циркулирующие *VSELs*-клетки из костного мозга могут быть важным механизмом в восстановлении миокарда. На экспериментальных моделях острого инфаркта миокарда у мышей прямое интрамиокардиальное введение *VSELs*-клеток улучшило общую и региональную сократимость левого желудочка и уменьшило гипертрофию миокарда, причем удалось это сделать небольшим количеством клеток.

2.5. Преднаправленные мезенхимальные кардиопоэтические клетки

Плюрипотентные и мультипотентные клетки могут дифференцироваться в различные клеточные линии. Это позволило подготавливать клетки факторами, имеющими характеристики раннего эмбрионального развития сердца для направления их дифференцировочного потенциала в кардиальном направлении. Эти сигнальные факторы были идентифицированы с помощью сравнительного геномного и протеомического анализа, осуществлённого на эндодермальном секретоме, который в паракринной манере управлял унипотентными *кардиомиоцитами* коммитированными из ЭСК (Faustino R.S. et al., 2008; Behfar A. et al., 2008; Arrell D.K. et al., 2008). Это направление в настоящее время проходит клиническое испытание на 2 и 3 фазах. В исследовании включены 240 пациентов со 2–3 классом сердечной недостаточности по *NYHA*, с фракцией выброса, сниженной до 15–40% и наличием в анамнезе инфаркта миокарда. Пациентам вводились аутологичные МСК из костного мозга, обработанные с помощью сигнальных факторов в виде «кардиомиогенного коктейля». Введение осуществлялось в дисфункциональный, но жизнеспособный миокард с использованием *NOGA* системы. Исследование продолжается. (www.clinicaltrials.gov; NCT00810238).

2.6. Индуцированные плюрипотентные СК

Индукцированные плюрипотентные СК (iPS) – это клетки, полученные с помощью преобразования взрослых соматических клеток, например фибробластов, с помощью повышенной экспрессии репрограммированных факторов, которые связаны с генами СК, таких как *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, с-Мус. Такое эпигенетическое репрограммирование приводит к изменению фенотипа взрослых клеток, что делает их схожими с эмбриональными СК, в частности по присутствию *раннего эмбрионального маркера (SSEA-1)* и способностью генерировать клетки из всех зародышевых листков у химерных животных после введения на ранней стадии эмбриогенеза. В отличие от ЭСК, использование *iPS* клеток не несёт этических проблем, так как они генетически идентичны донору (Yamanaka S., 2007). Исследования показали, что *iPS* клетки эффективно дифференцируются в линии клеток сердца, что проявляется в экспрессии ранних кардиальных маркеров. Экспрессия маркеров возникает из-за кардиальной структуры протеинов, которая приводит к формированию спонтанно сокращающихся *кардиомиоцитов*, связывающих разорванные между *кардиомиоцитами* связи. По некоторым физиологическим характеристикам *кардиомиоциты*, полученные из *iPS* клеток не отличаются от *кардиомиоцитов*, полученных из ЭСК, но имеются некоторые различия в электрофизиологических характеристиках (Martinez-Fernandez A. et al., 2009). Уже проведены работы по использованию *iPS* клеток для регенерации миокарда на мышинных моделях острого инфаркта миокарда. При введении интрамиокардиально 2×10^5 *iPS* клеток они стабильно прижились и не отторгались в течении месяца в миокарде иммунокомпетентных реципиентов. Отмечено достоверное улучшение сократимости левого желудочка и увеличение толщины стенки желудочка. Гистологические данные подтвердили, что *iPS* клетки участвовали в регенерации миокарда, эндотелия и уменьшали фиброз (Nelson T.J. et al., 2009). Можно считать, что создание *iPS* клеток открыло новый виток научных исследований в изучении регенерации миокарда. Сейчас исследования направлены на изучение их способности формировать клетки предсердий, желудочка и проводящей сис-

темы (Gersh B.J. et al., 2009). До прихода этих идей в клинику достаточно далеко, потому что необходимо изучить отдалённые результаты на лабораторных животных.

Отражённые в данной главе новые направления в развитии клеточных популяций, которые будут стремиться в клинику, докажут свою эффективность и жизнеспособность со временем. В настоящее время в клинике продолжают совершенствоваться и отрабатываться уже апробированные методы и способы. Выводы о жизнеспособности того или иного вида клеточной популяции будет делать каждый специалист, основываясь на своём опыте или полученных знаниях.

ГЛАВА VI

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ГЕПАТОЛОГИИ

1. Клеточные технологии при вирусном поражении печени

Мы акцентировали своё внимание на применении КТ у больных вирусным гепатитом В и С, которые выбраны, потому что вирус гепатит А очень редко (менее 2 % случаев) переходит в хроническую форму и вызывает цирротические изменения в печени. Вирус гепатита Д, как правило, идёт совместно с ХГБ. Встречаемость вируса гепатита Е в настоящее время крайне мала. Учитывая, что вирусы гепатита имеют внепеченочные источники локализации, мы не использовали у пациентов аутологичные клетки и применяли только *аллогенные клетки*. В качестве аллогенных клеток использовались *фетальные клетки*. Материалом для получения клеток служила фетальная печень 2-го триместра гестации. Весь клеточный материал проходил проверку для исключения вирусной, бактериологической и микологической контаминации. В дальнейшем клеточный материал криоконсервировался. Непосредственно перед введением клетки размораживали и проверяли жизнеспособность, которая составляла не менее 92 %. В исследование были включены пациенты, которые не могли пройти полностью курс лечения пегилированными интерферонами и прервали его из-за осложнений (депрессии, лейкопении, диспепсии, аритмии).

В группе было 25 человек, из которых 5 человек (2 женщины и 3 мужчины) – контрольная группа, и 20 человек, из которых 18 мужчин и 2 женщины, – основная. Распределение пациентов по группам представлено в табл. 42.

Возраст в основной группе составил $43,2 \pm 5,6$ лет. В анамнезе у каждого из основной группы было не менее 2 попыток проведения курса лечения пегилированными интерферонами. Большинство пациентов ($n=15$) с *хроническим гепатитом С* (ХГС). Большинство пациентов вируса гепатита С было с подтипом 3b, 5 пациентов – с подтипом вируса 1a.

Распределение пациентов по группам

	Основная группа	Контрольная группа
Пол	Муж – 18; жен – 2	Муж – 3; жен – 2
Возраст	43,2±5,6	41±3,2
Вирус С	3b (10 чел.); а (5 чел.)	3b (2 чел.); 1a (1чел)
Вирус В и D	В (3 чел); В+D (2 чел)	В (1чел); В+D (1 чел)
Количество	20	5

Примечание: 1a – генотип вируса С; 3b- генотип вируса С

Перед введением клетки реконсервировались и в асептических условиях подготавливались. Клетки вводились минимум за месяц до начала курса противовирусной терапии.

Клетки вводили системно после установки внутривенного катетера размером 20G. Во время процедуры введения проводился постоянный мониторинг витальных функций. Осложнений во время введения и в периоде наблюдения не выявлено. Все пациенты процедуры перенесли без особенностей.

Результаты оценивали ежемесячно. Данные представлены в табл. 43.

Результаты выполнения биопсии печени представлены в табл. 44. Оценка результатов проводилась по методике Knodell. Количество пациентов, которые дали согласие на проведение биопсии – 7 человек.

Все пациенты смогли пройти курс противовирусной терапии. Отмены препаратов не понадобилось. Пациентами отмечено, что курс противовирусной терапии перенесли намного лучше, чем попытки предыдущих курсов. У пациентов с вирусом гепатита С 3b после завершения курса противовирусной терапии в периферической крови при повторных исследованиях вирус не обнаруживался, что позволило считать их излечившимися. Данные по обнаружению вирусов в крови пациентов представлены в табл. 45.

Динамика изменения лабораторных показателей у больных с гепатитом С в основной группе

Сроки/ показатели	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
АлАТ	123±23,5	126±13,5	83±3,5	86,3±6,5	102±21,1	96,9±3,5	87,1±6,5	102,7±13,5
АсАТ	148±13,4	159±14,8	82±23,5	110±22,1	106±17,3	125,7±13,7	100±3,6	109±3,9
Эритроциты	4,5±0,5	4,2±0,4	4,2±1,1	4,5±0,9	4,1±0,3	4,1±0,1	4,2±0,3	4,5±0,1
Лейкоциты	4,1±0,4	4,5±0,5	5,9±3,5	3,2±0,2	5±1,3	2,9±0,2	3,9±0,3	3,8±0,5
Тромбоциты	170±22,6	173±23,7	147±22,2	152±16,6	126±19,3	120±11,5	115±9,9	121±7,5
МНО	1,2±0,1	1,3±23,5	1,2±23,5	1,4±23,5	1,5±23,5	1,5±23,5	1,4±23,5	1,4±0,1

Примечание: P0 – до введения клеток; P1 – начало противовирусной терапии, через месяц после введения клеток; P2 – 2 месяца; P3 – 3 месяца; P4 – 4 месяца; P5 – 5 месяцев; P6 – 6 месяцев; P7 – через месяц после завершения курса противовирусной терапии.

Таблица 44

Результаты исследования биоптатов у больных с гепатитом В

Сроки/группа	P0	P1
Основная	12*	10,4*
Контрольная	11,5*	12*

Примечание: * – оценка результатов проводилась по методике Knodell. P0 – до введения клеток и начала терапии; P1 – после завершения противовирусной терапии.

У больных с вирусным гепатитом С генотип 1а – положительного результата удалось достигнуть у 50 %. В ситуации с гепатитом В, который, как правило, протекал совместно с гепатитом Д излечения не достигнуто. Однако отмечено выраженное уменьшение синдрома цитолиза.

Таблица 45

Динамика обнаружение маркеров гепатитов В и С

Группы/сроки		P0	P1
Основная	С 1а	antiHCV- пол.(5 чел)	antiHCV- пол.(3 чел) antiHCV- отр.(2 чел)
	С 3b	antiHCV- пол.(10 чел)	antiHCV- отр.(10 чел)
	В	HBsAg – пол.(5 чел)	HBsAg – пол.(5 чел)
Контрольная	С 1а	antiHCV- пол.(1 чел)	antiHCV- пол.(1 чел)
	С 3b	antiHCV- пол.(2 чел)	antiHCV- пол.(2 чел)
	В	HBsAg – пол.(5 чел)	HBsAg – пол.(5 чел)

Примечание: С1а, С3b – разновидности гепатита С. P0 – до введения клеток; P1 – через месяц после завершения курса противовирусной терапии.

2. Клеточные технологии при невирусном поражении печени

Определена группа пациентов с токсическим поражением печени вследствие злоупотребления алкоголем. Наследственные поражения, поражения тяжёлыми металлами или лекарственными препаратами – исключились.

В данной группе исследовались 15 человек, из которых 12 – основная группа, и 3 – контрольная группа (табл. 46). У всех обследуемых отмечалось хроническое поражение печени после длительного злоупотребления алкоголем (стаж не менее 3 лет). Возраст пациентов $52,3 \pm 4,1$ года. Основное требование по включению в группу – прекращение употребления алкоголя. Противопоказаний для проведения лечения с применением КТ не выявлено.

Таблица 46

Распределение пациентов по группам

		Основная группа	Контрольная группа
Пол	Мужчины	9	2
	Женщины	3	1
Возраст (год)		$51 \pm 5,5$	$52 \pm 1,2$
Количество		12	3

Пациентам основной группы проводилось однократное введение *аллогенных (фетальных) клеток* в дозе 100 млн. Введение проводилось системное (внутривенное) под контролем основных витальных функций.

Все обследуемые основной и контрольной группы проходили стандартное обследование на контрольных точках: до введения (P_0), через 1(P_1), 3(P_2) и 6(P_3) месяцев после введения клеток. Все пациенты основной группы дали письменное согласие на проведение КТ. На биопсию печени дали согласие только 2 пациента (1 – контрольной и 1 – основной группы). Основные показатели которые контролировались на контрольных точках: АсАТ, АлАТ, ГГТП, ХЭ, билирубин, общий анализ крови, УЗИ печени (P_0 и через 6 месяцев), опросники (*SF-36*, *EQ-5*). Динамика изменений лабораторных показателей представлена в табл. 47. Изменения в оценке качества жизни по результатам опросников представлены в табл. 48.

Таблица 47

**Динамика изменения лабораторных показателей у
пациентов основной и контрольной групп**

Показатели/сроки		P0	P1	P2	P3
АсАТ	Осн	59±3,5	56±1,8	52±3,2	54±0,7
	Кон	53±2,4	56±2,5	52±3,1	61±0,2
АлАТ	Осн	45±2,5	40±1,4	43±1,1	39±2,1
	Кон	47±1,3	46±1,5	48±0,9	46±1,4
ГГТП	Осн	85±1,5	60±4,8	54±3,6	45±2,3
	Кон	74±2,7	68±1,3	59±3,4	90±0,2
ХЭ	Осн	11500±2300	9500±460	10000±1500	6500±760
	Кон	12900±1400	11500±1300	13500±280	10500±3243
Билирубин	Осн	32,4±0,3	28,2±0,9	26,1±1,1	24,3±1,2
	Кон	28,4±0,6	26,4±0,2	24,4±0,3	22,4±0,8
Эритроциты	Осн	4,4±0,5	4,9±0,4	4,2±1,1	4,5±0,9
	Кон	4,8±0,3	4,2±0,7	4,4±1,6	4,7±0,2
Гемоглобин	Осн	126±13,4	146±5,7	142±7,3	151±4,6
	Кон	130±5,2	132±4,6	134±3,8	132±4,3
Лейкоциты	Осн	4,1±0,4	4,5±0,5	6,9±0,8	8,2±0,8
	Кон	4,5±0,2	4,8±0,5	5,9±3,5	7,2±0,2

Примечание: Осн – основная группа; Кон – контрольная группа.

Таблица 48

Динамика изменений по опросникам SF-36, EQ-5

Группа	опросник	Контрольные точки			
		P0	P1	P2	P3
Основная	SF36(PH/MH)	40,53/47,16	46,34/72,08	56,77/67,51	56,77/67,51
	EQ-5	0,761/60	0,810/80	0,827/80	0,827/80
Контрольная	SF36(PH/MH)	40,53/47,16	45,83/49,20	46,35/56,86	46,35/56,86
	EQ-5	0,761/60	0,707/60	0,707/70	0,707/70

Все пациенты получали стандартное лечение, включающее элиминацию этиологического фактора, высокоэнергетическую диету с большим содержанием белка, эссенциальные фосфоли-

пиды, витамины группы В. На препаратах, полученных при биопсии – гистологические изменения, соответствующие воспалению в отсутствие признаков цирротической трансформации.

При анализе лабораторных и инструментальных данных, а также данных контрольных осмотров и опросников, мы выяснили, что не все пациенты прекратили потребление алкоголя. Наиболее чётко это проявлялось в контрольной группе.

Использование клеточных технологий в комплексном лечении пациентов с вирусным поражением печени обусловлено следующими механизмами:

1. *Восстановление гепатоцитов.* Длительно существующее инфицирование вирусом *гепатоцитов* неминуемо приводит их к гибели и выходу вируса в кровь и внедрение в новые клетки. Повреждённые клетки заменяются новыми или соединительной тканью. Вводимая суспензия *аллогенных (фетальных) клеток* содержит печёночные прогениторы, которые стимулируют образование и дифференциацию клеток от овальных через *гепатоциты* 1 порядка ко 2-ому и полностью дифференцированным *гепатоцитам* 3-го порядка.

2. *Усиление выработки интерферонов.* Интерфероны вырабатываются при повреждении клетки вирусом. Это защитный механизм. Подразделяются на α , β , λ . Интерферон- β ключевой компонент среди семейства интерферонов в клеточной защите против ХГС, и также благодаря паракринному эффекту ограничивает распространение вируса от клетки к клетке (Gale Jr. M., Foy E.M., 2005), начинает определяться через 2 недели после инфицирования и держится в течение 2 месяцев после появления (Lazaro C.A. et al., 2007).

3. *Стимуляция иммунной системы.* Происходит через опосредованные эффекты. В гетерогенной суспензии находятся *гемопоэтические СК*. Известно, что печень на данных сроках развития выполняет кроветворную и иммунную функцию. Данные клетки стимулируют активизацию внутренних макрофагов печени. Важную роль в данном процессе играют «*натуральные киллеры*» (НК), особенно против гепатотропного вируса С, которые запускают цитолитическую функцию вирус-специфичных Т-клеток благодаря продукции интерферона, однако могут также напрямую вызывать

апоптоз в инфицированных *гепатоцитах*. НК вызывают супрессию рибонуклеиновой кислоты вируса гепатита С, содержащегося в *гепатоцитах*. Имеются подтверждения, что персистенция вируса гепатита С может быть связана именно с неадекватным ответом НК на вирус гепатита С как в крови, так и в самой печени. В данном случае успех после применения интерферонов у больных с хроническим гепатитом С связывается с активизацией НК.

4. *Депонирование в нишах СК*. Сохранение в нишах прогениторных клеток, присутствующих в суспензии, позволяет пациентам перенести курс тяжёлой противовирусной терапии. Повидимому, клетки постепенно выходят в кроветворное русло и запускаются в работу.

5. *Каскад ауто и паракринных эффектов*. При запуске данного механизма идёт активная борьба между отложением нитей фибрина и резорбцией нитей коллагена. В данном механизме активное участие принимают клетки Ито (звездчатые), а также матриксные металлопротеиназы. Активно участвуют цитокины и ростовые факторы.

При токсическом поражении печени, в частности, алкоголем, проводимая лекарственная терапия принесла свой положительный эффект и, возможно, важным фактором в восстановлении основных функций печени была элиминация токсического агента. Однако достоверно отмечено, что скорость наступления положительных эффектов и их выраженность превалировала именно в основной группе, где вводились ФК. По нашему мнению, данный эффект связан со стимуляцией процессов восстановления печени цитокинами и ростовыми факторами, которые в большом количестве присутствуют в клеточной суспензии, полученной из фетальной печени. Наибольшую роль в данной процессе играют несколько ростовых факторов, в частности *фактор роста гепатоцитов (HGF), преобразовывающий фактор роста альфа (TGFA), гепарин связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF)*. *HGF* и *TGFA* являются стимуляторами роста *гепатоцитов* в культуре, *HGF* продуцируется непаренхиматозными клетками в печени и воздействует на *гепатоциты* с помощью паракринных и эндокринных механизмов (Peddiaditakis P. et al., 2001). *TGFA* и *HB-EGF* относятся к семей-

ству эпидермальных ростовых факторов и воздействуют через рецепторы на окислительное фосфорилирование, что приводит к репликации ДНК. *TGF α* продуцируется *гепатоцитами* и осуществляет функционирование через аутокринный механизм, так как *гепатоциты* продуцируют лиганды и содержат подходящие рецепторы для связывания (Mead J.E., Fausto N., 1989). *HB-EGF* связывает начало и прогрессию регенерации печени (Mitchell C. et al., 2004). Получается, что эти три фактора роста оказывают уникальное воздействие на репликацию и выживаемость *гепатоцитов*, а также необходимы для оптимальной регенерации. На фоне восстановления функциональных свойств клеток печени снижается токсическое действие аммиака, меркаптанов и ароматических аминокислот. На фоне снижения интоксикации улучшается психоэмоциональный фон, повышается физическая активность, что отражается на самостоятельной оценке пациентов своего здоровья выполненной с помощью специализированных опросников.

ГЛАВА VII

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В НЕВРАЛОГИИ

Результатом повреждения спинного мозга является разрушение нервной ткани и, как следствие, утеря моторной и сенсорной функции, а методов восстановления повреждённой нервной ткани не имеется, и сохранение функций зависит от степени повреждения. Надежды, возлагаемые на СК и прогениторные клетки, связаны со свойством данных клеток поддерживать восстановление повреждённой нервной ткани, что подтверждено на экспериментальных моделях с повреждением спинного мозга. Разрабатываются технологии по направленной дифференцировке СК и прогениторных клеток в *нейрональном* и *глиальном* направлениях для последующего замещения повреждённой ткани. Опосредованный косвенный эффект восстановления нервной ткани связывают с нейропротективным и аксонрегенерирующим действием трансплантированных клеток.

Во время эмбриогенеза СК пролиферируют, мигрируют и формируют организм, присутствуя в нервной системе, в частности. Находясь в нервной ткани, они могут дифференцироваться в *нейроны* (Eriksson P.S. et al., 1998). С момента идентификации и характеристики СК их потенциал стал чрезвычайно перспективен для исследования возможности лечения повреждений спинного и головного мозга, а также дегенеративных поражений головного мозга (Polak J.M., Bishop A.E., 2006). СК определяются, благодаря их способности самообновляться и тотипотентности. Самообновление характеризуется способностью подвергаться асимметричному делению, в результате которого одна клетка остаётся стволовой, причём без признаков «старения», а вторая клетка начинает дифференцироваться в одном из направлений развития зародышевых листков. Отметим, что СК долгое время могут находиться в «покоящемся» состоянии. Направление дифференцировки следующее: *тоти-плюри-мульти-унипотентные клетки*, что соответствует уменьшению дифференцировочного потенциала клеток. *Плюрипотентные клетки* дифференцируются в *мультипотентные клетки* 3 зародышевых

лишков. Это эктодермальный слой, из которого происходит нервная ткань, мезодермальный слой (соединительная ткань, мышцы, кости, клетки крови) и энтодермальный слой (желудочно-кишечный тракт и внутренние железистые органы).

