

ВЫВОДЫ: Поверхностная ЭМГ жевательных и височных мышц позволяет выявить функциональные нарушения жевательного аппарата и более объективно оценить результаты комплексной терапии. Миостимуляция способствует лучшей оптимизации окклюзионных контактов при лечении дефектов зубных рядов.

Наличие дефектов зубных рядов пациентов постепенно приводит к изменению окклюзии и последующему нарушению жевательной функции. Однако и после восстановления окклюзии протезированием некоторые пациенты продолжают испытывать дискомфорт в челюстно-лицевой области, который присутствовать годами. На сегодняшний день остается высоким число больных, не удовлетворенных функциональными результатами ортопедической реабилитации несмотря на современные высококачественные материалы и технологии изготовления зубных протезов. В ряду причин функциональных осложнений протезирования называют неудовлетворительное обследование зубочелюстной системы, недостаточный учет состояния височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС) и тонуса жевательных мышц, неправильное определение центрального соотношения челюстей, а также отсутствие стабильной окклюзии после лечения. Ортопедическое устранение дефектов зубных рядов без позиционирования головки нижней челюсти нередко приводит к развитию или усугублению дисфункции ВНЧС.

Развитие методов определения положения нижней челюсти, соответствующего расслабленному состоянию мускулатуры лица и шейно-плечевого отдела, привело к формированию принципов так называемой «нейромышечной стоматологии» (Ронкин К., 2007). Согласно этим принципам, оптимальное положение нижней челюсти в сагиттальной плоскости в сочетании с изотонической траекторией движения нижней челюсти при закрывании

рта, симметричный баланс мышц и идеальная микроокклюзия создают гармонию в работе височно-нижнечелюстных суставов и обеспечивают оптимальную работу зубочелюстной системы.

Одним из важных элементов в нормализации нейромышечной окклюзии является измерение с помощью поверхностной ЭМГ активности жевательных мышц в покое и при функциональной нагрузке, как пример, при сжатии зубов. Поверхностная ЭМГ предложена для диагностики и оценки результатов лечения заболеваний ВНЧС, а также в качестве обратной биологической связи при коррекции парафункций. Она позволяет выявить мышечный спазм, аномальную окклюзию, функциональную гиперреактивность, мышечную утомляемость и мышечный дисбаланс. Вместе с тем некоторые специалисты считают данный метод пригодным только для научных исследований, но не для клинической практики.

Известные на сегодняшний день клинические исследования по применению высоко- и низкочастотной чрескожной электрической стимуляции нервов (ЧЭСН) показывают неоднозначные результаты. В недавнем систематическом обзоре говорится о том, что имеющейся информации недостаточно для вынесения окончательного вывода о роли ЧЭСН в лечении хронических болей. Для лечения дисфункции ВНЧС применяют разные виды и режимы электростимуляции, однако единого мнения об эффективности и месте этого вида лечения еще не выработано.

В связи с этим, целью данного исследования было использование поверхностной ЭМГ для диагностики дисфункций жевательного аппарата, а также оценка эффективности миостимуляции для нейромышечной оптимизации окклюзионных контактов в процессе ортопедического лечения дефектов зубных рядов.

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ: ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЗАГОТОВКИ

Абдрахманова Саня Алишевна

Кандидат медицинских наук,

Директор РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»

Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан

Оспанова Мадина Ералыевна

Заведующая отделением криобиологии

РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»

Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан

Ахаева Мария Адиллаевна

Магистр естественных наук, специалист отделения криобиологии

РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»

Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан

Савчук Татьяна Николаевна

Руководитель Республиканской референс лаборатории службы крови

РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»

Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан

Жангазиева Куралай Хайдаровна

Магистр общественного здравоохранения

Заведующая отделом менеджмента научных исследований

РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии»

Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан

АННОТАЦИЯ

В статье представлены предварительные результаты исследования прогностических критериев заготовки мезенхимальных стволовых клеток.

Установлено, что клетки с высокими показателями экспрессии поверхностных маркеров показывают лучшие возможности для культивирования с целью получения необходимого количества материала, содержащего мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки.

Клеточный состав, морфологическая и иммунофенотипическая характеристика пуповинной крови взаимосвязаны со многими факторами, включая течение беременности, физические параметры новорожденных, способы получения и процессинга пуповинной крови.