После повреждения спинного мозга включаются эндогенные процессы восстановления, свидетельствующие о том, что нервная ткань предпринимает попытки самостоятельной репарации. Шванновские клетки, отвечающие за миелинизацию и регенерацию в периферической нервной системе, начинают мигрировать из корешков спинного мозга в повреждённую ткань и обеспечивать процессы миелинизации аксонов спинного мозга (Takami T. et al., 2002). В повреждённых нейронах увеличивается экспрессия генов связанных с регенерацией (Martens D.J. et al., 2002; Gardiner P. et al., 2005). Сразу же местно проявляется залповый выброс пролиферирующих взрослых стволовых и прогениторных клеток (Martens D.J. et al., 2002; Mothe A.J., Tator C.H., 2005; Ke Y. et al., 2006). Однако, рост аксонов ограничен ингибиторами роста, находящимися в олигодендроцитном миелиновом дебрисе и клетках, которые участвуют в формировании рубцовой ткани (Silver J., Millet J.H., 2004; Galtrey C.M. et al., 2007; Tian D.S. et al., 2007). Вновь появившиеся СК и прогениторные клетки функционально не интегрируются в повреждённую ткань спинного мозга. Таким образом, эндогенные регенераторные силы, которые проявляются сразу после повреждения, не достаточны для восстановления повреждённого спинного мозга. Улучшение функционального исхода после повреждения спинного мозга может быть активировано с помощью нейропротективных мероприятий, которые будут ограничивать вторичные потери нервной ткани и, таким образом, уменьшать потерю функциональных свойств. Как альтернатива, функциональное восстановление может быть активировано методами ускоряющими рост аксонов, которые в результате приводят к репарации повреждённых и/или формированию новых аксоновых связей, а те, в свою очередь, становятся вовлечёнными в передачу сигналов и, соответственно, обеспечивать восстановление функциональных свойств. Однако имеется неопределённость в отношении того, что *стволовые и нейрональные про-*

гениторные клетки могут стать неоценимым компонентом в стратегии восстановления повреждённого спинного мозга. Эти клетки могут становиться нервными клетками, поддерживающими анатомическое или функциональное восстановление. Как вариант, они могут секретировать ростовые факторы, которые поддерживают нейропротективное действие и/или регенерацию аксонов. Потенциал СК или прогениторных клеток в восстановлении повреждённого спинного мозга сейчас активно изучается (Teng Y.D. et al., 2006; Coutts M., Keirstead H.S., 2008; Hardy S.A. et al., 2008). Стали понятны также и недостатки СК и прогениторных клеток (Chen C.P. et al., 2007; Zietlow R. et al., 2008). В последнее десятилетие СК изучались без включения чётких критериев СК как таковых, т.е. их чёткой идентификации. Следовательно, терапевтический потенциал истинных стволовых/прогениторных клеток все ещё не ясен. Другие аспекты, связанные с использованием стволовых/про-гениторных клеток для восстановления повреждённого спинного мозга, необходимо решить до начала широкого клинического применения в практике. Это вопросы получения клеток. Как клетки могут быть получены? Действительно так ли уж необходимо их дифференцировать в лабораторных условиях до введения пациенту? Как могут выжить пересаженные стволовые/прогениторные клетки? Каким образом избежать неконтролируемого деления и дифференцировки (Keirstead H.S. et al., 2005)? Вопросы улучшения функциональной интеграции трансплантированных клеток также остаются открытыми.

1. Механизмы воздействия на повреждённую нервную ткань

1.1. Замещение погибших клеток в повреждённом спинном мозге

Принимая во внимание способность СК становиться любой клеткой организма, важно использовать их потенциал для стратегии замещения погибших клеток в повреждённом спинном мозге. В соответствующей комбинации ростовых факторов («индукционный коктейль»), ЭСК могут быть использованы для

получения нейронов и глиальных клеток (Liu S. et al., 2000; Bilon N. et al., 2006). Данное утверждение было подтверждено на лабораторных моделях, когда нейроны, полученные из ЭСК, выживали и интегрировались после введения в повреждённый спинной мозг крыс (Deshpande D.M. et al., 2006). Было показано, что миелинизированные аксоны, полученные из мышинных ЭСК, приживались у породы миелин-дефицитных крыс (Brüstle O., 1999). Имеются и другие работы, подтверждающие верность указанных выше предположений. В частности, у крыс с повреждённым нормальным (без генетических дефектов) спинным мозгом пересаженные мышинные клетки, полученные из ЭСК мышей, улучшали функциональное восстановление (McDonald J.W. et al., 1999). Важно отметить, что клетки, полученные из ЭСК, были обнаружены в повреждённом спинном мозге и не погибли, подтверждая, что таким способом можно получить хорошие отдалённые результаты (Jendelova P. et al., 2004). Человеческие ЭСК могут быть направлены в мультипотентные нервные предшественники (Carpenter M.K. et al., 2001), моторные нейроны (Li X.J. et al., 2005; Lee H. et al., 2007) и олигодендроцитные прогениторные клетки (Keirstead H.S. et al., 2005; Nistor G.I. et al., 2005). Сейчас уже получены результаты дифференцировки в зрелые олигодендроциты *in vitro* и *in vivo* (Nistor G.I. et al., 2005). Более того, эти клетки способны миелинизировать аксоны после введения в спинной мозг у миелин-дефицитных (*shiverer*) мышей и взрослых крыс (Keirstead H.S. et al., 2005). Нейральные прогениторные клетки (мультипотентные клетки, из которых развивается центральная нервная система) очень часто агрегируют в нейросферы. Продемонстрировано, как нейральные прогениторные клетки, введённые в повреждённый спинной мозг у крыс, предпочтительно дифференцируются в астроциты. Эти результаты говорят о необходимости разработки дифференцировочного протокола до введения клеток (Cao Q.L. et al., 2002). Генетически модифицированные фетальные нервные предшественники активно экспрессируют белок *noggin*, который является антагонистом белка BMP, дифференцируются предпочтительно в нейроны и олигодендроциты. Введение таких клеток в повреждённый спинной мозг мышей приводил в итоге к улучшению

функционального исхода (Setoguchi T. et al., 2004). Однако, этот результат тем же самым методом не удалось воспроизвести другим исследователям (Enzmann G.U. et al., 2005). Человеческие нейральные прогениторные клетки, как правило, получают из эмбриона на стадии бластоцисты и затем в лабораторных условиях получают функциональные нейроны и глию (Nunes M.C. et al., 2003). После того как человеческие нейральные прогениторные клетки были введены в повреждённый спинной мозг крыс, некоторые из них были найдены дифференцированными в олигодендроциты. Более того, данные находки сопровождались улучшением функционального исхода (Cummings B.J., 2005, 2006).

МСК, полученные из костного мозга, также могут служить для терапевтических целей при восстановлении повреждённого спинного мозга (Nandoe Tewarie R.D., 2006; Part A.M., 2007). Хотя продолжаются дискуссии (Castro R.F., 2002), показано, что определённые группы взрослых СК легко дифференцируются в костные, жировые клетки, а также клетки сухожилий и хрящей (Pittenger M.F. et al., 1999). Давно известно, что эти клетки спокойно могут трансдифференцироваться *in vitro* в клетки печени (Petersen B.E., 1999), клетки скелетной мускулатуры (Wakitani S., 1995; Ferrari G. et al., 1995), кардиомиоциты (Makino S., Fukuda K. et al., 1999; Orlic D. et al., 2001) и клетки центральной нервной системы (Brazelton T.R. et al., 2000; Mezey E. et al., 2000; Sanchez-Ramos J. et al., 2000; Kohyama J. et al., 2001; Saito T. et al., 2003). Все эти факты делают МСК, полученные из костного мозга, перспективными для применения в методиках восстановления повреждённого спинного мозга. МСК наиболее часто используются при восстановлении миокарда после различного рода повреждений – инфаркта, миопатии (Иванов Д.В., 2009; Saito T. et al., 2003; Eisenberg C.A. et al., 2006), нарушениях мозгового кровообращения (Bang O.Y. et al., 2005), нейродегенеративных заболеваниях (Lee J. et al., 2003; Sugaya K., 2005).

1.2. Стратегия нейропротекции в лечении повреждений спинного мозга обеспечивает предотвращение увеличения объёма дефекта нервной ткани, чтобы оптимизировать исход лече-

ния поражений спинного мозга. Показано, что нейральные прогениторные клетки могут защищать от эндотоксинов (Llado J. et al., 2004). Они также секретируют разнообразные молекулы, которые могут защитить клетки от механизмов апоптоза, усиливающих экзо и эндотоксинами (Lu P. et al., 2003). Получается, что введение означенных клеток в повреждённый спинной мозг в действительности оказывает нейропротективный эффект. Костномозговые стромальные клетки показали усиление нейропротективного эффекта при введении в повреждённый спинной мозг у взрослых крыс за счёт выделения большого количества ростовых факторов (García R. et al., 2004; Mahmood A. et al., 2004; Ye M. et al., 2005).

1.3. Ускорение регенерации аксонов вносит значительный вклад в восстановлении функций после повреждения спинного мозга. Способность нейральных прогениторных клеток секретировать разнообразные нейротрофические факторы свидетельствует о том, что они могут ускорять рост повреждённых аксонов (Llado J. et al., 2004). Взрослые нейральные прогениторы имеют свойства выделять субстраты для кортикоспинальной регенерации аксонов после повреждения спинного мозга (Pfeifer K. et al., 2004). У клеток, напоминающих стволовые, которые были получены из оболочек обонятельного нерва, есть способность предохранять аксоны от распознавания ингибирующими рост факторами, что позволяет аксонам расти в область, где нет ингибирующих факторов (Raisman G., Li Y., 2007).

В настоящее время идёт процесс перехода лабораторных разработок в клинику. Способствует данному процессу тот факт, что СК, полученные из костного мозга пациента, т.е. аутологичные, не вызывают этических конфликтов, в отличие от использования СК, полученных из эмбриона, которые отличаются от ФК сроком развития и, соответственно, получения. Тем не менее, по некоторым причинам, использование ЭСК очень часто предпочтительнее, чем использование собственных (аутологичных) клеток в лечении заболеваний. В США использование человеческих ЭСК для восстановления повреждений спинного мозга было предложено биотехнологической компанией *Geron*

из штата Калифорния, являющегося самым прогрессивным штатом в легализации исследований в области развития КТ. Сейчас применение собственных СК для лечения повреждения спинного мозга происходит во многих странах мира (Mathews D.J. et al., 2008). К примеру, в Эквадоре выполнены исследования по трансплантации аутологичных СК, полученных из костного мозга у 25 пациентов с поражением спинного мозга. Инвестором исследования выступала американская биотехнологическая компания из штата Калифорния *PrimeCell Therapeutics*. По результатам проведённой работы были получены обнадеживающие результаты, в частности, у пациентов отмечено улучшение ходьбы и чувственное восприятие. Это внушает оптимизм, что преодоление этических барьеров в скором времени может быть успешным для клинического применения ЭСК (Baptiste D.C., Fehlings M.G., 2007).

Потенциал ЭСК чрезвычайно велик, так как они могут дифференцироваться более чем в 200 видов различных клеток нашего организма (Sell S., 2008) и, при определённых обстоятельствах, даже в целый организм (Nagy A. et al., 1993). Человеческие ЭСК получают из эмбриона на стадии бластоцисты, а также с помощью трансфера соматического ядра (Bakken A.M., 2006; Ballen K.K. et al., 2006) или партеногенетической активации яйцеклетки (Cibelli J.B. et al., 2002; Vrana K.E. et al., 2003). Полученные ЭСК не подвергаются старению и сохраняют высокую теломеразную активность и нормальный клеточный сигнальный цикл, что и объясняет их высокую скорость пролиферации в культуре (Murry C.E., Keller G., 2008; Park Y.B. et al., 2008). Эти пластические характеристики делают ЭСК применимыми для стратегии восстановления повреждённого спинного мозга и нервной ткани. Однако, трансплантация ЭСК может вызывать тератомы из-за неконтролируемого роста, о чем уже имеются публикации (Ray S. et al., 2006; Nussbaum J. et al., 2007; Shiras A. et al., 2007). Кроме того, ЭСК при культивировании могут подвергаться генным и эпигенетическим изменениям, ведущим к трансформации клеточной культуры, хотя последнее может быть предотвращено технологическими протоколами культивирования (Shiras A. et al., 2007). После введения ЭСК во

взрослые ткани для предотвращения их отторжения может потребоваться иммуносупрессивная терапия (Nussbaum J. et al., 2007). Эти факторы резко ограничивают широкое внедрение в клиническую практику использования ЭСК в лечении повреждения спинного мозга и нервной ткани, несмотря на тот факт, что ЭСК обладают самым могучим потенциалом и могли бы широко применяться в репаративных клеточных технологиях. Альтернативой ЭСК служат СК, полученные из тканей сразу после рождения. Например, нейральные прогениторные клетки, полученные из взрослого головного мозга (Uchida N. et al., 2000) и спинного мозга. Однако в данном способе получения большое количество нерешённых юридических и этических вопросов и, помимо этого, взрослые СК являются менее пластичными, чем ЭСК а скорость и частота их деления в культуре намного ниже по сравнению с ЭСК. Также определено, что их дифференцировочный потенциал уменьшается во времени (Wright L.S. et al., 2006). Эти параметры делают их возможным, но крайне ограниченным альтернативным источником для ЭСК в лечении поражения спинного мозга и нервной ткани. Однако у данных клеток есть свои преимущества – они могут быть трансплантированы без иммуносупрессии и культура не будет иметь генетических отклонений. При введении взрослых СК полученных от пациента не возникает иммунного отторжения (Gorin N.C. et al., 2002). Также при культивировании у взрослых СК, как правило, не возникает генетических отклонений, т.е. они имеют высокую степень геномной стабильности (Vats A. et al., 2005) и после введения не проявляют туморогенную активность (Foroni C. et al., 2007). Наконец, имеется лишь незначительный круг морально-этических вопросов в отношении применения взрослых СК, так как они получаются от самого пациента. Это и является решающим моментом в использовании взрослых СК, нежели ЭСК, в восстановлении центральной нервной системы. Это в определённой степени верная стратегия, если удастся решить проблемы с низкой пластичностью и пролиферативным потенциалом взрослых СК по сравнению с ЭСК.

Один из краеугольных вопросов, стоящих непреодолимой стеной в отношении использования ЭСК, – это «Где та времен-

ная точка когда эмбрион считается человеком?» (Robertson J.A., 1999). В соответствии с Романской Католической Церковью и другими религиозными институтами эмбрион «должен лечиться как живой человек». С этой точки зрения подразумевается, что бластоциста не может использоваться как источник клеток. Другие считают, что эмбрион является человеком только после 20 недели гестации, таким образом подразумевая, что клетки можно получать из бластоцисты. Следовательно клетки могут быть получены из эмбриона, который был создан для искусственной фертилизации *in vitro*, но не использовался для поставленных целей. Другими словами он должен пройти процесс утилизации. Дискуссии на тему «жизнь», и когда «жизнь начинается», очень часто эксплуатируются для решения политических и религиозных вопросов. Продолжать дискутировать на эти темы могут только те люди, которые не встречались в своей семье с тяжёлыми болезнями, и не видели своих близких в неизлечимом состоянии. Врачам приходится постоянно сталкиваться с вопросами жизни и смерти, и помощи пациентам. Поэтому долг врача помогать пациенту излечиваться от болезней, или, по крайней мере, облегчать его страдания.

В последние годы появился повышенный интерес к *индуцированным плюрипотентным СК* (на английской аббревиатуре «*iPS*»). Получают *iPS* с помощью репрограммирования дифференцированных клеток, таких как *фибробласты*, используя введения четырёх транскрипционных факторов *OCT3/4* (октамер-4), *SOX2*, *KLF4* и *MYC* (Park I.H. et al., 2008; Takahashi K., Yamanaka S., 2006). Технология была подробно описана японскими учёными Takahashi и Yamanaka для мышинных фибробластов и теперь применяется для других мышинных клеток (Okita K. et al., 2007) и для человеческих соматических клеток (Yu J. et al., 2007). Из описанных выше четырёх транскрипционных факторов *MYC* и *KLF4* могут быть спокойно заменены другими факторами (Yu J. et al., 2007). Механизмы, которые лежат в основе данной методики и приводят к репрограммированию, остаются до конца не изученными и весьма дискуссионными. В настоящее время все ещё не понятно насколько схожи *iPS* с настоящими ЭСК, и в какой области может быть получен схожий эффект

и результат аналогичный применению ЭСК. Сейчас проводится сравнительное изучение генной экспрессии человеческих ЭСК и *iPS* (Lowry W.E. et al., 2008). Необходимо преодолеть несколько препятствий до того момента как *iPS*-клетки попадут в клинику. Это – использование ретровирусного вектора для введения транскрипционного фактора, необходимость селекционных маркеров для идентификации репрограммированных клеток. Хорошо известны онкогенные свойства *MYC* и интеграция ретровирусного вектора в геном. Эти необходимые требования для репрограммирования, но они изменяют клеточный геном и клеточную форму, что создаёт препятствие для терапевтического использования. Тем не менее, очевидно, что технологии с использованием *iPS*-клеток являются многообещающими с широкими перспективами в клинике без как либо морально-этических проблем, которые сопровождают использование ЭСК.

Резюме

СК содержат в себе колоссальный потенциал для восстановления повреждений спинного мозга и нервной системы, в частности, но понять широту это потенциала в настоящее время не представляется возможным. В тоже время КТ в лечении повреждений нервной системы сейчас находятся только на самом начальном этапе своего развития и, конечно, невозможно чисто гипотетически и теоретически оценить как отрицательные моменты в виде осложнений, так и положительные моменты в виде исцелений. Когда пациент становится инвалидом, или болезнь угрожает его жизни, то все сложившиеся морально-этические барьеры не должны препятствовать врачу в оказании помощи конкретному пациенту. Но нельзя также перешагивать через стоявшие морально-этические взгляды и грубо отрицать их. Необходимо, чтобы научные исследования в области КТ шли намного быстрее.

ГЛАВА VIII

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДЕРМАТОЛОГИИ

Развитие тканевой инженерии кожи необходимо для дальнейшего широкого клинического применения в лечении кожных и системных заболеваний. В этом разделе мы рассматриваем использование *эпидермальных* СК как источника клеток для кожных трансплантатов. Применение СК, как основного материала при создании биокожи, имеет огромный потенциал, который позволит улучшить исходы болезней и лечение обширных раневых дефектов.

Проблемы в использовании биокожи появилась после неудовлетворительных результатов лечения аутотрансплантатами, даже после успешного первоначального приживления. Исследования показали, что успех создания биокожи зависит от выбора подходящей клеточной культуры, чтобы получить у пациента постоянную и функционирующую кожную ткань (Bianco P., Robey P.G., 2001). Долгосрочное функционирование пересаженной биокожи ограничено отсутствием достаточного количества *эпидермальных* СК, которые утрачиваются в результате культуральных работ. Решение вопроса о потере популяции СК во время культивирования материала для биокожи – первостепенная задача. Несколько исследований продемонстрировали преимущество прогениторных клеток над более дифференцированными *кератиноцитами* в создании биокожи (Dunnwald M. et al., 2001; Pellegrini G. et al., 1999). *Кератиноциты*, выделяются благодаря специальной метке *BrdU*, от популяций СК и *амплифицированных клеток*, которые вместе с СК и в комбинации с I типом коллагена используются в создании биокожи. Обе популяции формируют эпидерму, но после 2 месяцев – только полученная из СК биокожа поддерживала нормальную эпидерму, в то время как эпидерма, сформированная из *амплифицированных клеток*, полностью дифференцировалась (Dunnwald M. et al., 2001).

Изучаются относительные вклады фолликулярных и межфолликулярных СК в поддержке эпидермиса и восстановлении раневой поверхности. Проведены исследования (Langton A.K. et

al., 2008) направленные на изучение роли СК полученных из луковицы волосяного фолликула в заживлении раны кожи, в которых была использована модель животных с полностью отсутствующей луковицей волосяного фолликула. На этой модели была получена задержка в реэпителизации раны по сравнению с контрольной группой здоровых животных, и расширена область межфолликулярной эпидермы, как компенсаторная мера, чтобы достичь закрытия и преобразования эпидермального барьера, что доказало важную роль *фолликулярных* и *межфолликулярных* СК в репарации раны (Langton A.K. et al., 2008). Было проведено изучение роли кератиноцитов в репарации кожных ран, в результате которого установлено, что фолликулярный эпителий способствует начальному закрытию раны, и фолликулярные клетки остаются в базальном слое эпидермы несколько месяцев спустя (Levy V. et al., 2007). Эти независимые исследования показали, что СК фолликула волосяной луковицы отвечают первыми и быстро на эпидермальное повреждение и способствуют восстановлению эпидермиса вместе с межфолликулярным кератиноцитами. Доказано, что для адекватных культуральных работ по сохранению в биокоже СК необходимо использовать аутографты, покрытые фибрином (Pellegrini G. Et al., 1999). Тогда культуры поддерживают высокую клонногенность, темп роста для быстрого увеличения объёма биоткани. Дальнейшая проблема с разработкой биокожи – не естественное проявление биокожи, даже если она успешно прижилась. Кожа состоит из многих типов клеток, помимо *кератиноцитов* и *фибробластов*. Есть нервы, сальные железы, потовые железы, меланоциты, клетки Меркеля, и т.д. Более сложная реконструкция с волосяными фолликулами, меланоцитами, клетками сальных желёз может, очевидно, привести к созданию косметически и функционально нормальной кожи.

Эпидермальные СК представляют многообещающий источник для регенерации кожных покровов. Однако, несмотря на их самообновление и мультипотенцию, необходимо определить маркеры для эффективной изоляции *эпидермальных* СК. Если в настоящее время существуют специальные маркеры для изоляции ГСК, то для эпидермальных СК они ещё не найдены.

Предложены различные методы, чтобы изолировать эпидермальные СК, в частности – *a6-bright/CD71* – выделение *кератиноцитов* (Tegunuma A. et al., 2007); – быстрое прилипание клеток к коллагену IV типа; – *DNA* метод (Kiel M.J. et al., 2007); и – использование флуоресцентного красителя на *Hoechst 33342* (Triel C. et al., 2004). Комбинация в сильной экспрессии белка *абинтегрин* (*ab bri*) и слабой экспрессии *CD71dim* является, возможно, наиболее принятыми маркерами эпидермальных СК в настоящее время (Tani H. et al., 2000). Показано, что в человеческой коже *ab briCD71dim* популяция клеток содержит маленькие клетки с высоким уровнем ядерно-цитоплазматического отношения, способного к производству большого количества крупных колоний после 10 дней культуры. Проверка регенеративной способности *ab briCD71dim кератиноцитов* показала, что у эквивалентов кожи, произведённых из этих клеток, была стратифицированная и толстая эпидерма, в то время как эквиваленты кожи от *ab briCD71bri* клеток воспроизвели тонкий и плохо дифференцированный эпидермис (Kim D.S. et al., 2004).

На генную терапию в настоящее время возлагаются большие надежды по созданию клеток, способных производить большое количество новых клеток. В эпидермисе человека большинство клеток заменяется каждые 26–28 дней, и поэтому любая постоянная генетическая коррекция должна быть нацелена на популяции СК (Bickenbach J.R., Dunnwald M., 2000). Работы по исследованию прямого переноса генов в кожу не привели к постоянной и стабильной экспрессии генов. Прямая передача генов в кожу с помощью вирусных и невирусных векторов приводит к экспрессии генов, но только кратковременно и с низким уровнем (Jensen T.G., 2007). Недавнее исследование сообщило об успехе в долгосрочной человеческой регенерации кожи от одной единственной генетически модифицированной СК. В этой работе человеческие *кератиноциты* были преобразованы ретровирусным *GFP* вектором. Далее были отобраны популяции клеток с высокой клонногенностью и темпом роста. Эквиваленты кожи, полученные от этих популяций, показали нормальную эпидермальную архитектуру, подобную родной человеческой коже

(Larcher F. et al., 2007). Предполагается, что это может быть приемлемым подходом для создания биокожи.

Недавно стали доступны новые источники *мультипотентных* СК, которые могут использоваться как в создании эпидермальный компонент биокожи, так и улучшать функциональность кожного компонента.

Один из источников *мультипотентных эпидермальных* СК – это репрограммированные соматические клетки, или *индуцированные плюрипотентные стволовые клетки – iPS*. Успешно получены от взрослых человеческих кожных фибробластов трансдукцией *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и с-Мус, клетки со свойствами *плюрипотентных*. Они были неотличимы от ЭСК в морфологии, быстром увеличении, поверхностных антигенах, экспрессии гена, плюрипотентности и теломеразной активности, и были также способны к производству компетентных зародышевой линией химер (Takahashi K., Yamanaka S., 2006).

Комбинация гемопоэтических и мезенхимальных прогениторов использована у пациентов с незаживающими хроническими язвами (Badiavas E.V., Falanga V., 2003) так же как и МСК, или субпопуляция с сосудисто-эндотелиальным фенотипом. Полученные из костного мозга СК имеют необходимую пластичность и способны к регенерации кровеносных сосудов, скелетной мускулатуры и миокарда (Ferrari G. et al., 1998; Kocher A.A. et al., 2001; Orlic D. et al., 2001). Полученные из костного мозга, СК использовались в лечении хронических ран. Опубликованы клинические результаты использования *аутологичных клеток* костного мозга, которые непосредственно наносились на трофические язвы у 3 пациентов, которые не отвечали на стандартное традиционное лечение больше 1 года. У всех пациентов отмечено улучшение ран в течение нескольких дней после применения, которое характеризовалось устойчивым полным уменьшением в размере раны, увеличением васкуляризации кожи и кожной толщины основания раны (Badiavas E.V., Falanga V., 2003). В то время как новые клетки кожи не окрашивались маркерами для ГСК, некоторыми маркерами для эндотелиальных клеток, и считалось, что клетками, ответственными за эту пластичность, были главным образом

МСК. Таким образом, костный мозг может быть важным источником *плюрипотентных* СК для биокожи.

Наконец, в периферической крови, содержатся клетки, полученные из костного мозга, которые называют *фиброциты*, которые мигрируют к месту повреждения тканей (Abe R. et al., 2001). Эти, полученные из костного мозга, мезенхимальные прогениторы, систематически обнаруживают в периферической крови больных ожогом (Bellini A., Mattoli S., 2007). *Фиброциты* и МСК как по отдельности, так и совместно могут потенциально использоваться в создании биокожи.

Резюме

До создания полноценной биокожи как в косметическом, так и функциональном плане необходимо провести ещё много научно-исследовательских работ. Выбор подходящих клеток, чистота эпидермальной популяции СК, соответствующие условия культивирования – это факторы, важные для длительного приживания и функционирования восстановленной кожи. Кроме того, вероятно, что биокожа будущего будет включать более сложную реконструкцию, используя сначала эпидермальные СК для создания эпидермального компонента, наряду с добавлением СК от других подходящих тканевых линий (например, меланоцитов). При создании биокожи вероятно, что эндотелиальные, мезенхимальные, нервные и/или другие примитивные СК могут помочь с созданием дермальных компонентов, включая новую сосудистую сеть. Такая конструкция должна позволить коже выполнять большинство своих нормальных функций: формирование барьера, пигментную защиту против ультрафиолетового облучения, терморегуляцию, а так же механическую и эстетическую функции (Metcalfe A.D., Ferguson M.W., 2007). Кроме того, важно научиться изолировать *эпидермальные* СК на уровне единственной клетки, чтобы лучше определить их характеристики, а также научиться управлять ими для использования в разработке достаточного количества ткани и многих других терапевтических направлений.

ГЛАВА IX

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

1. Клеточные технологии при метаболических нарушениях

В данном разделе представлены результаты наблюдения за группой пациентов с нарушением метаболических процессов, в лечении которых применялись КТ и проведено сравнение с группой пациентов с такой же патологией, но без применения КТ.

Подагра – клинический синдром, который характеризуется развитием артритов, связанных с отложением в тканях сустава моносодиевых уратных кристаллов. Данные отложения связаны с изменением метаболизма мочевой кислоты, которые возникают при наличии генетических дефектов и под внешнесредовыми воздействиями, что в совокупности формирует каскад порочных метаболических реакций в организме пациента. В США при построении экономической модели для подагры показала, что ежегодные затраты на новые случаи заболевания составляют свыше 27 млн долларов (Kim K.Y. et al., 2003). Длительно протекающая бессимптомная картина проявляется резкой манифестацией в виде подагрической атаки. Через некоторое время атаки учащаются и пациенты в молодом возрасте становятся хронически больными (Schlesinger N., 2004). Проводимое лечение с помощью нестероидных противовоспалительных препаратов, аллопуринола, колхицина приносит кратковременное облегчение до следующей атаки. Ранее мы демонстрировали эффективность применения КТ у пациента с подагрой (Хадарцев А.А., Иванов Д.В., 2006).

Получение аутологичных гемопоэтических клеток, последующие культуральные работы с ними и большое содержание их в вводимой суспензии обусловили получение положительных результатов у пациентов. Происходит это по нескольким причинам. Во-первых, сама процедура забора аспирата костномозговой взвеси является стрессовым фактором для организма, который моментально реагирует через систему аутокринных и паракринных механизмов на обменные процессы. Происходит это благодаря эндо-

генным иммуномодуляторам к которым относятся интерлейкины. Многочисленные эффекты иммуномодуляторов объясняются тем, что их рецепторы обнаруживаются на подавляющем большинстве различных типов клеток. Связывание иммуномодулятора с рецептором приводит к экспрессии генов и последующему синтезу молекул, соответствующих «репертуару» данного типа клеток. В настоящее время хорошо известно, что цитокины, к которым относятся и интерлейкины, являются ключевыми факторами, регулирующими активность нейронов ЦНС, проницаемость сосудов, уровень острофазовых белков. Все цитокины, а их в настоящее время известно более 30, по структурным особенностям и биологическому действию делятся на несколько самостоятельных групп. Группировка цитокинов по механизму действия позволяет разделить цитокины на следующие группы:

- провоспалительные, обеспечивающие мобилизацию воспалительного ответа (интерлейкины 1,2,6,8, *ФНО α* , интерферон γ);
- противовоспалительные, ограничивающие развитие воспаления (интерлейкины 4,10, *TGF β*);
- регуляторы клеточного и гуморального иммунитета – (естественного или специфического), обладающие собственными эффекторными функциями (противовирусными, цитотоксическими).

Спектры биологических активностей цитокинов в значительной степени перекрываются: один и тот же процесс может стимулироваться в клетке более чем одним цитокином. Во многих случаях в действиях цитокинов наблюдается синергизм. Цитокины активны в очень малых концентрациях. Образование и секреция цитокинов происходит кратковременно и строго регулируется.

Второй механизм после введения аутологичных гемопоэтических клеток при лечении подагры – это коррекция синтетических процессов в самой печени. В перипортальной зоне, где находятся желчный проток, ветвь печёночной артерии и ветвь воротной вены, располагаются овальные клетки. Овальные клетки считаются предшественниками гепатоцитов и холангиоцитов. Для овальных клеток характерно экспрессия маркеров, также как и для гемопоэтических клеток, в частности *CD34+*. Это не случайно, потому что на определённом этапе развития, с 10 по 18 неделю, печень функционирует как гемопоэтический орган

(Kinoshita T., Miyajima A., 2002). Естественно, что вновь введенные культивированные аутологичные клетки устремятся в печень, где часть их останется, часть клеток возвращается в свои ниши, т.е. в костный мозг. Клетки, которые попадают в печень и остаются там, благодаря доказанному эффекту *хоуминга* (от англ. слова «*home*» – дом) активизируют работу овальных клеток и *гепатоцитов* 1 порядка, локализующихся ближе всего к перипортальной области, обеспечивая активные процессы микросомального и пероксисомального окисления. *Пероксисомы* являются специализированными окислительными органеллами *гепатоцитов*. В них содержится оксидаза мочево́й кислоты, которая необходима для метаболизма последней. Изменение синтетических процессов в *гепатоцитах* первого порядка происходит за счёт каскада реакций, возникающих в результате выброса цитокинов ГСК и клетками моноцитарно-макрофагальной линии. Экспрессия цитокинов и ростовых факторов данными клетками происходит в нанодозировках и за нанопериоды. Отсутствие необходимого инструментария (оборудования, методов, методик) не позволяет оценить суммарный пул каскадных изменений, которые происходят у пациента. Получаемые стандартные биохимические анализы в рутинной клинической практике слабо отражают изменения на тонком клеточном уровне. Однако при отслеживании динамики развития заболевания у основной группы пациентов мы обратили внимание на достоверное улучшение интегрального показателя функционирования организма, который выражается как КЖ. В контрольной группе пациентов таких значительных изменений не происходит.

Стандартные методики лечения пациентов с хронически протекающей подагрой с применением ингибиторов ксантиноксидазы (аллопуринол) и ингибиторов простагландинов (нестероидных противовоспалительных средств) со временем теряют свою эффективность. В данном разделе представлен положительный результат применения КТ в лечении пациентов с подагрой.

Основная группа пациентов (мужчины) состояла из 9 человек со средним возрастом $49,2 \pm 4,4$ года с диагностированной подагрой в течение $8,1 \pm 3,3$ лет. Регулярно принимающие аллопуринол, при возникновении выраженного болевого синдрома

добавляющие в терапию нестероидные противовоспалительные средства. До проведения терапии с использованием КТ имелись боли в крупных суставах (коленных, локтевых). Всем пациентам применялись аутологичные клетки, полученные из костного мозга. Контрольная группа пациентов, также включала мужчин в количестве 9 человек совпадающие по возрасту $48,6 \pm 3,5$ и длительности заболевания $9,1 \pm 3,2$ года и лекарственной терапии с основной группой.

Для формирования основной группы существовали следующие *критерии включения*:

- заболевание подагрой, сопровождающиеся поражением крупных суставов;
- возраст старше 45 лет;
- добровольное согласие больного на участие в исследовании;
- способность больного заполнить опросник.

Критерии исключения:

- отказ больного от участия в исследовании;
- непонимание больным цели исследования;
- наличие тяжёлых сопутствующих заболеваний, симптоматика которых доминирует над проявлениями основного заболевания.

После обследования и отсутствия противопоказаний у основной группы производился забор аспирата костномозговой взвеси из гребня подвздошной кости в количестве 150 мл. На градиенте фикола выполнено выделение мононуклеарных клеток. Культивирование клеток проводилось в среде *IscoV* («*Sigma*») с добавлением *FBS* 10 % («*HyClone*»). На третьи сутки культивирования неприкрепившиеся клетки (300 ± 80 млн) были отмыты от компонентов среды и разделены на 2 равные части, одна из которых была введена внутривенно капельно, вторая была криоконсервирована. Повторное введение криоконсервированных клеток проводилось через 30 дней после первого введения, размораживание криоконсервированных клеток проводилось непосредственно перед их введением в асептических условиях. Жизнеспособность и подсчёт клеток проводились с помощью автоматического

счётчика *CountessTM* (фирма *INVITROGEN*, США). Результаты представлены в виде графика и изображения на рис. 42.

Рентгенография плюснефаланговых, коленных и локтевых суставов проводилась до терапии и через 12 месяцев после неё. Контрольные точки обследования – 1, 3, 6 и 12 месяцев после введения *аутологичных клеток*. Пациенты основной и контрольной групп сдавали биохимический анализ крови, общий анализ мочи, заполняли стандартизированные опросники *SF-36*, *EQ-5D*.

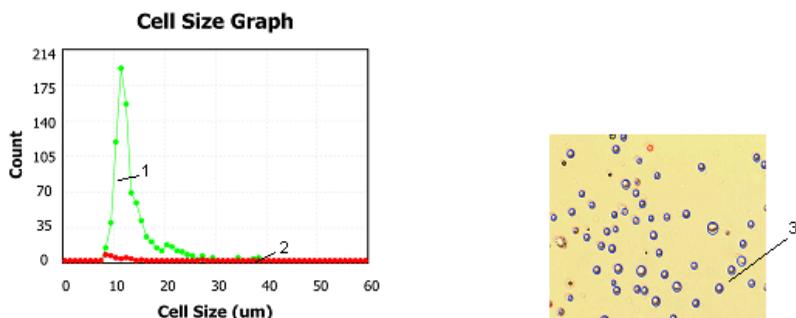


Рис. 42. Результат тестирования клеток: 1 – живые клетки, 2 – нежизнеспособные, 3 – клетки окрашены трипановым синим, живые клетки не поглощают данный краситель. По вертикали количество, по горизонтали размер

Перед введением *аутологичных клеток* пациентам обязательно проводилось исследование клеточного состава методом проточной цитофлуориметрии. Результаты представлены в табл. 49.

Таблица 49

Иммунофенотип использованной аутологичной костномозговой взвеси

Маркер	CD 3	CD 5	CD 7	CD 19	CD 20	CD 22	CD 23	CD 34	CD 38	CD 71	HLA-DR
Результат	38,6± 3,7	44,6± 4,2	36,6± 2,8	5,1± 0,5	2,5± 0,3	1,4± 0,3	1,4± 0,2	1,2± 0,2	15,1± 2	12,5± 3,4	6,9± 1,7

При обработке опросника *SF-36* результаты представляются в виде оценок в баллах по 8 шкалам, составленных таким образом, что более высокая оценка указывает на более высокий уровень КЖ. Шкалы группируются в два показателя: «*Физический компонент здоровья*» (РН) и «*Психологический компонент здоровья*» (МН). Данные по результатам опросника *SF-36* основной и контрольной групп представлены в табл. 50.

Таблица 50

Данные по опроснику *SF-36*

Сроки/Группы	Основная		Контрольная	
	РН	МН	РН	МН
До введения	39,08±3,45	36,96±2,12	38,06±5,06	39,18±4,25
Через 1 месяц	52,46±2,4	52,62±3,27	38,06±5,06	39,04±2,02
3 месяца	45,18±1,43	56,52±1,28	39,08±2,12	40,08±3,02
6 месяцев	48,13±2,17	54,95±1,03	41,14±4,25	42,07±1,3
12 месяцев	49,08±3,47	59,03±5,45	40,04±1,23	40,08±1,42

Оценка полученных данных происходит достаточно простым способом: чем ближе показатель к 100, тем лучше состояние здоровья. Обращает на себя внимание, что наилучший показатель физического компонента здоровья был через месяц после проведения терапии с использованием *аутологических клеток*. В контрольной группе изменений в оценке собственного состояния здоровья не происходило. В дальнейшем физический компонент стабилизировался и немного снизился, продолжая оставаться неизменным в течение более 6 месяцев у пациентов основной группы. Клиническая картина болезни у пациентов основной группы кардинально изменилась, что отмечено практически у всех пациентов, в течение первого месяца. Если раньше погрешности в диете (алкоголь, белковая пища – мясо в больших количествах) вызывали резкий болевой синдром не только в мелких, но и крупных суставах, с отёком и местами гиперемией, тугоподвижностью и болями, то после терапии болевой синдром локализовался в области 1–2 плюснефаланговых суставов. Боли в крупных суставов практически исчезли. При этом необ-

ходимо отметить, что пациенты кардинально не изменяли свой образ жизни, погрешности в диете происходили достаточно регулярно, но количество таблетированных препаратов резко уменьшилось. Снижение составило от 10 до 20 % от ранее принимаемых количеств. В основном болевой синдром купировался только диетой. Анализ первой части опросника *EQ-5D* подтвердил данные, полученные при помощи опросника *SF-36*. Данные обработки опросника *EQ-5D* представлены в табл. 51. Различие заключается в числовом значении, в *EQ-5D*, чем ближе к 1,00 показатели, тем выше оценка здоровья пациентом. В данном опроснике также отмечена тенденция к улучшению через 1 месяц, которая стабилизировалась на весь период наблюдения, т.е. более 12 месяцев.

Таблица 51

Результаты по опроснику EQ-5D

Сроки/Группы	Основная		Контрольная	
	Индекс	«градусник»	Индекс	«градусник»
До введения	0,708±0,03	60±8	0,658±0,02	60±2
Через 1 месяц	0,811±0,03	80±4	0,688±0,07	60±3
3 месяца	0,824±0,02	80±8	0,688±0,03	60±3
6 месяцев	0,82±0,04	78±6	0,682±0,05	61±4
12 месяцев	0,798±0,02	76±8	0,658±0,07	58±6

Более наглядно представлена собственная визуальная оценка здоровья пациента. Отмечено значительное улучшение у основной группы на 10–30 % через месяц по сравнению с периодом до терапии и впоследствии снижение и стабилизация. При сравнении результатов, полученных при обработке всех опросников, отмечено, что даже через год после проведения терапии пациенты основной группы не достигли по оценке своего здоровья (как интегрального показателя) значений, которыми они характеризовали собственное качество жизни до терапии. В течение наблюдаемого промежутка времени пациенты основной группы не имели госпитализаций в стационар для лечения, хотя в последние годы перед проведением терапии госпитализировались с определённой периодичностью,

составляющей не менее 1–2 раз в год. В контрольной группе были госпитализации во время периода наблюдения.

В анализах пациентов, которые выполнялись в контрольных точках (до терапии, через 1, 3, 6, 12 месяцев) происходили колебания показателей функции печени, азотистого обмена, липопротеидов, ревматологических проб табл. 52.

Таблица 52

Усредненные данные основной группы пациентов

Показатели (норма)	До введения клеток	Через 1 месяц	Через 3 месяца	Через 6 месяцев	Через 12 месяцев
АлАТ (N = 8-54)	31	45	20	57	48
АсАТ (N = 7-38)	18	30	15	40	35
Креатинин (N=53-142)	117,2	135	68	94	130
Мочевина (N = 3-6,8)	9,3	7,2	6,6	8,0	7,4
Холестерин (N=3,27-6,2)	6,4	6,0	6,8	7,0	6,2
ЛПНП (N = 0-4,7)	4,39	4,0	4,5	4,2	5,2
ЛПВП (N = 0,8-2,3)	0,9	1,5	1,8	1,2	1,0
СОЭ (N = 2-10)	9	5	3	6	8
Мочевая кислота (3,4-7,0)	9,3	7,4	7,2	8,4	7,8
Мочевая кислота в суточной моче (2,4-5,9)	1,7	3,2	4,0	2,0	2,5

Отмечается, что ухудшение биохимических показателей было связано с погрешностями в диете перед исследованиями, что достаточно быстро компенсировалось диетой, и повторные анализы приближались к норме.

2. Гиперлипидемия и применение клеточных технологий

При применении КТ у пациентов с различными заболеваниями печени (чаще невирусного поражения), сердечно-сосудистыми заболеваниями и сахарными диабетом мы обратили внимание, что у пациентов с высоким содержанием в периферической крови *липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов очень*

низкой плотности (ЛПОНП), триглицеридов (Тг), холестерина (ХС), через определённое время происходили процессы стабилизации данных показателей. В результате в данную группу вошли 54 пациента, из которых женщин было 9 человек, соответственно 45 мужчин. Средний возраст составил $54,2 \pm 6,1$ лет. Распределение пациентов по группам представлено в табл. 53.