ANNOTATION

In article preliminary results of a research predictive criterion of preparation of mesenchymal stem cells are provided.

It is established that cells with high rates of an expression of surface markers show the best opportunities for cultivation for the purpose of obtaining necessary amount of the material containing multipotently mesenchymal stem cells.

The cellular composition, morphological and immunophenotypic characteristic of umbilical blood are interconnected with many factors, including the course of pregnancy, physical parameters of newborns, ways of receiving and processing of umbilical blood.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, пуповинная кровь, трансплантация.

Keywords: mesenchymal stem cells, umbilical cord blood, transplantation

Актуальность. На сегодняшний день в трансплантологии широко используются методы клеточной терапии при различных повреждениях органов и тканей. Здесь особую роль играют стволовые клетки, которые имеют регенеративные свойства.

Стволовые клетки - это клетки, самоподдерживающиеся в течение всей жизни организма и способные к дальнейшей дифференцировке в клетки разных типов [1, с.14].

При заготовке стволовых клеток пуповинной крови основными показателями, отражающими качество образца, и прогнозирующими эффективность его применения для трансплантации являются чистый вес образца и концентрация моноклеарных клеток. [2-6]

Мезенхимальные стволовые клетки (далее - МСК) – мультипотентные клетки, которые обладают высокой пролиферативной активностью и способностью дифференцироваться в клетки мезенхимного ряда (остеоциты, хондроциты). Широкий спектр биологически активного действия МСК сделал их востребованным источником для клеточной терапии различных заболеваний [5, с.422].

Метод трансплантации МСК, как аутологичных, так и аллогенных, в последние годы используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников и для профилактики и терапии реакции трансплантат-против-хозяина (РТПХ) [9-10].

Помимо этого, было показано, что МСК продуцируют цитокины и ростовые факторы, необходимые для пролиферации и дифференцировки кроветворных предшественников [8 с.64, 9 с.41]. Показана клиническая эффективность применения культивированных ex vivo МСК при аутологичной и аллогенной трансплантации кроветворных предшественников для сокращения сроков приживления [8 с.64,12 с.].

Источниками МСК могут быть различные ткани. Но большое внимание исследователей привлекают МСК, которые будут получены из тканей

человека неинвазивным путем, например, из пуповинной крови.

Отсутствие этических проблем при получении МСК из пуповинной крови, а также значительный пролиферативный и дифференцировочный потенциал, высокая иммуномодулирующая активность позволяет им, перспективным объектом для проведения исследований [6, С.163-164].

Пуповинная кровь (далее - ПК) – один из самых перспективных источников мезенхимальных стволовых клеток для клинического применения в медицине.

В настоящее время в мире накоплен достаточный опыт сбора ПК, выделения из неё СК и хранения. Различают три направления применения МСК:

- 1) поддержка кроветворения при котрансплантации с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК);
- 2) замещение и восстановление функций поврежденных тканей (кости, хряща, скелетных мышц, сердечной мышцы, нервной ткани и др.);
- 3) подавление иммунных конфликтов при аллогенной неродственной трансплантации и тяжелых аутоиммунных процессах [3, с.4].

Цель исследования - изучение прогностических критериев получения мезенхимальных стволовых клеток пуповинной крови.

Материалы и методы. Материалом исследования была пуповинная кровь. Процедура получения пуповинной крови производилась с соблюдением принципов медицинской биоэтики. Для сбора пуповинной крови, исследователями было получено добровольное информированное согласие роженицы на донацию и заполнены анкетные данные. Работа выполнялась в рамках НТП МЗ РК (2017-2019 гг.). Использованные методы: клиничко-лабораторные, иммуногематологические. Методологическую основу составили труды отечественных и зарубежных ученых по вопросам изучения морфофункциональных и биорегуляторных свойств мезенхимальных стволовых клеток, полученных из

пуповинной крови, о наиболее оптимальных методах получения ПК и МСК.

Забор осуществлялся в ходе естественных родов. Применялся метод получения ПК *in utero*: кровь собирали после рождения ребенка.

В практике применяются два метода получения ПК. Но наиболее оптимальным считается метод *in utero*, так как метод *ex utero* требует незамедлительного выполнения с момента рождения плаценты с привлечением дополнительного высококвалифицированного персонала. Во-вторых, во избежание контаминации все манипуляции с плацентой необходимо выполнять в отдельном стерильном помещении (бокс). Кроме всего, существует риск микробной контаминации вагинальной флорой матери.