Таблица 53

Распределение пациентов по группам

	Ауто	Алло
Мужчины	2	43
Женщины	3	6
Возраст (год)	$52,3 \pm 2,1$	$55,4 \pm 1,4$
количество	5	49

Примечание: Ауто – пациенты, у которых использовались аутологичные клетки; Алло – пациенты, которым применялись аллогенные клетки

Методы введения – 49 пациентам проводилось введение *аллогенных (фетальных)* клеток в дозе 100 млн. Введение проводилось системное (внутривенное) под контролем основных витальных функций, 5 пациентам внутривенно вводились *аутологичные клетки*, получение которых производилось с помощью пункций костей таза и последующими культуральными работами. Количество введённых *аутологичных клеток* было не менее 120 млн. Осложнений при заборе клеток и после введения отмечено не было. Все пациенты подписали информированное согласие на применение клеточных технологий в лечении их болезней.

Тестирование пациентов проводилось через месяц после первичного введения клеток как *аллогенных (фетальных)*, так и *аутологичных*. Данные изменений динамики липидного профиля крови представлены в табл. 54.

Динамика изменения липидного профиля крови у пациентов

	Ауто				Алло			
	P0	P1	P2	P3	P0	P1	P2	P3
ЛПНП	6,2±0,6	5,9±0,4	5,8±0,3	5,8±0,2	6,3±0,6	5,8±0,5	5,2±0,6	5,1±0,2
ЛПОНП	1,1±0,2	1,1±0,1	1,0±0,2	0,9±0,1	1,1±0,2	0,9±0,3	0,8±0,2	0,7±0,1
ЛПВП	0,6±0,15	0,6±0,2	0,7±0,2	0,8±0,2	0,6±0,1	1,1±0,2	1,3±0,2	1,1±0,1
Tг	3,6±0,2	3,5±0,3	3,5±0,3	3,5±0,1	3,7±0,2	3,6±0,2	3,4±0,3	3,4±0,1
ХС	8,2±1,1	8,0±0,9	7,9±0,8	7,8±0,8	8,3±1,2	7,9±0,6	6,7±0,5	6,6±0,2

Примечание: Tг – триглицериды; ЛПВП – липопротеиды высокой плотности; ХС – холестерин

Было отмечено, что у всех пациентов происходило не только снижение уровня ЛПНП, холестерина, но и происходило повышение уровня *липопротеидов высокой плотности* (ЛПВП). В среднем снижение ЛПНП, Хс в течение первого месяца составляло около 15%, повышение ЛПВП не превышало 10 %. В дальнейшем – группе пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями выполнялись повторные введения клеток, которые не позволяют экстраполировать результаты на всех пациентов. Достоверно показано, что корректировка дислипидемии проходит в течение первого месяца и наиболее выражена была у пациентов с применением *фетальных клеток*, по сравнению с пациентами у которых применялись *аутологичные клетки*. После первичного однократного введения эффекты по снижению и нормализации дислипидемии продолжались в течение 3-х месяцев. В дальнейшем происходила стабилизация процесса, в некоторых случаях отмечено повышение ЛПНП, ХС и снижение уровня ЛПВП.

Метаболизм липопротеинов – это динамический процесс, включающий в себя как разнообразные перемещения липидов и апопротеинов между отдельными классами липопротеинов, так и целый ряд реакций, катализируемых ферментами. Эти взаимодействия приводят в том числе к рецептор-опосредованному поступлению ХС в клетку или его удалению из клетки. Основ-

ное место отведено превращениям ХС, который находится в плазме в относительно небольших количествах.

Клинический эффект объясняется органотропностью или *хоумингом фетальных клеток*, способностью их тканеспецифично заселять печень, нормализовать метаболизм ЛПОНП, ЛПНП и ХС повреждённых клеток, а также способствовать восстановлению нормальной рецепции ЛП на поверхности гепатоцитов. Другой возможный механизм действия *фетальных клеток* – неспецифический. Введённые клетки, будучи малодифференцированными, с помощью биологически активных веществ (цитокины, факторы роста) активизируют собственные эндогенные механизмы регуляции восстановительных процессов в печени, путём регуляции дифференцировки клеток макрофагально-моноцитарного ряда и выделения ими собственных (эндогенных) регуляторных пептидов. Регуляторные свойства *аллогенных СК* могут быть воспроизведены аутологичными клетками костного мозга, в популяции которых присутствуют плюрипотентные клетки.

3. Клеточные технологии в спорте

Нами были поставлены следующие задачи:

1. Определить исходный уровень подготовки спортсменов к нагрузке на длительную физическую выносливость.
2. Подобрать наиболее оптимальный курс клеточной терапии направленный на улучшение устойчивости организма спортсмена к тренировочному стрессу.
3. Определить период максимального действия выбранной терапии.
4. Определить длительность действия выбранного курса терапии.
5. Определить результативность воздействия данного курса клеточной терапии на спортсменов по результатам диагностических тестов.
6. Оценить влияние выбранного курса клеточной терапии на изменения мышечной массы, объёма, силы.

Исследование проводилось на двух группах спортсменов, которые находились в режиме интенсивного тренинга. В первой группе, контрольной, КТ не применялись, во второй группе, основной, применялись КТ. Возраст от 24 до 38 лет, средний возраст $32 \pm 4,3$ года, имеющийся тренировочный стаж не менее 5 лет. Уровень подготовки – *высококвалифицированные спортсмены* (ВКС). В основной группе выделены 3 подгруппы:

- применялись только аллогенные клетки;
- применялись аллогенные и аутологичные;
- только аутологичные клетки.

Перед проведением терапии спортсмены прошли стандартизированные тесты, оценивающие их физическую подготовленность.

Контрольные точки, на которых проводилось тестирование: 14 дней, 1 месяц, 2 месяца. Мониторинг ВКС выполнялся каждые 48 часов.

Забор аспирата костномозговой взвеси проводился по отработанной методике за 14 дней до начала эксперимента. Введение клеток осуществлялось системно, через пункцию кубитальной вены под постоянным контролем витальных функций. Осложнений при заборе аспирата костномозговой взвеси и при введении клеток не было.

Результат выполнения тестов представлен в табл. 55. Данные суммируют 3 теста. Время восстановления после тестов показано в табл. 56. Изменение жировой ткани в табл. 57. Изменение активной клеточной массы в табл. 58.

Таблица 55

Суммарные результаты выполнения тестов

Месяц/группы	аллогенные	алло+ауто	аутологичные	контроль
Начало	121 \pm 2,5	126 \pm 1,8	120 \pm 2,2	115 \pm 2,1
14 дней	123 \pm 2,2	128 \pm 1,7	121 \pm 1,9	116 \pm 2,1
Через месяц	138 \pm 2,8	164 \pm 0,8	119 \pm 2,1	116 \pm 2,2
Через 2 месяца	147 \pm 3,1	189 \pm 0,6	122 \pm 2,1	117 \pm 2,2

Первичные эффекты в повышении работоспособности, выносливости, снижении периода восстановления отмечены у спортсменов ко второй неделе. Также обратило на себя внимание, что наиболее ярко они проявлялись у спортсменов где использовались *аллогенные клетки*. При сравнении результатов у ВКС разных возрастов отмечено, что более выраженные эффекты у спортсменов более старшего возраста. После повторного введения клеток, которое выполнялось через 1 месяц от первичного, субъективные ощущения у ВКС и результативность росла около 14 дней, после чего наступила стабилизация.

Таблица 56

Время восстановления после выполнения тестов (в секундах)

Месяц/ группы	аллогенные	алло+ауто	аутологичные	контроль
Начало	35±2,5	30±2,5	20±2,5	20±2,5
14 дней	30±2,3	28±2,2	20±2,4	20±2,5
Через месяц	20±2,2	15±2,1	15±2,3	18±2,5
Через 2 месяца	10±2,2	10±2,1	13±2,4	15±2,5

Таблица 57

Изменение жировой ткани*

Месяц/ группы	аллогенные	алло+ауто	аутологичные
Начало	6,7±0,5	20,3±0,8	15,9±0,5
Через месяц	6,3±0,5	19,4±0,5	16,3±0,5
Через 2 месяца	6,4±0,5	20±0,5	15,7±1,1

Примечание: * – условные единицы

Таблица 58

Изменение активной клеточной массы*

Месяц/ группы	аллогенные	алло+ауто	аутологичные
Начало	29,8±0,3	53,8±0,2	39,1±0,2
Через месяц	31,2±0,1	52,5±0,2	37,7±0,2
Через 2 месяца	30,1±0,4	53,0±0,1	39,3±0,3

Примечание: * – условные единицы

Выявить закономерность в изменениях активной мышечной массы или жировой ткани не удалось. Также не обнаружено изменений в лабораторных показателях табл. 59.

Таблица 59

Динамика изменений у спортсменов контрольной и основной групп в общем анализе крови

Показатель	Основная группа				Контрольная группа			
	P0	P1	P2	P3	P0	P1	P2	P3
Эр-ты	4,5±0,5	4,4±0,6	4,5±0,3	4,5±0,4	4,8±0,3	4,8±0,4	4,7±0,6	4,7±0,4
Гем-н	143±6,3	144±3,4	143±6,2	145±1,6	139±6,8	142±2,6	141±4,1	140±0,8
Лей-ты	6,2±1,4	6,5±1,3	6,6±1,1	6,4±1,3	6,8±2,4	6,4±2,1	6,5±1,4	6,6±0,6
СОЭ	8±3,2	8±3,5	8±2,9	8±2,8	5±1,2	6±2,2	6±0,2	6±0,5

Примечание: P0 – до применения клеточных технологий; P1 – через 14 дней; P2 – через 1 месяц; P3 – через 2 месяца

4. Клеточные технологии и качество жизни

В настоящее время в клинической практике для оценки результатов проведённого лечения существуют не только инструментальные, лабораторные и визуальные методы, но и интегральные показатели. Один из интегральных показателей результатов лечения больного является изменение его качества жизни. *Качество жизни (КЖ)* определяется как совокупная характеристика физического, психологического, эмоционального и социального функционирования больного, основанная на его субъективном восприятии. Определяется КЖ самим пациентом с помощью стандартизированных опросников. Математические модели, заложенные в опросники, позволяют чётко и достоверно оценить результаты проведённых методов лечения, что особенно важно при использовании новых технологий, в частности клеточных. Напомним, что КТ подразумевают под собой биомедицинские технологии с использованием различных видов клеток и клеточно-инженерных конструкций. Одними из первых исследований КЖ в клинической медицине были выполнены у больных с поражением сердечно-сосудистой системы. По ре-

результатам исследований стало ясно, что устоявшиеся подходы в интерпретации проведённого лечения, которые всецело опирались на лабораторные и инструментальные показатели, отражали только физическую составляющую больного. Они не давали возможности оценить и получить полное представление о жизненном благополучии пациента, которое включает, помимо физической составляющей, ещё и психологическое, эмоциональное, духовное и, наконец, крайне важное, социальное функционирование больного. Изучение КЖ у больных с поражением сердечно-сосудистой системы, благодаря новому подходу, позволяет раскрыть многоплановость болезни и даёт важную информацию об основных направлениях жизнедеятельности больного, в частности психологической, физической, социальной и т.д. Что касается КЖ, связанного со здоровьем, то оно включает компоненты, позволяющие провести дифференцированный анализ влияния болезни и, самое важное, лечения – на состояние больного. Полученные данные позволяют осуществлять постоянный мониторинг состояния больного и вовремя произвести необходимую коррекцию. Важно, что сам пациент производит оценку своего здоровья, а это является ценным и надёжным показателем его общего состояния. Когда начинались работы по оценке КЖ у больных с поражением сердечно-сосудистой системы, перечень инструментов был крайне скудным и поэтому результаты зачастую были не совсем корректными. В настоящее время стандартизированные опросники характеризуются высокой степенью валидности, чувствительности и надёжности. Среди общих опросников, наиболее часто используемых в клинической практике для оценки качества жизни у пациентов с поражением сердечно-сосудистой системы, надо отметить следующие: *SIP (Sickness Impact Profile)*, *NHP (Nottingham Health Profile)*, *SF-36 (Medical Outcomes Study 36 – Item Short Form health survey)*, *EQ-5D* и т.п. Существует также большое количество специализированных опросников, которые применяются в том или ином разделе кардиологии. Назовём лишь некоторые из них *SAQ (The Seattle Angina Questionnaire)*, *CARDIAC (Ferrans and Powers Quality of Life Index)*, *Quality of life Questionnaire in Severe Heart Failure* и т.д. В одном крупномасштабном исследо-

вании, которое проводил шведский университет в Гётеборге были изучены последствия в раннем и отдалённом послеоперационном периодах у больных с кардиохирургическими операциями. В протокол были включены 2121 больной. Исследование проводили с помощью опросников *PAS*, *NHP*, *PGWBI*, которые больные заполняли на нескольких точках – до выполнения операции, через 3 месяца, 1 и 2 года после операции. При обработке опросников было отмечено улучшение показателей по всем опросникам. В частности по опроснику *PAS* (*Physical Activity Score*), который характеризует физическое функционирование и наличие симптомов, постепенно уменьшался, что говорило об улучшении состояния больного. Суммарный индекс опросника *NHP*, характеризующий выраженность ограничений в физическом, социальном и ролевом функционировании снижался через 2 года после операции, что также говорит об улучшении параметров КЖ больного. Показатель благополучия по опроснику *PGWBI* (*Psychological General Well-Being Index*) имел положительную динамику в течение всего периода наблюдения. При проведении анализа через 2 года после операции позволил установить, что наиболее выраженное улучшение отмечается в показателях физического функционирования и боли, после которых следуют показатели психологического здоровья. Отмечено, что через 2 года после *аортокоронарного шунтирования* (АКШ) наиболее проблематичным было сексуальное функционирование, причём к факторам риска были отнесены мужской пол, сахарный диабет и предоперационные проблемы. В заключение данного исследования был сделан вывод о том, что АКШ существенно повышает уровень качества жизни больных. Заметное улучшение наблюдается уже через 3 месяца после операции, с последующим сохранением положительной динамики в течение 2-х лет. В принципе концепция исследования КЖ имеет широкие возможности применения в кардиологии и позволяет оптимизировать проведение стандартизации методов лечения и обеспечить полноценный индивидуальный мониторинг состояния больного, а также осуществить экспертизу новых методов лечения, опираясь на международные критерии, принятые в большинстве развитых стран. Мировая статистика говорит о

том, что поражение сердечно-сосудистой системы является основной причиной смертности населения в мире и поэтому улучшение качества жизни у больных с *ишемической болезнью сердца* (ИБС) является самой важной задачей в лечении таких пациентов. Особенно интересным представляется сравнение различных методов лечения ИБС (хирургического, терапевтического, реабилитационных программ, сроков и режимов лечения). В проведённом в США исследовании изучали динамику показателей жизни у пожилых пациентов с ИБС, которым была выполнена ангиопластика коронарных сосудов. В исследовании использовались опросники *SF-36* и *SAQ*. По полученным через 3 месяца после операции данным наблюдали отчётливую динамику улучшения показателей КЖ по большинству шкал обоих опросников. Был сделан вывод о том, что коронарная ангиопластика существенно улучшает качество жизни у больных с ИБС. В отношении АКШ также была выполнена работа в Кембриджском Университете, где с помощью опросника *NHP* было установлено, что АКШ приводит к улучшению всех показателей КЖ и эти показатели через 2 года после операции в несколько раз превосходят предоперационные значения. Опросник использовался до операции, через 3 и 12 месяцев после операции. Данные о КЖ, полученные до лечения, могут дать врачу ценную исходную информацию о динамике развития заболевания и его исходе, что поможет в выборе правильной программы лечения. Интегральный показатель – КЖ – как прогностический показатель может быть полезным при стратификации больных в клинических исследованиях и при выборе стратегии индивидуального лечения больного. При планировании операции АКШ клиницисты традиционно опираются на известные неблагоприятные факторы риска: повторная операция, тяжесть болезни, сопутствующая патология и т.п. Исследование КЖ позволяет получить дополнительную ценную информацию, наряду с другими клиническими методами. Таким образом, совокупность полученных данных позволит более точно предвидеть развитие событий в послеоперационном периоде. Большая программа по оценке прогностического потенциала данных о КЖ при использовании хирургических методов лечения ИБС была реализована

в США с 1992 по 1996 годы, когда в 14 клинических центрах для ветеранов провели исследования качества жизни, как прогностического фактора летальности после операции АКШ. В данное исследование было включено 4969 пациентов и использовались опросники *SF-36*, которые они самостоятельно заполняли за 72 часа до операции. Было установлено, что показатели физического функционирования в дооперационном периоде являются независимым прогностическим фактором летальности после операции. Предварительные данные по шкалам психологического здоровья не имели достоверной корреляции с уровнем летальности. Этот факт стал неожиданным, т.к. считается, что депрессия является независимым фактором риска в развитии ИБС и играет роль при прогнозировании вероятности летального исхода. Разработка терапевтических и реабилитационных программ для больных, перенесших кардиохирургические операции, во многом опирается на данные о динамике их качества жизни в ранние и отдаленные сроки после операции. Большая работа была проведена по созданию специальных программ по реабилитации больных после АКШ и коронарной ангиопластики. В обзоре, который выполнил E.Cornell et al., посвященном различным аспектам кардиохирургических операций, серьезное внимание уделено результатам исследования КЖ больных в периоде их реабилитации. Анализ исследований, в которых проведена оценка КЖ в динамике, показал необходимость комплексного подхода к реабилитации с целью компенсации всех нарушений, выявленных при исследовании КЖ, и неэффективность одностороннего подхода, когда используется только социальная или только психологическая поддержка.

Остановимся более подробно на некоторых опросниках. Опросник *SIP* включает 136 вопросов, отражающих 12 категорий КЖ. При расчетах полученных данных определяют значение каждой категории и интегральный показатель КЖ. Эта методика хорошо валидизирована для оценки КЖ больных с различными заболеваниями сердечно-сосудистой системы, однако не обладает достаточно высокой чувствительностью для характеристики динамики качества жизни таких пациентов под влиянием медикаментозного лечения.

Опросник *SAQ*. Болезнь-специфическая для ИБС анкета *SAQ* состоит из 19 вопросов, которые объединены в 5 шкал: физические ограничения, стабильность приступов, частота приступов, удовлетворенность лечением и отношение к болезни. При этом 100,00 баллов по каждой из шкал опросника *SAQ* соответствует наиболее высокому КЖ.

Опросник *NHP* состоит из 38 вопросов, включающих 6 категорий качества жизни, отражающих следующие аспекты: болевые ощущения, физические способности, сон, эмоциональные реакции, энергичность, социальная изоляция и 6 дополнительных разделов, отражающих влияние состояния здоровья на трудовую деятельность, ведение домашнего хозяйства, взаимоотношение с другими людьми, личную жизнь, половую жизнь, любимые занятия, увлечения, активный отдых. Заполнение самим пациентом занимает 10 мин. Каждому предполагаемому ответу первой части опросника присвоены балльные значения, представляющие собой взвешенную величину, вычисленную в большом популяционном исследовании. Их сумма равна 100, что соответствует наихудшему уровню КЖ по данному параметру. Методика хорошо валидизирована. Суммированием значений положительных ответов в каждом разделе получают величину показателя КЖ. Имеется раздел, отражающий довольно полно болевые ощущения исследуемого, что является основанием для более целесообразного использования этой методики у больных с ИБС, как при наличии хронической сердечной недостаточности, так и без таковой. Полученные значения качества жизни хорошо коррелируют с функциональным классом ХСН по классификации *NYHA*. Эта методика довольно популярна, имеет ряд версий, тщательно валидизированных в специальных исследованиях.

Среди общих методик, применяемых для оценки КЖ больных с сердечно-сосудистой патологией, чаще всего используют опросник *SF-36*, состоящий из 36 вопросов, разделённых на 8 категорий. Расчёты дают значения каждой категории КЖ от 0 до 100 баллов, отражающих уровень КЖ больного по возрастающей. Эта методика тщательно валидизирована в исследованиях пациентов различной популяции. Она обладает более высокой чувст-

вительностью по сравнению с *NHP*. В настоящее время методику *SF-36* рассматривают как «золотой» стандарт общих методик оценки КЖ больных с поражением системы кровообращения. К её недостаткам относят определённую сложность при заполнении опросника, что несколько ограничивает применение этой методики у пожилых больных. Создана более короткая версия опросника *SF-36*, состоящая из 12 вопросов (*SF-12*), отражающих два аспекта качества жизни: физический и психологический. Эта методика сопоставима с *SF-36*, но не обладает необходимой чувствительностью при динамических наблюдениях больных кардиологического профиля.

Сравнительная характеристика результатов исследований с применением общих методик оценки КЖ пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы свидетельствует, что пока нет общей методики с достаточно высокой чувствительностью для определения изменений качества жизни таких больных в результате медикаментозных и немедикаментозных вмешательств. Наиболее близки к таким требованиям результаты работ, выполненных с применением методики *SF-36*, в сочетании с данными болезнь-специфических методик.

К болезнь-специфическим методикам изучения КЖ больных с патологией системы кровообращения относят методические подходы, позволяющие определить выраженность того или иного признака заболевания, в том числе способ *визуально-аналоговых шкал* (ВАШ). Эти шкалы представляют собой отрезки прямой определённой длины, начало которой соответствует минимальной выраженности определённого признака, а конец – максимальной его величине. Больной самостоятельно отмечает точку на прямой, которая отражает выраженность определённого симптома (*Visual analogu Scale of Beathlessness*). К таким методикам, позволяющим количественно определить выраженность проявлений болезни (одышки, отёков, общей утомляемости и др.), относят опросники как более раннего периода исследований качества жизни, так и результаты последних лет. *EuroQol (EQ-5D)* – общий опросник качества жизни, разработанный Европейской группой исследования качества жизни. *EQ-5D* – многомерный инструмент оценки качества жизни, который может быть выражен с помощью одного пока-

зателя – индекса. *EQ-5D* состоит из 2-х частей. Первая часть – опросник, который заполняется самостоятельно и включает 5 компонентов. Эти компоненты связаны со следующими аспектами жизни: подвижность, самообслуживание, активность в повседневной жизни, боль/дискомфорт и беспокойство/депрессия. Каждый компонент разделён на три уровня в зависимости от степени выраженности проблемы. Комбинирование этих уровней по 5 компонентам позволяет получить 243 варианта «состояния здоровья». Эта часть опросника может быть представлена как профиль *EQ-5D profile*, состоящий из 5 компонентов, или как индекс здоровья – *EQ-5D utility*. Последний удобен для использования в фармакоэкономических расчётах. Вторая часть опросника представляет собой ВАШ, так называемый «термометр здоровья». Это 20 см вертикальная градуированная линейка, на которой 0 означает самое плохое, а 100 – самое хорошее состояние здоровья. Обследуемый делает отметку на «термометре» в том месте, которое отражает его состояние здоровья на момент заполнения. Эта часть опросника представляет собой количественную оценку общего статуса здоровья. Опросник *EQ-5D* используют для фармакоэкономического анализа.

Среди новой генерации опросников оценки симптомов следует отметить опросник серии *Comprehensive Symptom Profile (CSP) – Coronary Artery Disease (CAD)*, разработанный в рамках российско-американского проекта Центром изучения качества жизни и здоровья Нью-Джерси (*New Jersey Center for Quality of Life and Health Outcome Research*) и Межнациональным центром исследования КЖ. В данном опроснике пациенту предлагается по 10 бальной шкале оценить выраженность 27 симптомов, которые у него имеются. Самый низкий показатель равный «0» говорит об отсутствии симптома и соответственно самый высокий показатель «10» говорит о яркой выраженности симптома у пациента.

Изучение КЖ и симптомов у больных после применения и без использования КТ, позволит получить комплексную информацию о результатах лечения различных категории пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детальная характеристика терминологии, используемой при описании клеточных технологий, происхождения и видов СК, способов их сохранения, возможных вариантов их использования – дана в I главе, посвященной клеточной биологии.

Во II главе охарактеризованы методы математической биологии и медицины, используемые в медико-биологических исследованиях, а также принципы гармонизации, присущие биологическим объектам.

В III главе описаны результаты экспериментальных исследований, посвященных влиянию внешних разночастотных, в частности, крайневысокочастотных воздействий на биологические объекты с гипоплазией костного мозга, возможностей их модуляции фитомеланином и СК.

В IV главе отражены выявленные при помощи математического аппарата закономерности эффектов, обусловленных влиянием СК, фитомеланина и КВЧ-излучения на течение экспериментальной гипоплазии красного костного мозга, реализующиеся через системы СРО и РАСК.

В V–IX главах приведены результаты клинического использования клеточных технологий в кардиологии, гепатологии, неврологии, дерматологии, в восстановительной медицине.

СК от взрослого организма клинически используются в лечении гематологических заболеваний, таких как лейкемия, более 40 лет. Эти клетки получают из костного мозга пациента. В последние годы их стали получать из крови пуповинного канатика, жировой ткани и менструальной крови.

СК обладают отличительными от других клеток свойствами, а именно: они недифференцированные, незрелые, способны к пролиферации, самообновлению, превращению в дифференцированные клетки и регенерирующие ткани и, особенно важно, что при делении они всегда дают себеподобную клетку. Имеются два основных вида клеток: *эмбриональные* и *неэмбриональные*, к которым относятся, например фетальные клетки. *Эмбриональные СК* (ЭСК) являются плюрипотентными, потому что они могут дифференцироваться во все типы клеток. В отли-

чие от них неэмбриональные СК являются мультипотентными, так как их потенциал дифференцироваться в различные типы клеток ограничен. Также различие между ними – в превалировании и большем потенциале к спонтанной дифференцировке у эмбриональных, чем у неэмбриональных клеток.

В последние десятилетия активно разрабатывается возможность применения в клинической медицине клеточных технологий, на которые возлагаются большие оптимистические надежды в лечении заболеваний считавшихся ранее не излечимыми. Взлёт научного интереса к данной теме стал возможен после получения эмбриональных СК в 1998 году (Thomson J.A. et al., 1998).

Изолированное, а также сочетанное воздействие в разных комбинациях стволовых клеток, ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией КKM обладает модулирующим эффектом на усиление активности антиоксидантов и антикоагулянтов, а также на ослабление активности оксидантов и коагулянтов.

Изолированное воздействие стволовых клеток, ЭМИ КВЧ и фитомеланина, а также сочетанное воздействие ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией КKM обладает слабым модулирующим эффектом на восстановление активности СРО и системы РАСК. Базовые лабораторные показатели в случае данных вариантов воздействия далеки от нормальных значений. Слабый модулирующий эффект исследуемых факторов коррелирует с усилением или отсутствием их влияния на зависимость между лабораторными показателями и созданием более равновесной системы. Таким образом, данные факторы не могут быть применены в качестве самостоятельных методов коррекции нарушений показателей СРО и системы РАСК в организме, подверженном введению цитостатиков.

Сочетанное воздействие стволовых клеток и ЭМИ КВЧ, сочетанное воздействие стволовых клеток и фитомеланина, а также сочетанное воздействие стволовых клеток, ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией КKM обладает сильным модулирующим эффектом на активность СРО и системы РАСК. Базовые лабораторные показатели в случае данных вариантов воздействия практически достигают

нормальных значений. Сильный модулирующий эффект исследуемых факторов коррелирует с ослаблением их влияния на зависимость между лабораторными показателями и созданием неравновесной системы. Таким образом, данные факторы могут быть применены в качестве самостоятельных методов коррекции нарушений показателей СРО и системы РАСК в организме, подверженном введению цитостатиков.

Экспериментальная гипоплазия ККМ, моделируемая путем введения цитостатиков, представляет собой неравновесную систему вследствие продолжающейся гибели клеток.

Изолированное воздействие стволовых клеток, ЭМИ КВЧ и фитомеланина, а также сочетанное воздействие ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ приводит к значительному уменьшению или к остановке процессов гибели клеток, в то же время уровень пролиферации и дифференцировки клеток по-прежнему невелик, поэтому такая система находится в состоянии равновесия.

Сочетанное воздействие стволовых клеток и ЭМИ КВЧ, сочетанное воздействие стволовых клеток и фитомеланина, а также сочетанное воздействие стволовых клеток, ЭМИ КВЧ и фитомеланина на организм с экспериментальной гипоплазией ККМ характеризуется активной пролиферацией и дифференцировкой клеток, поэтому такая система находится в неравновесном состоянии.

Механизм восстановления уровня СРО и системы РАСК посредством первичного восстановления клеточного субстрата является наиболее эффективным, другие механизмы (прямое воздействие на активность антиоксидантов и антикоагулянтов) могут рассматриваться лишь как вспомогательные.

На практике предложено:

– рассмотреть возможность применения сочетанного воздействия СК и ЭМИ КВЧ, а также сочетанного воздействия СК и фитомеланина для лечения пациентов с нарушениями протекания процессов в системе свободно-радикального окисления и в системе регуляции агрегатного состояния крови, вызванными приемом цитостатиков. Добавление к клеточной терапии одного из модулирующих факторов, особенно ЭМИ КВЧ, позволит ускорить процессы восстановления поврежденного морфологического

субстрата, что приведет, в свою очередь, к более быстрому и качественному восстановлению базовых лабораторных показателей СРО и системы РАСК.

– воздержаться от одновременного применения фитомеланина и ЭМИ КВЧ для восстановления уровня активности оксидантов, антиоксидантов, коагулянтов и антикоагулянтов при лечении пациентов с гипоплазией ККМ, возникшей на фоне приема цитостатиков. Одновременное воздействие двух факторов, обладающим прямым действием на активацию антиоксидантов, не приводит к значительному увеличению силы модулирующих эффектов на восстановление базовых лабораторных показателей СРО и системы РАСК и в то же время может само начать обладать прооксидантным действием.

– рассмотреть возможность применения законов «золотого сечения» и «золотого вурфа» при оценке базовых лабораторных показателей СРО и системы РАСК у пациентов, принимающих цитостатики.

ОСНОВНАЯ ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Агапов П.И., Петров И.Б. Расчёт повреждений мозга при черепно-мозговой травме // Компьютер и мозг. Новые технологии. – М.: Наука, 2006. – С. 28–38.
2. Бала Ю.М. Атлас практической фонокардиографии. – Воронеж, 1979.
3. Бегун П.И., Афонин П.Н. Моделирование в биомеханике. – М.: Высшая школа, 2004. – 389 с.
4. Белоцерковский О.М. Компьютер и мозг. Новые технологии. – М.: Наука, 2005. – 322 с.
5. Белоцерковский О.М., Холодов А.С. Компьютерные модели и прогресс медицины. – М.: Наука, 2001. – 300 с.
6. Бокерия Л.А., Бершвили И.И., Сигаев И.Ю. Альтернативные методы реваскуляризации миокарда // Вестник Российской Академии Медицинских Наук.– 2009.– № 12.– С. 46–51.
7. Взаимосвязь перекисного окисления липидов с нарушением коагуляционного гемостаза при взаимодействии электромагнитного излучения миллиметрового диапазона/ Хасая Д.А. [и др.] // Сборник трудов II Международного экологического конгресса (IV Международной научно-технической конференции) «Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов». – Тольятти, 2009. – Т. 4. – С. 160–163.
8. Виноградова М.С. Математическая модель клеточной популяции. URL:<http://www.mce.su/rus/presentations/p98127/> (дата обращения: 15.08.2011 г.)
9. Гармония ритмов, динамика и фрактальность крови, как проявления саногенеза: монография/ Кидалов В.Н. [и др.]; под ред. А.А. Хадарцева. – Тула: ООО РИФ «ИНФРА», 2006. – 172 с.
10. Гольдберг Е.Д., Дыгай А. М., Жданов В. В. Роль стволовых клеток в восстановлении кроветворения при цитостатических и лучевых миелосупрессиях// Бюллетень Сибирской медицины: научно-практический журнал. – 2006. – Т. 5. – № 2. – С. 35–42.
11. Дмитриева Н.В. Симметричный подход к анализу электрокардиограммы // Известия АН СССР, Сер. биолог. – 1989. – №3. – С. 450–456.
12. Долгих М.С. Перспективы лечения печёночной недостаточности стволовыми клетками // Биомед Хим.– 2008.– Том 53.– Вып. 4.– С. 376–391.
13. Дуткевич И.Г. К истории открытия групп крови // Трансфузиология.– 2002.– Т. 3, № 1.– С. 49–53.
14. Евдокимов А.В., Холодов А.С. Квазистационарная пространственно-распределенная модель замкнутого кровообращения организма человека // Компьютерные модели и прогресс медицины. – М.: Наука, 2001. – С.164–193.
15. Жуков Д.С., Петров И.Б., Тормасов А.Г. Численное и экспериментальное изучение разрушения твёрдых тел в жидкости // Известия АН СССР. Сер. Механика твёрдого тела. – 1991. – С.183–190.
16. Зорин А.В. Имитационное моделирование кинетики популяций нормальных и облученных клеток: дис... канд. физ.-мат. наук. – Л., 1983. – 160 с.
17. «Золотое сечение» как критерий тяжести патоморфологических изменений при воздействии на организм вращающихся и импульсных бегущих

магнитных полей/ Исаева Н.М. [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – Тула: Изд-во ТулГУ. – 2009. – №3. – С. 38–39.

18. Агапов П.И., Васюков А.В., Петров И.Б. Компьютерное моделирование волновых процессов в покровах мозга при черепно-мозговой травме // Процессы и методы обработки информации. – М.: МФТИ, 2006. – С.154–163.

19. Иванов Д.В. Влияние общего охлаждения на реологические показатели крови и их коррекция с помощью полэтиленоксидов молекулярной массой 400 и 1500: Дисс. ... на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.– 2000.

20. Иванов Д.В. Ишемическая болезнь сердца и клеточные технологии // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 2.– С. 177.

21. Иванов Д.В. Качество жизни при кардиомиопатиях после воздействия СК // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 2.– С. 177.

22. Иванов Д.В. Клеточные технологии при алкогольном поражении печени // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 3.– С. 177–178.

23. Иванов Д.В. Клеточные технологии при вирусном поражении печени // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 3.– С. 178.

24. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии в восстановительной медицине: Монография / Под ред. А.Н. Лищука.– Тула: Тульский полиграфист, 2011.– 180 с.

25. Иванов Д.В. Клеточные технологии при гиперлипидемиях // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 3.– С. 178–179.

26. Иванов Д.В., Корниенко А.Н., Лищук А.Н., Немытин Ю.В., Станков Д.С., Хадарцев А.А. Безопасность проведения трансплантаций клеток фетальной печени плода 2-го триместра гестации у больных кардиохирургического профиля // Вестник новых медицинских технологий.– 2006.– Т. XIII, № 2.– С. 187.

27. Иванов Д.В., Ленников Р.В., Морозов В.Н., Савин Е.И., Субботина Т.И., Хадарцев А.А., Яшин А.А. Эффект донор-акцептерного переноса проходящим электромагнитным излучением сано- и патогенных характеристик биообъекта и создание новых медицинских технологий // Вестник новых медицинских технологий.– 2010.– Т. XVII, № 2.– С. 10–15.

28. Иванов Д.В., Рязанов А.И., Хадарцев А.А. Трансплантация гепатоцитов в лечении заболеваний печени–настоящее и будущее // Вестник новых медицинских технологий.– 2006.– Т. XIII, № 3.– С. 122–125.

29. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Влияние клеточных технологий на физическое и психическое здоровье высококвалифицированных спортсменов // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 3.– С. 200–201.

30. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии – в лечении патологии печени // Вестник новых медицинских технологий.– 2006.– Т. XIII, № 2.– С. 185–187.

31. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии в лечении подагры как системного заболевания // Системный анализ и управление в биомедицинских системах.– 2009.– Т. 8, № 3.– С. 573–577.

32. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии и синергетика // Системный анализ и управление в биомедицинских системах.– 2009.– Т. 8, № 3.– С. 751–754.

33. Иванов Д.В., Хадарцев А.А., Хадарцев В.А., Седова О.А., Митюшкина О.А. Клиническое использование СК // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 4.– С. 31–33.
34. Иванов Д.В., Чабаненко А.В. Некоторые вопросы законодательного регулирования клеточных технологий: Российский и зарубежный опыт // Вестник новых медицинских технологий.– 2010.– Т. XVII, № 2.– С. 286–290.
35. Измайлов Д.Ю. Математическое моделирование кинетики перекисного окисления липидов по данным хемилюминесцентного анализа: дис.... канд. биол. наук. – М., 2003. – 157с.
36. Киясов А.П., Гумерова А.А., Титова М.А. Овальные клетки – предполагаемые стволовые клетки печени или гепатобласты? // Клет Транспл.– 2006.– Том I, № 2.– С. 55–58.
37. Клиническая лабораторная диагностика. Т. I. Основы клинического лабораторного анализа/ под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Агат-мед.– 2002.– 860 с.
38. Код Фибоначи и «Золотое сечение» в экспериментальной патофизиологии и экспериментальной магнитобиологии/ Н.М. Исаева [и др.]; под ред. Т.И. Субботиной, А.А. Яшина. – М.; Тула; Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2007. – 136с.
39. Козлова Е.Н. Стратегия восстановления утраченных сенсорных связей в спинном мозге // Мол Биол.– М., 2008.– Т. 42, № 5.– С. 820–829.
40. Корниенко А.Н., Иванов Д.В., Лишук А.Н., Немытин Ю.В., Станков Д.С. Профилактика осложнений при трансплантации клеток фетальной печени кардиохирургическим больным // Вестник новых медицинских технологий.– 2006.– Т. XIII, № 2.– С. 187–188.
41. Кругляков П.В., Соколова И.В., Зинькова Н.Н., Виде С.К., Александров Г.В., Петров Н.С., Полинцев Д.Г. In vitro и in vivo дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении // Бюлл Экс Биол Мед.– 2006.– Т. 142, № 4.– С. 503–506.
42. Куротченко Л.В., Савин Е.И., Субботина Т.И. Соблюдение равновесного состояния в условиях формирования необратимого патологического процесса// Циклы природы и общества: материалы XVI Международной научной конференции (Ставрополь, 27–28 ноября 2008г.). – Ставрополь: Изд-во Ставропольского института имени В.Д. Чурсина. – 2008. – С.164–166.
43. Лебедев А.П., Крылов В.В. Замечания к патогенезу ушибов мозга, возникающих по противоударному механизму, в остром периоде их развития// Нейрохирургия. – 1998. – С. 22–25.
44. Маркова Т.П. Вторичные иммунодефициты // Аллергология и иммунология. Образовательный портал. URL: http://www.immunallergo.ru/index.php?issue_id=11&id=3 (дата обращения: 15.08.2011 г.)
45. Математическое моделирование воздействия электромагнитных полей миллиметрового диапазона на систему регуляции агрегатного состояния крови и на процессы свободно-радикального окисления без экранирования шунгитом и при использовании шунгитного экрана/ Хасая Д.А. [и др.] // Материалы Международной научно-практической конференции «Здоровье в XXI веке–2010», Тула, 2010. – С.184–185.

46. Математическое моделирование гемодинамики в мозге и в большом круге кровообращения/ Ашметов И.В. [и др.] // Компьютер и мозг. Новые технологии. – М.: Наука, 2005. – С. 321.
47. Мороз В.В., Онищенко Н.А., Лебедев В.Г., Сидорович Г.И., Люрщикова А.В., Расулов М.Ф., Крашенинников М.Е., Севастьянов В.И. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на процессы локального радиационного повреждения у крыс после местного облучения бета-радиацией // Радиатц Биол Радиоэкол.– 2009.– Т. 49, № 6.– С. 688–693.
48. Мусина Р.А., Де Велльен Л.А., Фелицына С.Б. СК, полученные из отслоившегося эндометрия, способ их получения и применения // Бюллетень ЕАПО.– 2006.– № 3 (заявка 2004000031 (RU) 2004.08.11).
49. Мягков Б.Р. «Булгаков М.А. Избранные сочинения: В 2 т. Т. 1.».– М.: Рипол–Классик, 1997.– С. 285.
50. Пантелеев М.А. Механизмы регуляции свертывания крови: автореф. дис.... д-ра физ.-мат. наук. – Пушкино, 2010. – 23 с.
51. Пашков Р.А. Численное моделирование контракции кожной раны // Процессы и методы обработки информации. – М.: МФТИ, 2005. – С.194–200.
52. Пашков Р.А., Петров И.Б. Моделирование распространения импульсов в волокнах Пуркинье // Обработка информации и моделирование. – М.: МФТИ, 2002. – С. 171–181.
53. Петров И.Б. Математическое моделирование в медицине и биологии на основе моделей механики сплошных сред// Труды МФТИ. – 2009. – Т.1. – №1. – М.: МФТИ. – С. 5–16.
54. Петров И.Б. О численном моделировании биомеханических процессов в медицинской практике // Информационные технологии и вычислительные системы. – 2003. – № 1–2. – С.102–111.
55. Петухов С.В. Биомеханика, бионика и симметрия. – М: Наука, 1981.– 240 с.
56. Потапов И.В., Кириллов И.А. Повышение ангиогенеза как основа репаративного морфогенеза при ишемическом повреждении миокарда // Вестн Росс Акад Мед Наук.– 2007.– № 9.– С. 3–9.
57. Приказ Департамента здравоохранения Москвы «Об организации сбора СК» от 11 ноября 2003 г. № 659.
58. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Российской академией медицинских наук от 25 мая 2007 г. № 357/40 «Об утверждении перечня органов и (или) тканей человека – объектов трансплантации, перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию органов и (или) тканей человека, и перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку органов и (или) тканей человека» (Приказ 357).
59. Расчёт динамических процессов в глазу при лазерной экстракции катаракты / Балановский Н.Н. [и др.] // Математическое моделирование. – 2003. – Т. 15. – № 11. – С.37–44.

60. Репин В.С., Сабурова И.Н., Сухих Г.Т. Клеточная биология фетальных тканей и медицина // Клеточные технологии в биологии и медицине.– 2007.– № 3.– С. 123–133.

61. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология.– М.: БЭ-БиМ, 1998.– 200 с.

62. Сабурова И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В., Семенова М.Л., Пулин А.А., Репин В.С. Сопоставление поведения стромальных клеток пупочного канатика и мультипотентных стромальных клеток взрослого костного мозга в 2-D и 3-D культуре: моделирование стромальной регенерации // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– № 4.– С. 9–11.

63. Соблюдение гармоничного состояния в биологических системах при модулирующем воздействии вращающихся и импульсных бегущих магнитных полей / Исаева Н.М. [и др.] // Успехи современного естествознания.– 2010. – № 3. – С. 126–127.

64. Соколова И.В., Федотова О.Р., Зинькова Н.Н., Кругляков П.В., Полинцев Д.Г. Эффект трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на когнитивную функцию у крыс с инсультом // Бюлл Эксп Биол Мед.– 2006.– Т. 142. №4.– С. 511–514.