В исследовании применялся метод сбора ПК в стерильные закрытые донорские системы одноразового применения. Для этого использовали двоянные контейнеры для заготовки крови (49 ml CPDA-1, «Ravimed», Polna) с объемом 350 мл, содержащим 49 мл антикоагулянта цитрат-фосфат-декстроза-аденин-1. После окончания сбора ПК гемакон с ПК доставлялся в НПЦТ при температуре $+22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течении 24 часов. В дальнейшем производилось выделение концентрата клеток с максимальным выходом мононуклеаров.

В исследовании применили 2 метода выделения мезенхимальных стволовых клеток из пуповинной крови: ручной (9 образцов) и автоматизированный (21 образец).

Наиболее оптимальным считается автоматизированный метод: исключает человеческий фактор, каждый образец пуповинной крови обрабатывается по отдельности, обработка в закрытой среде обеспечивает безопасность и стерильность, эффективность данного метода составляет 90%, стволовые клетки, выделенные с помощью автоматической системы, гораздо лучше переносят условия длительного криохранения.

В каждом образце ПК определено количество ядросодержащих клеток, CD34-позитивных клеток, проведено HLA-типирование, определены группа крови по ABO и ее резус-принадлежность, а также проведены иммунологические и молекулярные исследования TNF α , IL1 β , IFN γ , TGF β , IL-10, IL-4, IL-6, IL-8, PDGF, CTGF.

Имунофенотипирование проводилось по следующим мембранным белкам (CD4+, CD3+, CD8+, CD16+, CD38+, CD34+, CD117+, CD90+). Полученные результаты анализировались на проточном цитофлуориметре BD FACSAria (BD Biosciences, США) с помощью программы BD FACSDiva.

Метод культивирования МСК заключался в инкубировании адгезионной культуры клеток в MEM средах с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (далее - ЭТС). Культивирование проводилось в условиях гипоксии, которое позволило обеспечить хорошее качество культур МСК.

С целью хондрогенной дифференцировки МСК (для использования получаемых клеток с целью восстановления хрящевой ткани) в культураль-

ную среду добавляли основной фактор роста фибробластов (bFGF) и TGF β 3 [57] или костный морфогенетический белок-2 (BMP-2).

Результаты и обсуждение.

Прогностические критерии свойств мезенхимальных стволовых клеток пуповинной крови зависят от числа родов в анамнезе, возраста рожениц и от пола новорожденного. По данным литературы критичными для получения МСК из ПК являются время сбора ПК - не позднее 15 часов после родов и исходное количество ПК - не менее 30 мл [1 с.16-17].

Заготовку пуповинной крови производили при физиологических родах доношенных новорожденных (38–40 недель гестации) с учетом отсутствия стандартных противопоказаний к донорству и после получения информированного согласия у беременной женщины.

Из 30 новорожденных 11 родились в результате первых родов, 13 - вторых, 6 - третьих. Вес новорожденных варьировался от 3130 грамм до 4350 грамм.

В нашем исследовании время между сбором пуповинной крови и получением МСК в среднем составляло 20 часов 40 мин (от 8,45 до 24,0 часов).

Исследованием установлено, что объем ПК у повторнородящих был больше и составил 122,0 мл, чем у первородящих женщин, который составил - 114,8 мл. Также установлено, что средний объем ПК среди новорожденных женского пола выше (120,3мл.), чем у новорожденных мужского пола (115,8 мл.).

Экспрессия маркеров клеток пуповинной крови подтверждает наличие положительных маркеров МСК - мезенхимальных стромальных антигенов CD105+, CD73+ и CD90+. Не экспрессируются маркеры CD34-, CD45-, что является главным отличием МСК от ГСК.

Согласно данным Международного общества по клеточной терапии, МСК обладают следующим иммунофенотипом: CD 90+, CD105+, CD44+, CD73+, CD34-, CD45-. При этом исследователи указывают, что даже для общепринятых маркеров идентификации МСК показана вариабельность экспрессии [4 с. 11-12].