65. Сравнение биохимических и иммунологических показателей крови в норме и при патологии печени с позиций «золотого сечения»/ Иванов В.Б. [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.– 2010. – №1. – С.54–55.

66. Станков Д.С., Иванов Д.В., Хадарцев А.А., Субботина Т.И. Влияние эндометриальных клеток на хроническое ишемическое повреждение миокарда // Вестник новых медицинских технологий.– 2010.– Т. XVII, № 1.– С. 47–49.

67. Суббота А.Г. «Золотое сечение» (“Sectio aurea”) в медицине. Издание 2-е. – СПб: Стройлеспечать, 1996. – 168 с.

68. Сухих Г.Т., Спивак Н.И., Малайцев В.В., Богданова И.М., Шевчук В.А. Мезенхимальные прогениторные клетки. Биологические характеристики и перспективы для их использования // Физиол Жр.– 2007.– Т. 53, № 1.– С. 62–76.

69. Теоретическая возможность управления дифференциацией стволовых клеток электромагнитным излучением крайне высокого диапазона/ Иванов Д.В. [и др.] // Тез. докл. IV конференции «Проблема качества жизни в здравоохранении» (Москва, 11–13 октября 2006). – М., 2006. – №4. – С. 16.

70. Трактуев Д.О., Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Марч К.Л. Стромальные клетки жировой ткани – пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом // Цитология.– 2006.– Т. 48, № 2.– С. 83–94.

71. Хадарцев А.А., Еськов В.М., Хадарцев В.А., Иванов Д.В. Клеточные технологии с позиции синергетики // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 4.– С. 7–9.

72. Хадарцев А.А., Иванов Д.В., Наумова Э.М., Хасая Д.А. Эндометриальные СК менструальной крови и возможность их применения в заместительной терапии // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 3.– С. 147–151.

73. Хадарцев А.А., Иванов Д.В., Степанова Т.В., Станков Д.С., Горбаков В.В. Эффективность клеточной терапии у больных хроническим гепатитом С,

не ответившим на курс противовирусной терапии пегилированными интерферонами и рибавирином // Вестник новых медицинских технологий.– 2007.– Т. XIV, № 3.– С. 107.

74. Хадарцев А.А., Иванов Д.В., Шаталов А.В., Потапов И.В. Качество жизни у пациента с подпагрой после аутотрансплантации клеток костного мозга(клиническое наблюдение) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.– 2006.– Т. 1, № 3(5).– С. 73–75.

75. Хайер Э., Винер Г. Решение обыкновенных дифференциальных уравнений. Жесткие и дифференциально–гиперболические задачи. – М.: Мир, 1999. – 685 с.

76. Холодов А.С. Некоторые динамические модели внешнего дыхания и кровообращения с учётом их связности и переноса вещества// Компьютерные модели и прогресс медицины. – М.: Наука, 2001. – С.127–165.

77. Цыб А.Ф., Рошаль Л.М., Юшаков В.В., Коноплянников А.Г., Шушкевич Г.Н., Бандурко Л.Н., Ингель И.Е., Семенова Ж.Б., Коноплянникова О.А., Лепехина Л.А., Кальшина С.С., Верховский Ю.Г., Шевчук А.С., Семенкова И.В. Морфофункциональное изучение терапевтического эффекта аутологичных мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальном диффузном поражении головного мозга у крыс // Бюлл Эксп Биол Мед.– 2006.– Т. 142, № 1.– С. 140–147.

78. Черныш П.П. Гармонические соотношения в строении и функции сердечно–сосудистой системы //Журнал теоретической и клинической медицины. Морфология и физиология. – 2000. – №1.

79. Чуян Е.Н., Бирюкова Е.А., Раваева М.Ю. Изменение показателей функционального состояния человека под воздействием низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ// Физика живого. – Изд–во Научно–исследовательского центра квантовой медицины «Отзывы». – 2008. – Т. 16. – №1. – С.91–98.

80. Чуян Е.Н., Джелдубаева Э.Р. Механизмы антиоцицептивного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения: монография. – Симферополь: «ДИАЙПИ», 2006. – 458 с.

81. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц., Зайцев К.В., Егорова А.Б., Шахова С.С., Загребин Л.В., Волгушев С.А. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / Под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова, Г.Ц. Дамбаева.– Томск: STT, 2004.– 386 с.

82. Эффективность КВЧ–терапии при цитостатической депрессии кроветворения/ Карева Н.П. [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – С. 105–113.

83. Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации // Патол Физиол Эксп Тер.– 2008.– № 1.– С. 2–8.

84. Abbott J.A., Garry R. The surgical management of menorrhagia // Human Reproduction Update.– 2002.– Vol. 8, No. 1.– P. 68–78.

85. Abdallah B.M., Haack-Sorensen M., Burns J.S., et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive prolifer-

eration [published correction appears in *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 329(4):1361]. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 326(3):527–538.

86. Abe R., Donnelly S.C., Peng T., Bucala R., Metz C.N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites // *J Immunol.*– 2001.– Vol. 166.– P. 7556–7562.

87. Altman G.H., Horan R.L., Martin I., Farhadi J., Stark P.R., Volloch V., Richmond J.C., Vunjak–Novakovic G., Kaplan D.L. Cell differentiation by mechanical stress // *FASEB J.*– 2002.– Vol. 16.– P. 270–272.

88. Alviano F., Fossati V., Marchionni C. et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro // *BMC Dev.Biol.*– 2007.– Vol. 7.– P. 11.

89. Arrell D.K., Niederländer N.J., Faustino R.S., Behfar A., Terzic A. Cardioinductive network guiding stem cell differentiation revealed by proteomic cartography of tumor necrosis factor alphaprimered endodermal secretome // *Stem Cells.*– 2008.– Vol. 26.– P. 387–400.

90. Asahina K., Teramoto K., Teraoka H. Embryonic stem cells: hepatic differentiation and regenerative medicine for the treatment of liver disease // *Curr Stem Cell Res Ther.*– 2006, May.– Vol. 1, № 2.– P. 139–156.

91. Baddoo M., Hill K., Wilkinson R. et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection // *J Cell Biochem.*– 2003.– Vol. 89.– P. 1235–1249.

92. Badiavas E.V., Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow–derived cells // *Arch Dermatol.*– 2003.– Vol. 139.– P. 510–516.

93. Bailey A.S., Willenbring H., Jiang S., Anderson D.A., Schroeder D.A., Wong M.H., Grompe M., Fleming W.H. Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium // *Proc Natl Acad Sci USA.*– 2006, Aug 29.– Vol. 103, № 35.– P. 13156–13161.

94. Bakken A.M. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. Review // *Curr Stem Cell Res Ther.*– 2006.– Vol. 1(1).– P. 47–54.

95. Baksh D., Song L., Tuan R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy // *J Cell Mol Med.*– 2004.– Vol. 8.– P. 301–316.

96. Ballen K.K., Haley N.R., Kurtzberg J., et al. Outcomes of 122 diverse adult and pediatric cord blood transplant recipients from a large cord blood bank // *Transfusion.*– 2006.– Vol. 46(12).– P. 2063–2070.

97. Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients // *Ann Neurol.*– 2005.– Vol. 57(6).– P. 874–882.

98. Baptiste D.C., Fehlings M.G. Update on the treatment of spinal cord injury // *Prog Brain Res.*– 2007.– Vol. 161.– P. 217–233.

99. Battula V.L., Bareiss P.M., Treml S. et al. Human placenta and bone-marrow derived MSC cultured in serum–free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation // *Differentiation.*– 2007.– Vol. 75.– P. 279–291.

100. Battula V.L., Treml S., Abele H., Bühring H.J. Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9–specific monoclonal antibody // *Differentiation.*– 2008.– Vol. 76.– P. 326–336.

101. Behfar A., Faustino R.S., Arrell D.K., Dzeja P.P., Perez-Terzic C., Terzic A. Guided stem cell cardiopoiesis: discovery and translation // *J Mol Cell Cardiol.*– 2008.– Vol. 45.– P. 523–529.
102. Bellini A., Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses // *Lab Invest.*– 2007.– Vol. 87.– P. 858–870.
103. Bensidhoum M., Chapel A., Francois S., Demarquay C., Mazurier C., Fouillard L., Bouchet S., Bertho J.M., Gourmelon P., Aigueperse J., et al. Homing of in vitro expanded Stro-1– or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment // *Blood.*– 2004.– Vol. 103.– P. 3313–3319.
104. Bianco P., Robey P.G. Stem cells in tissue engineering // *Nature.*– 2001.– Vol. 414.– P. 118–121.
105. Bickenbach J.R., Dunnwald M. Epidermal stem cells: characteristics and use in tissue engineering and gene therapy // *Adv Dermatol.*– 2000.– Vol. 16.– P. 159–183.
106. Biervliet et al. A successful cycle of IVF-ET after treatment of endometrial ossification; case report and review // *Journal of Obstetrics and Gynaecology.*– 2004.– Vol. 24, Issue 4.– P. 472–473.
107. Billon N., Jolicoeur C., Raff M. Generation and characterization of oligodendrocytes from lineage-selectable embryonic stem cells in vitro // *Methods Mol Biol.*– 2006.– Vol. 330.– P. 15–32.
108. Blashki D., Short B., Bertoncello I., Simmons P.J., Brouard N: Identification of stromal MSC candidates from multiple adult mouse tissues // *In Int Soc Stem Cell Res 4th Annual Meeting.*– 2006.– P. 206.
109. Bobis S., Jarocha D., Majka M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications // *Folia Histochemica et citobiologica.*– 2006.– Vol. 44(4). – P. 215–230.
110. Bossolasco P., Montemurro T., Cova L., et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential // *Cell Res.*– 2006.– Vol. 16.– P. 329–336.
111. Bouwens L., Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass // *Physiol Rev.*– 2005, Oct.– Vol. 85, № 4.– P. 1255–1270.
112. Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice // *Science.*– 2000.– Vol. 290(5497).– P. 1775–1779.
113. Brooke G., Tong H., Levesque J.P., Atkinson K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta // *Stem Cells Dev.*– 2008.– Vol. 1, № 7.– P. 929–940.
114. Broxmeyer H.E. Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit // *Cytotherapy.*– 2005.– Vol. 7.– P. 209–218.
115. Broxmeyer H.F., Srour E., Orschell C. et al. Cord blood stem cell and progenitor cells // *Methods Enzymol.*– 2006.– Vol. 419.– P. 439–473.
116. Campos L.S. $\beta 1$ integrins and neural stem cells: making sense of the extracellular environment // *BioEssays.*– 2005.– Vol. 27.– P. 698–707.

117. Cao Q., He Q., Wang Y., Cheng X., Howard R.M., Zhang Y., De Vries W.H., Shields C.B., Magnuson D.S., Xu X.M., Kim D.H., Whittemore S.R. Transplantation of ciliary neurotrophic factor-expressing adult oligodendrocyte precursor cells promotes remyelination and functional recovery after spinal cord injury // *J Neurosci.*– 2010, Feb 24.– Vol. 30, № 8.– P. 2989–3001.
118. Cao Q.L., Onifer S.M., Whittemore S.R. Labeling stem cells in vitro for identification of their differentiated phenotypes after grafting into the CNS // *Methods Mol Biol.*– 2002.– Vol. 198.– P. 307–318.
119. Cao Q.L., Zhang Y.P., Howard R.M., et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage // *Exp Neurol.*– 2001.– Vol. 167(1).– P. 48–58.
120. Carlin R., Davis D., Weiss M., Schultz B., Troyer D. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PI.JC) matrix cells // *Reprod. Biol. Endocrinol.*– 2006.– Vol. 4.– P. 8.
121. Carpenter M.K., Inokuma M.S., Denham J., Mujtaba T., Chiu C.P., Rao M.S. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells // *Exp Neurol.*– 2001.– Vol. 172(2).– P. 383–397.
122. Castro R.F., Jackson K.A., Goodell M.A., Robertson C.S., Liu H., Shine H.D. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo // *Science.*– 2002.– Vol. 297(5585).– P. 1299.
123. Cervello I., Martinez–Conejero J.A., Horcajadas J.A., Pellicer A., Simon C. Identification, characterization and co–localization of label–retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers // *Hum. Reprod.*– 2007.– Vol. 22.– P. 45–51.
124. Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell.*– 2003.– Vol. 113.– P. 643–655.
125. Chang C.M., Kao C.L., Chang Y.L. et al. Placenta–derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin–positive cells. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2007.– Vol. 357.– P. 414–420.
126. Chang Y.J., Shih D.T., Tseng C.P., Hsieh T.B., Lee D.C., Hwang S.M. Disparate mesenchyme–lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood // *Stem Cells.*– 2006.– Vol. 24.– P. 679–685.
127. Chen C.P., Kiel M.E., Sadowski D., McKinnon R.D. From stem cells to oligodendrocytes: prospects for brain therapy // *Stem Cell Rev.*– 2007.– Vol. 3(4).– P. 280–288.
128. Chen C.P., Lee M.Y., Huang J.P. et al. Trafficking of multipotent mesenchymal stromal cells from maternal circulation through the placenta involves vascular endothelial growth factor-1 and integrins // *Stem Cells.*– 2008.– Vol. 26.– P. 550–561.
129. Chen D., Zhao M., Mundy G.R. Bone morphogenetic proteins // *Growth Factors.*– 2004.– Vol. 22.– P. 233–241.
130. Cheng Z., Ou L., Zhou X. et al. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance // *Mol Ther.*– 2008.– Vol. 16.– P. 571–579.

131. Chiavegato A., Bollini S., Pozzobon M. et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immunosuppressed or immunodeficient rat // *J. Mol.Cell. Cardiol.*– 2007.– Vol. 42.– P. 746–759.
132. Chiba T., Zheng Y.W., Kita K., Yokosuka O., Saisho H., Onodera M., Miyoshi H., Nakano M., Zen Y., Nakanuma Y., Nakauchi H., Iwama A., Taniguchi H. Enhanced Self-Renewal Capability in Hepatic Stem/Progenitor Cells Drives Cancer Initiation // *Gastroenterology.*– 2007.
133. Chien C.C., Yenn B.L., Lee F.K. et al. In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into heparocyte-like cells // *Stem Cells.*– 2006.– Vol. 24.– P. 1759–1768.
134. Cho N.H., Park Y.K., Kim Y.T., Yang H., Kim S.K. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium // *Fert. and Steril.*– 2004.– Vol. 81(2).– P. 403–407.
135. Cibelli J.B., Grant K.A., Chapman K.B., et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates // *Science.*– 2002.– Vol. 295 (5556). – P. 819.
136. Conconi M.T., Burra P., Di Liddo R. et al. CD105⁺ cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiation potential // *Int.J.Mol.Med.*– 2006.– Vol. 18.– P. 1089–1096.
137. Coutts M., Keirstead H.S. Stem cells for the treatment of spinal cord injury // *Exp Neurol.*– 2008.– Vol. 209(2).– P. 368–377.
138. Cui C.H., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation // *Mol Biol Cell.*– 2007 May.– Vol. 18(5).– P. 1586–1594.
139. Cummings B.J., Uchida N., Tamaki S.J., Anderson A.J. Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord injured mice: association with recovery of locomotor function. // *Neurol Res.*– 2006.– Vol. 28(5).– Vol. 474–481.
140. Cummings B.J., Uchida N., Tamaki S.J., et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice // *Proc Natl Acad Sci USA.*– 2005.– Vol. 102(39).– P. 14069–14074.
141. Daley G.Q., Hyun I., Lindvall O. Mapping the road to the clinical translation of stem cells // *Cell Stem Cell.*– 2008.– Vol. 2.– P. 139–140.
142. Datta N., Holtorf H.L., Sikavitsas V.I., Jansen J.A., Mikos A.G. Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells // *Biomaterials.*– 2005.– Vol. 26.– P. 971–977.
143. Dawn B., Tiwari S., Kucia M.J. et al. Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction // *Stem Cells.*– 2008.– Vol. 26.– P. 1646–1655.
144. De Coppi P., Bartsch G. Jr., Siddiqui M.M. et al. Isolation of amniotic stem cells with potential for therapy // *Nat. Biotech.*– 2007.– Vol. 25.– P. 100–106.
145. Deguchi T., Komada Y., Sugiyama K., Zhang X.L., Azuma E., Yamamoto H., Sakurai M. Expression of homing-associated cell adhesion molecule (H-

CAM/CD44) on human CD34+ hematopoietic progenitor cells // *Exp Hematol.*– 1999.– Vol. 27.– P. 542–552.

146. Dennis J.E., Carbillet J.P., Caplan A.I., Charbord P. The STRO–1+ marrow cell population is multipotential // *Cells Tissues Organs.*– 2002.– Vol. 170.– P. 73–82.

147. Deshpande D.M., Kim Y.S., Martinez T., et al. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells // *Ann Neurol.*– 2006.– Vol. 60(1).– P. 32–44.

148. Dezawa M., Ishikawa H., Itokazu Y., Yoshihara T., Hoshino M., Takeda S., Ide C., Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration // *Science.*– 2005.– Vol. 309.– P. 314–317.

149. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.*– 2006.– Vol. 8(4).– P. 315–317.

150. Du H., Taylor H.S. Contribution of bone marrow–derived stem cells to endometrium and endometriosis // *Stem Cells.*– 2007.– Vol. 25(8).– P. 2082–2086.

151. Dunnwald M., Tomanek–Chalkley A., Alexandrunas D., Fishbaugh J., Bickenbach J.R. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering // *Exp Dermatol.*– 2001.– Vol. 10.– P. 45–54.

152. Eichmann A., Yuan L., Moyon D., Lenoble F., Pardanaud L., Breant C. Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks // *Int J Dev Biol.*– 2005.– Vol. 49, № 2–3.– P. 259–267.

153. Eisenberg C.A., Burch J.B., Eisenberg L.M. Bone marrow cells transdifferentiate to cardiomyocytes when introduced into the embryonic heart // *Stem Cells.*– 2006.– Vol. 24(5).– P. 1236–1245.

154. Emanuel P. AFS cells – where do they fit on the continuum? *The Hematologist: ASH News and Reports.*– 2007.– Vol. 4, № 1.

155. Enzmann G.U., Benton R.L., Woock J.P., Howard R.M., Tsoulfas P., Whittemore S.R. Consequences of noggin expression by neural stem, glial, and neuronal precursor cells engrafted into the injured spinal cord // *Exp Neurol.*– 2005.– Vol. 195(2).– P. 293–304.

156. Faustino R.S., Behfar A., Perez–Terzic C., Terzic A. Genomic chart guiding embryonic stem cell cardiopoiesis // *Genome Biol.*– 2008.

157. Feroni C., Galli R., Cipelletti B., et al. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo // *Cancer Res.*– 2007.– Vol. 67(8).– P. 3725–3733.

158. Foster L.J., Zeemann P.A., Li C., Mann M., Jensen O.N., Kassem M. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation // *Stem Cells.*– 2005.– Vol. 23(9).– P. 1367–1377.

159. Francois S., Bensidhoum M., Mousieddine M., Mazurier C., Allenet B., Semont A., Frick J., Sache A., Bouchet S., Thierry D., et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage // *Stem Cells.*– 2006.– Vol. 24.– P. 1020–1029.

160. French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts Development of Human cloned Blastocysts Following Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) with Adult Fibroblasts // *Stem Cells.*– 2008.– Vol. 26.– P. 485–493.

161. Friedman M.S., Long M.W., Hankenson K.D. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6 // *J Cell Biochem.*– 2006.– Vol. 98.– P. 538–554.

162. Fu Y.S., Cheng Y.C., Lin M.Y. et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism // *Stem Cells.*– 2006.– Vol. 24.– P. 115–124.

163. Fuchs E., Segre J.A. Stem cells: A new lease on life // *Cell.*– 2000.– Vol. 100.– P. 143–155.

164. Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D., Hirose L., Kitamura T., Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem /progenitor cell potential // *Stem Cells.*– 2004.– Vol. 22.– P. 649–658.

165. Gale Jr.M., Foy E.M. Evasion of intracellular host defense by hepatitis C virus // *Nature.*– 2005.– Vol. 436.– P. 939–945.

166. Galtrey C.M., Asher R.A., Nothias F., Fawcett J.W. Promoting plasticity in the spinal cord with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair // *Brain.*– 2007.– Vol. 130(Pt 4).– P. 926–939.

167. Garcí'a R., Aguiar J., Alberti E., de la Cue'tara K., Pavo'n N. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors // *Biochem Biophys Res Commun.*– 2004.– Vol. 316(3).– P. 753–754.

168. Gardiner P., Beaumont E., Cormery B. Motoneurons “learn” and “forget” physical activity // *Review. Can J Appl Physiol.*– 2005.– Vol. 30(3).– P. 352–370.

169. Gargett C.E. Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells // *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*– 2006 Jun.– Vol. 46(3).– P. 250–253.

170. Gargett C.E. Uterine stem cells: what is the evidence? // *Hum Reprod Update.*– 2007.– Vol. 13.– P. 87–101.

171. Gargett C.E., Schwab K.E., Zillwood R.M., Nguyen H.P., Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium // *Biol Reprod.*– 2009 Jun.– Vol. 80(6).– P. 1136–1145.

172. Gaspar C., Fodde R. APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation // *Int J Dev Biol.*– 2004.– Vol. 48.– P. 377–386.

173. Gersh B.J., Simari R.D., Behfar A., Terzic C.M., Terzic A. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective // *Mayo Clin Proc.*– 2009.– Vol. 84.– P. 876–892.

174. Gerstenfeld L.C., Barnes G.L., Shea C.M., Einhorn T.A. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment // *Connect Tissue Res.*– 2003.– Vol. 44(Suppl 1).– P. 85–91.

175. Gilbert S.F., Tyier A.L., Zackin E.J. Bioethics and the New Embryology: Springboards for the Debate // *Sinauer Associates, Inc., MA, USA* 20.– 2005.

176. Gindraux F., Selmani Z., Obert L. et al. Human and rodent bone marrow mesenchymal stem cells that express primitive stem cell markers can be directly

enriched by using the CD49a molecule // *Cell Tissue Res.*– 2007.– Vol. 327.– P. 471–483.

177. Gorin N.C., Piantadosi S., Stull M., Bonte H., Wingard J.R., Civin C. Increased risk of lethal graft-versus-host diseaselike syndrome after transplantation into NOD/SCID mice of human mobilized peripheral blood stem cells, as compared to bone marrow or cord blood // *J Hematother Stem Cell Res.*– 2002.– Vol. 11(2).– P. 277–292.

178. Grayson W.L., Zhao F., Izadpanah R., Bunnell B., Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs // *J Cell Physiol.*– 2006.– Vol. 207.– P. 331–339.

179. Gronthos S., Simmons P.J., Graves S.E. et al. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix // *Bone.*– 2001.– Vol. 28.– P. 174–181.

180. Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J., Shi S., Graves S.E., Kortessidis A., Simmons P.J. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow // *J Cell Sci.*– 2003.– Vol. 116.– P. 1827–1835.

181. Guillot P.V., Gotherstrom C., Chan J., Kurata H., Fisk N.M. Hinnan first trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC // *Stem Cells.*– 2007.– Vol. 25.– P. 646–654.

182. Guo T., Hebrok M. Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy // *Endocr Rev.*– 2009, May.– Vol. 30, № 3.– P. 214–227.

183. Halle P., Tournilhac O., Knopinska-Posluszny W., et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at –80°C, with only 3.5% DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations // *Transfusion.*– 2001.– Vol. 41.– P. 667–673.

184. Han X., Meng X., Yin Z., Rogers A., Zhong J., Rillema P., Jackson J.A., Ichim T.E., Minev B., Carrier E., Patel A.N., Murphy M.P., Min W.P., Riordan N.H. Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells // *Cell Cycle.*– 2009, Feb 15.– Vol. 8(4).– P. 606–610.

185. Hardy S.A., Maltman D.J., Przyborski S.A. Mesenchymal stem cells as mediators of neural differentiation. Review // *Curr Stem Cell Res Ther.*– 2008.– Vol. 3(1).– P. 43–52.

186. Hemberger M., Yang W., Natale D., et al. Stem cells from fetal membranes. A Workshop Report // *Placenta.*– 2008.– Vol. 22.– S. 17–19.

187. Hida N., Nishiyama N., Miyoshi S., Kira S., Segawa K., Uyama T., Mori T., Miyado K., Ikegami Y., Cui C., Kiyono T., Kyo S., Shimizu T., Okano T., Sakamoto M., Ogawa S., Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells // *Stem Cells.*– 2008.– Vol. 26.– P. 1695–1704.

188. Hoffmann A., Pelled G., Turgeman G., Eberle P., Zilberman Y., Shinar H., Keinan-Adamsky K., Winkel A., Shahab S., Navon G., et al. Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells // *J Clin Invest.*– 2006.– Vol. 116.– P. 940–952.

189. Horita Y., Honmou O., Harada K., Houkin K., Hamada H., Kocsis J.D. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-

modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat // *J Neurosci Res.*– 2006, Nov 15.– Vol. 84, № 7.– P. 1495–1504.

190. Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K. et al. Isolated allogeneic bone marrow–derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implication for cell therapy of bone // *PNAS.*– 2002.– Vol. 99(13).– P. 8932.

191. Hwang W.S., Poh S.I., Lee B.C., et al. Patient–specific embryonic stem cells derived from SCNT blastocysts // *Science.*– 2005.– Vol. 308.– P. 1777.

192. Hwang W.S., Ryu Y.J., Park J.H. et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from cloned blastocyst // *Science.*– 2004.– Vol. 303.– P. 5664.

193. Ilancheran S., Michalska A., Peh G., Wallace E.M., Pera M., Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential // *Biol.Reprod.*– 2007.– Vol. 77.– P. 577–588.

194. In't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg–van der Keur C et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta // *Stem Cells.*– 2004.– Vol. 22.– P. 1338–1345.

195. Jabbour H.N., Kelly R.W., Fraser H.M., Critchley H.O.D. Endocrine regulation of menstruation // *Endocrine Rev.*– 2006.– Vol. 27.– P. 17–46.

196. Jaenisch R., Young R. The molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming // *Cell.*– 2008.– Vol. 132.– P. 567–582.

197. Jendelova P., Herynek V., Urdzi'kova L., et al. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord // *J Neurosci Res.*– 2004.– Vol. 76(2).– P. 232–243.

198. Jensen T.G. Cutaneous gene therapy // *Ann Med.*– 2007.– Vol. 39.– P. 108–115.

199. Jeon E.J., Lee K.Y., Choi N.S., Lee M.H., Kim H.N., Jin Y.H., Ryoo H.M., Choi J.Y., Yoshida M., Nishino N., et al. Bone morphogenetic protein–2 stimulates Runx2 acetylation // *J Biol Chem.*– 2006.– Vol. 281.– P. 16502–16511.

200. Joggerst S.J., Hatzopoulos A.K. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers // *Expert Rev Mol Med.*– 2009, Jul 8.– Vol. 11.– P. 20.

201. Jones B.J., Brooke G., Atkinson K., McTaggart S.J. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3–dioxygenase; a role for mesenchymal stem cells // *Placenta.*– 2007.– Vol. 28.– P. 1174–1181.

202. Jones E.A., Kinsey S.E., English A. et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells // *Arthritis Rheum.*– 2002.– Vol. 46.– P. 3349–3360.

203. Jujo K., Ii M., Losordo D.W. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium // *J Mol Cell Cardiol.*– 2008, Oct.– Vol. 45, № 4.– P. 530–544.

204. Karahuseynoglou S., Cinar O., Kilic E. et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma; in situ and in vitro surveys // *Stem Cells.*– 2007.– Vol. 25.– P. 319–331.

205. Ke Y., Chi L., Xu R., Luo C., Gozal D., Liu R. Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice // *Stem Cells.*– 2006.– Vol. 24(4).– P. 1011–1019.
206. Keating A. How do mesenchymal stromal cells suppress T-cells? // *Cell Stem Cell.*– 2008.– Vol. 2.– P. 106–108.
207. Keating A. Mesenchymal stromal cells // *Curr Opin Hematol.*– 2006.– Vol. 13(6).– P. 419–425.
208. Keirstead H.S. Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation. Review // *J Neurosci Res.*– 2001.– Vol. 63(3).– P. 233–236.
209. Keirstead H.S., Nistor G., Bernal G., et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury // *J Neurosci.*– 2005.– Vol. 25(19).– P. 4694–4705.
210. Kiel M.J., He S., Ashkenazi R., Gentry S.N., Teta M., Kushner J.A., Jackson T.L., Morrison S.J. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU // *Nature.*– 2007.– Vol. 449.– P. 238–242.
211. Kim D.S., Cho H.J., Choi H.R., Kwon S.B., Park K.C. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents // *Cell Mol Life Sci.*– 2004.– Vol. 61.– P. 2774–2781.
212. Kim H., Kim S.W., Nam D., Kim S., Yoon Y.S. Cell therapy with bone marrow cells for myocardial regeneration // *Antioxid Redox Signal.*– 2009, Aug.– Vol. 11, № 8.– P. 1897–1911.
213. Kim J., Lee Y., Kim H. et al. Human anisotropic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells // *Cell Protif.*– 2007.– Vol. 40.– P. 75–90.
214. Kim J.S., Romero R., Tarca A. et al. Gene expression profiling demonstrates a novel role for fetal fibrocytes and the umbilical vessels in human fetoplacental development // *J.Cell.Mol. Med.*– 2008.– Vol. 12.– P. 1317–1330.
215. Kim S.I., Song C.H., Sung H.J. et al. Human placenta-derived feeders support prolonged undifferentiated propagation of a human embryonic stem cell line– SNUhES3: comparison with human bone marrow-derived feeders // *Sum Cells Dev.*– 2007.– Vol. 16.– P. 421–428.
216. Kim Y.J., Yu J.M., Joo H.J., Kim H.K., Cho H.H., Bae Y.C., Jung J.S. Role of CD9 in proliferation and proangiogenic action of human adipose-derived mesenchymal stem cells // *Pflugers Arch.*– 2007, Aug 1.
217. Kinoshita T., Miyajima A. Cytokine regulation of liver development // *BiochimBiophysActa.*– 2002, Nov 11.– Vol. 1592, № 3.– P. 303–312.
218. Kissel C.K., Lehmann R., Assmus B. et al. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure // *J Am Coll Cardiol.*– 2007.– Vol. 49.– P. 2341–2349.
219. Klimanskaya I., Rosenthal N., Lanza R. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications // *Nat. Rev. Drug Discov.*– 2008.– Vol. 7.– P. 131–142.
220. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function // *Nat Med.*– 2001.– Vol.

7.– P. 430–436.

221. Kohyama J., Abe H., Shimazaki T., et al. Brain from bone: Efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent // *Differentiation*.– 2001.– Vol. 68(4–5).– P. 235–244.

222. Kolambkar Y.M., Peister A., Soker S., Atala A., Guldborg R.E. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells // *J.Mol.Histol.*– 2007.– Vol. 38.– P. 405–413.

223. Kucia M., Reza R., Campbell F.R. et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow // *Leukemia*.– 2006.– Vol. 20.– P. 857–869.

224. Kucia M., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood // *Stem Cells*.– 2008.– Vol. 26.– P. 2083–2092.

225. Kung J.W., Currie I.S., Forbes S.J., Ross J.A. Liver development, regeneration, and carcinogenesis // *J Biomed Biotechnol.*– 2010.– Vol. 98.– P. 42–48.

226. Kunisaki S.M., Armant M., Kao G.S., Stevenson K., Kirn H., Fauza D.O. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes; a prelude to clinical trials // *J. Pediatr. Surg.*– 2007.– Vol. 42.– P. 974–980.

227. Kupatt C., Hinkel R., von Brühl M-L. et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium // *J Am Coll Cardiol.*– 2007.– Vol. 49.– P. 1575–1584.

228. Lang I., Schweizer A., Hidden U. et al. Human fetal placenta endothelial cells have a mature arterial and a juvenile venous phenotype with adipogenic and osteogenic differentiation potential // *Differentiation*.– 2008.– Vol. 76.– P. 1031–1043.

229. Lange C., Bassler P., Lioznov M.V., Bruns H., Kluth D., Zander A.R., Fiegel H.C. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells // *World J Gastroenterol.*– 2005.– Vol. 11.– P. 4497–4504.

230. Langton A.K., Herrick S.E., Headon D.J. An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution // *J Invest Dermatol.*– 2008.– Vol. 128.– P. 1311–1318.

231. Larcher F., Dellambra E., Rico L., Bondanza S., Murillas R., Cattoglio C., Mavilio F., Jorcano J.L., Zambruno G., Del Rio M. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy // *Mol Ther.*– 2007.– Vol. 15.– P. 1670–1676.

232. Lazaro C.A., Chang M., Tang W., Campbell J., Sullivan D.G., Gretch D.A., Corey W., RW Coombs, and Nelson Fausto HCV Replication in Human Hepatocytes // *AJP February*.– 2007.– Vol. 170, № 2.– P. 478–489.

233. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells // *Exp Hematol.*– 2003.– Vol. 31.– P. 890–896.

234. Lee D.D., Grossman E., Chong A.S. Cellular therapies for type 1 diabetes // *Horm Metab Res.*– 2008, Feb.– Vol. 40, № 2.– P. 147–154.

235. Lee H., Shamy G.A., Elkabetz Y., et al. Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell derived motoneurons // *Stem Cells*.– 2007.– Vol. 25(8).– P. 1931–1939.

236. Lee J., Kuroda S., Shichinohe H., et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice // *Neuropathology*.– 2003.– Vol. 23(3).– P. 169–180.
237. Lee K.H., Suh–Kim H., Choi J.S., Jeun S.S., Kim E.J., Kim S.S., Yoon do H., Lee B.H. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats // *Acta Neurobiol Exp (Wars)*.– 2007.– Vol. 67, № 1.– P. 13–22.
238. Levicar N., Dimarakis I., Flores C., Tracey J., Gordon M.Y., Habib N.A. Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes // *Handb Exp Pharmacol*.– 2007.– Vol. 180.– P. 243–262.
239. Levy V., Lindon C., Zheng Y., Harfe B.D., Morgan B.A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding // *FASEB J*.– 2007.– Vol. 21.– P. 1358–1366.
240. Li C., Zhang W., Jiang X., Mao N. Human placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells // *Cell Tissue Res*.– 2007.– Vol. 330.– P. 437–446.
241. Li D., Wang G.Y., Dong B.H., Zhang Y.C., Wang Y.X., Sun B.C. Biological characteristics of human placental mesenchymal stem cells and their proliferative response to various cytokines // *Cells Tissue Organs*.– 2007.– Vol. 186.– P. 169–179.
242. Li H., Yu B., Zhang Y., Pan Z., Xu W., Li H. Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes // *Biochem Biophys Res Commun*.– 2006.– Vol. 341.– P. 320–325.
243. Li L., Xie T. Stem cell niche: structure and function // *Annu Rev Cell Dev Biol*.– 2005.– Vol. 21.– P. 605–631.
244. Li X.J., Du Z.W., Zarnowska E.D., et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells // *Nat Biotechnol*.– 2005.– Vol. 23(2).– P. 215–221.
245. Lim P.A., Tow A.M. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature // *Ann Acad Med Singapore*.– 2007, Jan.– Vol. 36, № 1.– P. 49–57.
246. Lin K.K., Goodell M.A. Purification of hematopoietic stem cells using the side population // *Methods Enzymol*.– 2006.– Vol. 420.– P. 255–264.
247. Liu S., Qu Y., Stewart T.J., et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation // *Proc Natl Acad Sci USA*.– 2000.– Vol. 97(11).– P. 6126–6131.
248. Llado J., Haeggeli C., Maragakis N.J., Snyder E.Y., Rothstein J.D. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors // *Mol Cell Neurosci*.– 2004.– Vol. 27(3).– P. 322–331.
249. Lorenzini S., Andreone P. Regenerative medicine and liver injury: what role for bone marrow derived stem cells? // *Curr Stem Cell Res Ther*.– 2007, Jan.– Vol. 2, № 1.– P. 83–88.
250. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts // *Proc Natl Acad Sci USA*.– 2008.– Vol. 105(8).– P. 2883–2888.

251. Lu P., Jones L.L., Snyder E.Y., Tuszynski M.H. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury // *Exp Neurol.*– 2003.– Vol. 181(2).– P. 115–129.
252. Mahmood A., Lu D., Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury // *J Neurotrauma.*– 2004.– Vol. 21(1).– P. 33–39.
253. Mao J.L., Kurman R.J., Huang C.C., Lin M.C., Shih I.E.M. Immunohistochemistry of choriocarcinoma: an aid in differential diagnosis and in elucidating pathogenesis // *Am.J.Surg.Pathol.*– 2007.– Vol. 31.– P. 1726–1732.
254. Marcus A.J., Coyne T.M., Ranch J., Woodbury D., Black I.B. Isolation, characterization and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane // *Differentiation.*– 2008.– Vol. 76.– P. 130–144.
255. Martens D.J., Seaberg R.M., van der Kooy D. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord // *Eur J Neurosci.*– 2002.– Vol. 16(6).– P. 1045–1057.
256. Martinez–Fernandez A., Nelson T.J., Yamada S., et al. iPS programmed without c–MYC yield proficient cardiogenesis for functional heart chimerism // *Circ Res.*– 2009.– Vol. 105.– P. 648–656.
257. Massague J., Blain S.W., Lo R.S. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders // *Cell.*– 2000.– Vol. 103.– P. 295–309.
258. Mathews D.J., Sugarman J., Bok H., et al. Cell–based interventions for neurologic conditions. Ethical challenges for early human trials // *Neurology.*– 2008.– Vol. 71(4).– P. 288–293.
259. Matthai C., Horvat R., Noe M., Nagele F., Radjabi A., van Trotsenburg M., Huber J., Kolbus A. Oct–4 expression in human endometrium // *Mol Hum Reprod.*– 2006 Jan.– Vol. 12(1).– P. 7–10.
260. Mazurier F., Doedens M., Gan O.I. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD–SCID mice reveals a new class of human stem cells // *Nat. Med.*– 2003.– Vol. 9.– P. 953–963.
261. McNiece I.K., Almeida–Parada G., Shpall E.J. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long–term engrafting potential // *Exp. Hematol.*– 2002.– Vol. 30.– P. 612–616.
262. Menasche P., Hagege A.A., Scorsin M. et al. Myoblast transplantation for heart failure // *Lancet.*– 2001.– Vol. 357(9252).– P. 279.
263. Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thébaud B., Riordan N.H. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population // *Journal of Translational Medicine.*– 2007.– Vol. 5.– P. 57.
264. Messina E., De Angelis L., Frati G., et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart // *Circ Res.*– 2004.– Vol. 95.– P. 911–921.
265. Metcalfe A.D., Ferguson M.W. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration // *J R Soc Interface.*– 2007.– Vol. 4.– P. 413–437.

266. Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher S.R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow // *Science*.– 2000.– Vol. 290(5497).– P. 1779–1180.
267. Miao Z., Jin J., Chen L. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells // *Cell Biol.Int.*– 2006.– Vol. 30.– P. 681–687.
268. Miki T., Mitamura K., Ross M.A., Stolz D.B., Strom S.C. Identification of stem cell marker–positive cells by immunofluorescence in term human amnion // *J.Reprod.Immunol.*– 2007.– Vol. 75.– P. 91–96.
269. Miki T., Strom S.C. Amnion–derived pluripotent/ multipotent stem cells // *Stem Cell Rev.*– 2006.– Vol. 2.– P. 133–142.
270. Mitchell C., Nivison M., Jackson L.F., Fox R., Lee D.C., Campbell J.S., Fausto N. Heparin–binding epidermal growth factor–like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration // *J Biol Chem.*– 2004.– Vol. 280.– P. 2562–2568.
271. Mitchell K.E., Weiss M.L., Mitchell B.M. et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia // *Stem Cells*.– 2003.– Vol. 21.– P. 50–60.
272. Mothe A.J., Tator C.H. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat // *Neuroscience*.– 2005.– Vol. 131(1).– P. 177–187.
273. Murry C.E., Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development // *Cell*.– 2008.– Vol. 132(4).– P. 661–680.
274. Nakano M., Satoh K., Fukumoto Y., Ito Y., Kagaya Y., Ishii N., Sugamura K., Shimokawa H. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice // *Circ Res.*– 2007, Mar 16.– Vol. 100, № 5.– P. 662–669.
275. Nandoe Tewarie R.D., Hurtado A., Levi A.D., Grotenhuis J.A., Oudega M. Bone marrow stromal cells for repair of the spinal cord: towards clinical application // *Cell Transplant.*– 2006.– Vol. 15(7).– P. 563–577.
276. Nelson T.J., Martinez–Fernandez A., Yamada S., Perez–Terzic C., Ikeda Y., Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells // *Circulation*.– 2009.– Vol. 120.– P. 408–416.
277. Nistor G.I., Totoiu M.O., Haque N., Carpenter M.K., Keirstead H.S. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation // *Glia*.– 2005.– Vol. 49(3).– P. 385–396.
278. Noguchi H. Stem cells for the treatment of diabetes // *Endocr J.*– 2007, Feb.– Vol. 54, № 1.– P. 7–16.
279. Nunes M.C., Roy N.S., Keyoung H.M., et al. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain // *Nat Med.*– 2003.– Vol. 9(4).– P. 439–447.
280. Nussbaum J., Minami E., Laflamme M.A., et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response // *FASEB J.*– 2007.– Vol. 21(7).– P. 1345–1357.

281. Nuttall M.E., Gimble J.M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications // *Curr Opin Pharmacol.*– 2004.– Vol. 4.– P. 290–294.

282. Obermair F.J., Schröter A., Thallmair M. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury // *Physiology (Bethesda)*– 2008, Oct.– Vol. 23.– P. 296–304.

283. Ogawa S., Miyagawa S. Potentials of regenerative medicine for liver disease // *Surg Today.*– 2009.– Vol. 39, № 12.– P. 1019–1025.

284. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germlinecompetent induced pluripotent stem cells // *Nature.*– 2007.– Vol. 448(7151).– P. 313–317.

285. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice // *Ann Acad Sci.*– 2001, Jun.– Vol. 938.– P. 221–229.

286. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // *Nature.*– 2001.– Vol. 410.– P. 701–705.

287. Otsu K., Das S., Houser S.D., Quadri S.K., Bhattacharya S., Bhattacharya J. Concentration dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells // *Blood.*– 2009.– Vol. 113.– P. 4197–4205.

288. Pan H.C., Yang D.Y., Chiu Y.T. et al. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell // *J. Clin. Neurosci.*– 2006.– Vol. 13.– P. 570–575.

289. Park I.H., Zhao R., West J.A., et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors // *Nature.*– 2008.– Vol. 451(7175).– P. 141–146.

290. Park Y.B., Kim Y.Y., Oh S.K., et al. Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture // *Exp Mol Med.*– 2008.– Vol. 40(1).– P. 98–108.

291. Parmacek M.S. Cardiac stem cells and progenitors: developmental biology and therapeutic challenges // *Trans Am Clin Climatol Assoc.*– 2006.– Vol. 117.– P. 239–255.

292. Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P. et al. Isolation and characterization of cells from human term placenta; outcome of the First International Workshop on Placenta-Derived Stem Cells // *Stem Cells.*– 2008.– Vol. 26.– P. 300–311.

293. Parr A.M., Kulbatski I., Tator C.H. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury // *J Neurotrauma.*– 2007.– Vol. 24(5).– P. 835–845.

294. Patel A.N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F.J., Allickson J.G. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation // *Cell Transpl.*– 2008.– Vol. 17.– P. 303–311.

295. Peddiaditakis P., Lopes-Talavera J.C., Petersen B., Monga S.P., Michalopoulos G.K. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat // *Hepatology.*– 2001.– Vol. 34(4 Pt1).– P. 688–693.

296. Peister A., Mellad J.A., Larson B.L. et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epi-

topes, rates of proliferation, and differentiation potential // *Blood*.– 2004.– Vol. 103.– P. 1662–1668.

297. Perin L., Sedrakyan S., Da Sacco S., De Filippo R. Characterization of human amniotic fluid, stem cells and their pluripotential capacity // *Methods Cell Biol.*– 2008.– Vol. 86.– P. 85–99.

298. Pfeifer K., Vroemen M., Blesch A., Weidner N. Adult neural progenitor cells provide a permissive guiding substrate for corticospinal axon growth following spinal cord injury // *Eur J Neurosci*.– 2004.– Vol. 20(7).– P. 1695–1704.

299. Pittenger M.F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow // *Methods Mol Biol.*– 2008.– Vol. 449.– P. 27–44.

300. Polak J.M., Bishop A.E. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future // *Ann N Y Acad Sci.*– 2006, Apr.– Vol. 1068.– P. 352–366.

301. Portmann–Lanz C.B., Schoeberlein A., Huber A. et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre– and perinatal neuroregeneration // *Am.J.Obstet. Gynecol.*– 2006.– Vol. 194.– P. 664–673.

302. Prather W.R., Toren A., Meiron M. Placental–derived and expanded mesenchymal stromal cells (PLX–I) to enhance the engraftment of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood // *Expert Opin, Biol. Ther.*– 2008.– Vol. 8.– P. 1241–1250.

303. Prusa A.R., Marton E., Rosner M. et al. Neurogenic cells in human amniotic fluid // *Am.J.Obstet. Gynecol.*– 2004.– Vol. 191.– P. 309–314.

304. Prusa A.R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstschläger M. Oct–4 expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? // *Hum. Reprod.*– 2003.– Vol. 18.– P. 1489–1493.

305. Raisman G., Li Y. Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells // *Nat Rev Neurosci*.– 2007.– Vol. 8(4).– P. 312–319.

306. Ramon–Cueto A. Olfactory ensheathing glia transplantation into the injured spinal cord // *Prog Brain Res.*– 2000.– Vol. 128.– P. 265–272.

307. Ratajczak M.Z., Kucia M., Ratajczak J., Zuba–Surma E.K. A multi–instrumental approach to identify and purify very small embryonic like stem cells (VSELs) from adult tissues // *Micron.*– 2009.– Vol. 40.– P. 386–393.

308. Ray S., Atkuri K.R., Deb–Basu D., et al. MYC can induce DNA breaks in vivo and in vitro independent of reactive oxygen species // *Cancer Res.*– 2006.– Vol. 66(13).– P. 6598–6605.

309. Reinecke H., Minami E., Zhu W.Z., Laflamme M.A. Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells // *Circ Res.*– 2008, Nov 7.– Vol. 103, № 10.– P. 1058–1071.

310. Reinisch A., Bartmann C., Rohde E. et al. Humanized system to propagate cord blood–derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application // *Regen.Med.*– 2008.– Vol. 2.– P. 371–382.

311. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro // *Nat. Biotechnol.*– 2000.– Vol. 18.– P. 399.

312. Rhodes K.E., Gekas C., Wang Y. et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation // *Cell Stem Cell.*– 2008.– Vol. 2.– P. 252–263.

313. Roche E., Enseñat-Waser R., Reig J.A., Jones J., León-Quinto T., Soria B. Therapeutic potential of stem cells in diabetes // *Handb Exp Pharmacol.*– 2006.– Vol. 174.– P. 147–167.
314. Rossant J. Stem cells and early lineage development // *Cell.*– 2008.– Vol. 132.– P. 527–531.
315. Roth E., Taylor H.B. Heterotopic cartilage in the uterus // *Obstet Gynecol.*– 1966 Jun.– Vol. 27(6).– P. 838–844.
316. Roubelakis M.G., Pappa K.I., Bitsika V., et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cells Dev.*– 2007.– Vol. 16.– P. 931–952.
317. Saito T., Kuang J.Q., Lin C.C., Chiu R.C. Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction // *J Thorac Cardiovasc Surg.*– 2003.– Vol. 126(1).– P. 114–123.
318. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro // *Exp Neurol.*– 2000.– Vol. 164(2).– P. 247–256.
319. Santa Maria L., Rojas C.V., Minguell J.J. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells // *Exp Cell Res.*– 2004.– Vol. 300.– P. 418–426.
320. Sartore S., Lenzi M., Angelini A. et al. Amniotic mesenchymal cells auto-transplanted in a porcine model of cardiac ischemia do not differentiate to cardiogenic phenotypes // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*– 2005.– Vol. 28.– P. 677–684.
321. Sarugaser R., Lickorish D., Baksh D., Hosseini M.M., Davies J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors // *Stem Cells.*– 2005.– Vol. 23.– P. 220–229.
322. Schlesinger N. Purine-rich foods and the risk of gout in men // *N Engl J Med.*– 2004, Jun 10.– Vol. 350, № 24.– P. 2520–2521.
323. Schmidt D., Achermann J., Odermarr B. et al. Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid-derived progenitor cells as single cell source // *Circulation.*– 2007.– Vol. 116.– S. 64–70.
324. Schmidt D., Mol A., Breyman C. et al. Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors // *Circulation.*– 2006.– Vol. 114.– S. 125–131.
325. Schwab K.E., Chan R.W.S., Gargett C.E. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle // *Fert. and Steril.*– 2005.– Vol. 84(2).– P. 1124–1130.
326. Sessarego N., Parodi A., Podesta M. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application // *Haematologica.*– 2008.– Vol. 93.– P. 339–346.
327. Setoguchi T., Nakashima K., Takizawa T., et al. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor // *Exp Neurol.*– 2004.– Vol. 189(1).– P. 33–44.
328. Shindo T., Matsumoto Y., Wang Q., Kawai N., Tamiya T., Nagao S. Differences in the neuronal stem cells survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe

experimental traumatic brain injury // *J Med Invest.*– 2006, Feb.– Vol. 53, № 1.– P. 242–251.

329. Shiras A., Chettiar S.T., Shepal V., Rajendran G., Prasad G.R., Shastry P. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma // *Stem Cells.*– 2007.– Vol. 25(6).– P. 1478–1489.

330. Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post–natal organs and tissues. // *J Cell Sci.*– 2006.– Vol. 119.– P. 2204–2213.

331. Smith R.R., Barile L., Cho H.C., et al. Regenerative potential of cardio–sphere–derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens // *Circulation.*– 2007.– Vol. 115.– P. 896–908.

332. Song W.J., Shah R., Hussain M.A. The use of animal models to study stem cell therapies for diabetes mellitus // *ILAR J.*– 2009.– Vol. 51, № 1.– P. 74–81.

333. Sordi V., Malosio M.L., Marchesi F. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets // *Blood.*– 2005.– Vol. 106.– P. 419–427.

334. Soupene E., Serikov V., Kuypers F.A. Characterization of an acyl–coenzyme A binding protein predominantly expressed in human primitive progenitor cells // *Lipid Res.*– 2008.– Vol. 49.– P. 1103–1112.

335. Spencer J.A., Hacker S.L., Davis E.C., Mecham R.P., Knutsen R.H., Li D.Y., Gerard R.D., Richardson J.A., Olson E.N., Yanagisawa H. Altered vascular remodeling in fibulin–5–deficient mice reveals a role of fibulin–5 in smooth muscle cell proliferation and migration // *Proc Natl Acad Sci USA.*– 2005, Feb 22.– Vol. 102(8).– P. 2946–2951.

336. Spyridopoulos I., Erben Y., Brummendorf T.H. et al. Telomere gap between granulocytes and lymphocytes is a determinant for hematopoietic progenitor cell impairment in patients with previous myocardial infarction // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*– 2008.– Vol. 28.– P. 968–974.

337. Spyridopoulos I., Hoffmann J., Aicher A. et al. Accelerated telomere shortening in leukocyte subpopulations of patients with coronary heart disease. Role of cytomegalovirus seropositivity // *Circulation.*– 2009.– Vol. 120.– P. 1364–1372.

338. Srivastava A.S., Malhotra R., Sharp J., Berggren T. Potentials of ES cell therapy in neurodegenerative diseases // *Curr Pharm Des.*– 2008.– Vol. 14, № 36.– P. 3873–3879.

339. Srivastava M.V. Restorative therapy in stroke using stem cells // *Neurol India.*– 2009, Jul–Aug.– Vol. 57, № 4.– P. 381–386.

340. Strakova Z., Livak M., Krezaiek M., Ihnatovych I. Multipotent properties of myofibroblasts cells derived from human placenta // *Cell Tissue Res.*– 2008.– Vol. 332.– P. 479–488.

341. Sugaya K. Possible use of autologous stem cell therapies for Alzheimer’s disease // *Curr Alzheimer Res.*– 2005.– Vol. 2(3).– P. 367–376.

342. Syková E., Jendelová P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS // *Cell Death Differ.*– 2007, Jul.– Vol. 14, № 7.– P. 1336–1342.

343. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.*– 2006.– Vol. 126(4).– P. 663–676.
344. Tamagawa T., Oi S., Ishiwata I., Ishikawa H., Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro // *Hum. Cell.*– 2007.– Vol. 20.– P. 77–84.
345. Tang X.L., Rokosh D.G., Guo Y., Bolli R. Cardiac progenitor cells and bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells for cardiac repair after myocardial infarction // *Circ J.*– 2010.– Vol. 74, № 3.– P. 390–404.
346. Taupin P. Autologous transplantation in the central nervous system // *Indian J Med Res.*– 2006, Dec.– Vol. 124, № 6.– P. 613–618.
347. Taupin P. Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system // *Ann Acad Med Singapore.*– 2006, Nov.– Vol. 35, № 11.– P. 814–820.
348. Teng Y.D., Liao W.L., Choi H., et al. Physical activity-mediated functional recovery after spinal cord injury: potential roles of neural stem cells // *Regen Med.*– 2006.– Vol. 1(6).– P. 763–776.
349. Terunuma A., Kapoor V., Yee C., Telford W.G., Udey M.C., Vogel J.C. Stem cell activity of human side population and $\alpha 6$ integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay // *Stem Cells.*– 2007.– Vol. 25.– P. 664–669.
350. Tian D.S., Dong Q., Pan D.J., et al. Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model // *Brain Res.*– 2007.– Vol. 1154.– P. 206–214.
351. Tsai M.S., Hwang S.M., Tsai Y.L., Cheng F.C., Lee J.L., Chang Y.J. Clonal amniotic fluid-derived cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells // *Biol. Reprod.*– 2006.– Vol. 74.– P. 545–551.
352. Tuch B.E. Stem cells—a clinical update // *Aust Fam Physician.*– 2006, Sep.– Vol. 35, № 9.– P. 719–721.
353. Uduwela A.S., Perera M.A., Aiqing L., Fraser I.S. Endometrial-myometrial interface: relationship to adenomyosis and changes in pregnancy // *Obstet Gynecol Surv.*– 2000, Jun.– Vol. 55(6).– P. 390–400.
354. Umezawa A., Makino H. Cell source for regenerative medicine // *Nippon Rinsho.*– 2008, May.– Vol. 66(5).– P. 865–872.
355. Vats A., Bielby R.C., Tolley N.S., Nerem R., Polak J.M. Review // *Stem cells. Lancet.*– 2005.– Vol. 366(9485).– P. 592–602.
356. Vija L., Farge D., Gautier J.F., Vexiau P., Dumitrache C., Bourgarit A., Verrecchia F., Larghero J. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes // *Diabetes Metab.*– 2009, Apr.– Vol. 35, № 2.– P. 85–93.
357. Walker P.A., Shah S.K., Harting M.T., Cox C.S. Jr. Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation // *Dis Model Mech.*– 2009, Jan–Feb.– Vol. 2, № 1–2.– P. 23–38.
358. Weiss M.L., Medicetty S., Bledsoe A.R. et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease // *Stem Cells.*– 2006.– Vol. 24.– P. 781–792.
359. Wen F., Tynan J.A., Cecena G. et al. Ets2 is required for trophoblast stem cell self-renewal // *Dev. Biol.*– 2007.– Vol. 312.– P. 284–299.

360. Wojakowski W., Tendera M., Kucia M. et al. Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction // *J Am Coll Cardiol.*– 2009.– Vol. 53.– P. 1–9.
361. Wolbank S., Peterbauer A., Fahrner M. et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane; a comparison" with human mesenchymal stem cells from adipose tissue // *Tissue Eng.*– 2007.– Vol. 13.– P. 1173–1183.
362. Wright L.S., Prowse K.R., Wallace K., Linskens M.H., Svendsen C.N. Human progenitor cells isolated from the developing cortex undergo decreased neurogenesis and eventual senescence following expansion in vitro // *Exp Cell Res.*– 2006.– Vol. 312(11).– P. 2107–2120.
363. Wu C.C., Chao Y.C., Chen C.N. et al. Synergism of biochemical and mechanical stimuli in the differentiation of human placenta-derived multipotent cells into endothelial cells // *J.Biomech.*– 2008.– Vol. 41.– P. 813–821.
364. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury // *Curr Opin Investig Drugs.*– 2010, Mar.– Vol. 11, № 3.– P. 298–308.
365. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell.*– 2007.– Vol. 1.– P. 39–49.
366. Ye M., Chen S., Wang X., et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor in bone marrow stromal cells of rat // *Neuroreport.*– 2005.– Vol. 16(6).– P. 581–584.
367. Yen B.L., Chien C.C., Chen Y.C. et al. Placenta-derived multipotent cells differentiate into neuronal and glial cells in vitro // *Tissue Eng. Pan A.*– 2008.– Vol. 14.– P. 9–17.
368. Yoder M.C., Mead L.E., Prater D., Krier T.R., Mroueh K.N., Li F., Krasich R., Temm C.J., Prchal J.T., Ingram D.A. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals // *Blood.*– 2007, Mar 1.– Vol. 109, № 5.– P. 1801–1809.
369. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science.*– 2007.– Vol. 318(5858).– P. 1917–1920.
370. Zhang H.J., Siu M.K.Y., Wong E.S.Y., Wong K.Y., Li A.S.M., Chan K.Y.K. Oct-4 is epigenetically regulated by methylation in normal placenta and gestational trophoblastic disease // *Placenta.*– 2008.– Vol. 29.– P. 549–554.
371. Zhao Y., Lin B., Dingeldein M., Guo C., Hwang D., Holterman M.J. New type of human blood stem cell: a double-edged sword for the treatment of type 1 diabetes // *Regen Med.*– 2006, Mar.– Vol. 1, № 2.– P. 255–266.
372. Zhou P., Wirthlin L., McGee J., Annett G., Nolte J. Contribution of human hematopoietic stem cells to liver repair // *Semin Immunopathol.*– 2009, Sep.– Vol. 31, № 3.– P. 411–419.
373. Zietlow R., Lane E.L., Dunnett S.B., Rosser A.E. Human stem cells for CNS repair // *Cell Tissue Res.*– 2008.– Vol. 331(1).– P. 301–322.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АА плазмы – антиокислительная активность плазмы
АКШ – аортокоронарное шунтирование
ГП липидов – гидроперекиси липидов
ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
ЗС – «золотое сечение»
ИБС – ишемическая болезнь сердца
КВЧ – крайне высокая частота
КЖ – качество жизни
ККМ – красный костный мозг
КМ – костный мозг
КТ – клеточные технологии
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП – липопротеиды очень низкой плотности
МН – mental health (психологическое здоровье)
МСК – мезенхимальные стволовые клетки
НК – «натуральные киллеры», лимфоидные клетки крови
ПДФ – продукты деградации фибрина
ПК – пуповинная кровь
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РАСК – регуляция агрегатного состояния крови
РН – physical health (физическое здоровье)
СК – стволовые клетки
СРО – свободно-радикальное окисление
ССКС – собственные стволовые клетки сердца
ТФ – тканевый фактор
ФВ – фракция выброса
ФК – фетальные клетки
ФНО – фактор некроза опухоли
ХГБ – хронический гепатит Б
ХГС – хронический гепатит С
ЭМИ – электромагнитное излучение
ЭМИ КВЧ – электромагнитное излучение крайне высокой частоты
ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
CD – cluster designation (обозначение кластера)
FGF – fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов)
HВ-EGF – heparin binding epidermal growth factor (гепарин связывающий эпидермальный фактор роста)
HGF – hepatocyte growth factor (фактор роста гепатоцитов)
iPS – индуцированные плюрипотентные клетки
t рекальциф. – время рекальцификации плазмы
t свёрт. крови – время свертывания крови
TGF α – transforming growth factor (преобразовывающий фактор роста альфа)

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ	10
1. Эмбриогенез	12
2. Классификация клеток	13
3. Эмбриональные клетки	14
4. Гемопозитические стволовые клетки	16
5. Мезенхимальные стволовые клетки	16
6. Эндометриальные стволовые клетки	26
7. Кластеры дифференцировки	37
8. Криоконсервация	39
9. Реконсервация	42
10. Фетальные клетки	43
10.1. Амниотическая жидкость	44
10.2. Вартонов студень	47
10.3. Амниотическая оболочка	50
10.4. Плацента	52
10.5. Пуповинная кровь	54
Резюме	57
ГЛАВА II. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОИНФОРМАТИКИ В МЕДИЦИНЕ	60
1. Математическое моделирование в медико-биологических исследованиях	60
1.1. Применение принципа «золотого сечения» в медико- биологических исследованиях	69
1.2. Правило «золотого сечения», как показатель равновесного состояния в условиях необратимого патологического процесса	73
ГЛАВА III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	77
1. Материалы и методы исследования	77
2. Обоснование проведенных экспериментальных исследований	79
3. Изучение активности процессов СРО и системы РАСК в условиях экспериментальной гипоплазии ККМ	82
4. Модулирование процессов в системах СРО и РАСК сочетанным воздействием электромагнитного излучения, стволовых клеток и фитомеланина	85

5. Изучение стволовых клеток, индуцированных в кардиогенном направлении	128
---	-----

ГЛАВА IV. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ПОМОЩИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО АППАРАТА 132

1. Изучение зависимостей между уровнями оксидантов и антиоксидантов при применении фитомеланина, ЭМИ КВЧ и стволовых клеток, действующих как модулирующие факторы	132
2. Изучение зависимостей между уровнями коагулянтов и антикоагулянтов при применении стволовых клеток, фитомеланина и ЭМИ КВЧ, действующих как модулирующие факторы	140
3. Изучение зависимостей между показателями уровня СРО и системы РАСК при применении стволовых клеток, фитомеланина и ЭМИ КВЧ, действующих как модулирующие факторы	167
4. Математическое моделирование процессов СРО и РАСК на основании данных корреляционного анализа между базовыми лабораторными показателями, отражающими активность этих систем. Построение систем дифференциальных уравнений	180
5. Изучение распространения законов «золотого сечения» и «золотого вурфа» на патогенетические взаимосвязи между показателями СРО и системы РАСК, полученными в экспериментах	191
Резюме	197

ГЛАВА V. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КАРДИОЛОГИИ 200

1. Клинические результаты	200
2. Направления клеточной терапии в кардиологии	202
2.1. Собственные стволовые клетки сердца	203
2.2. Генетически обработанные прогениторные клетки	204
2.3. Аллогенные костномозговые клетки	205
2.4. Популяция VSELs клеток	206
2.5. Преднаправленные мезенхимальные кардиопоэтические клетки	207
2.6. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки ..	208

ГЛАВА VI. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ГЕПАТОЛОГИИ	210
1. Клеточные технологии при вирусном поражении печени ...	210
2. Клеточные технологии при невирусном поражении печени	213
ГЛАВА VII. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В НЕВРОЛОГИИ	219
1. Механизмы воздействия на повреждённую нервную ткань	221
1.1. Замещение погибших клеток в повреждённом спинном мозге	221
1.2. Стратегия нейропротекции в лечении повреждений спинного мозга	223
1.3. Ускорение регенерации аксонов	224
Резюме	228
ГЛАВА VIII. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ КОЖИ	229
Резюме	233
ГЛАВА IX. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ	234
1. Клеточные технологии при метаболических нарушениях	234
2. Гиперлипидемия и применение клеточных технологий	241
3. Клеточные технологии в спорте	244
4. Клеточные технологии и качество жизни	247
Заключение	255
Основная используемая литература	259

*Хадарцев А.А., Субботина Т.И.,
Иванов Д.В., Гонтарев С.Н.*

**МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ КЛЕТОЧНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ**

Монография

*Под редакцией
А.А. Хадарцева*