При изучении работ Drenka Trivanovic и других, из Сербии были выявлены следующие результаты: у 40% периферической крови или пуповинной крови были положительными для CD34. Уровень позитивности для типичных мезенхимальных маркерных белков, как в периферической, так и в пуповинной крови был низким, поскольку оба типа МСК были отрицательными для CD90, тогда как только 6% периферической и 10% пуповинной крови экспрессировали CD105. Это подтверждает и демонстрирует сообщения разных исследователей, об изменчивости между МСК, полученных из различных источников [7 с. 178,182,184].

Уровень содержания цитокинов в образцах пуповинной крови свидетельствует о высокой активности данной клеточной среды, что также надлежит оценить в сравнении с другими субстратами.

При оценке пуповинной крови чистый объем образца и ЯСК до процессинга: у первородящих составил ПК от 65 мл до 143 мл, ЯСК в пределах $8,6-18,9 \cdot 10^9$ в дозе, при вторых от 63 мл до 116 мл и ЯСК – $0,48-48,150 \cdot 10^9$ в дозе и третьих родах – от 56 мл до 98,5 мл, ЯСК – $5,55-13,6 \cdot 10^9$ в дозе.

После процессинга у первородящих CD34 в пределах $1,29-5,95 \cdot 10^6$ в дозе; при вторых и третьих – $0,48-4,97 \cdot 10^6$ в дозе.

С помощью проточной цитофлуориметрии поверхностные маркеры CD73+, CD90+, CD45+, CD34+, CD105+, CD16+, CD117+ изучены сразу после выделения и после культивирования.

Экспрессия маркеров CD73+, CD90+, CD105+, изначально была высокой – от 85,7% до 99,4% и практически не изменялась в процессе культивирования.

Экспрессия CD34+ менялась в процессе культивирования от первоначальных значений до 7,0%. Маркер CD45+ оставался в пределах первоначальных показателей.

Что касается маркеров CD16+, CD117+ – их значения изначально находились в пределах 1,7-2,6 и 4,4-8,4 и в ходе процессов культивирования претерпели изменения в сторону уменьшения экспрессии (порядка 20%).

По результатам исследования в культурах клеток ПК экспрессировались CD 90, CD73, CD 105 и не экспрессировались CD 34 и CD45.

Данные показатели подтверждаются результатами исследователей (Сабурина И.Н. 2009, Баранов Е.В.2013) [4 с.81-82].

К прогностическим критериям при выделении мезенхимальных стволовых клеток пуповинной крови можно отнести чистый вес образца и концентрацию мононуклеарных клеток. На данные показатели влияет ряд факторов: число родов в анамнезе, срок гестации, продолжительность родов, метод родоразрешения, вес плода, способ получения крови, время от рождения ребёнка до пережатия пуповины, время обработки образца. К дополнительным прогностическим критериям можно отнести вес плаценты и длину пуповины.

Однако из-за гетерогенности популяций стволовых клеток, а также в зависимости от источников их происхождения и разных методов изоляции, используемые в лабораториях, характеристики, определяющие МСК, противоречивы. Несоответствие, наблюдаемое при выражении мезенхимальных маркеров, может быть связано с различными причинами. Наиболее важным из них является отсутствие уникальных маркеров МСК, которые наряду с недавними сообщениями, демонстрирующими, что молекулы CD105, CD90 и CD44 также экспрессируются на фибробластах кожи человека или легких [12 с.305-307], указывает, что еще другие дополнительные маркеры должны использоваться для определения MSC. Фенотипические признаки МСК могут быть опосредованы как различными источниками ткани, используемыми методами экстракции, также условиями культивирования *in vitro*, которые могут вызвать потерю белков клеточной поверхности [11].

Выводы

При исследовании определены прогностические критерии качества заготовки мезенхимальных стволовых клеток. Установлено, что клетки с высокими показателями экспрессии поверхностных маркеров показывают лучшие возможности для культивирования с целью получения необходимого количества материала, содержащего мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки.

Клеточный состав, морфологическая и иммунофенотипическая характеристика пуповинной крови взаимосвязаны со многими факторами, включая течение беременности, физические параметры новорожденных, способы получения и процессинга пуповинной крови.

Пуповинная кровь экспрессирует целый ряд маркеров, содержание которых дифференцированно меняется в результате культивирования. Представляет интерес сравнительный анализ содержания этих маркеров в пуповинной крови и мобилизированной крови здоровых доноров гемопоэтических стволовых клеток.

Уровень содержания цитокинов в образцах пуповинной крови свидетельствует о высокой активности данной клеточной среды, что также надлежит оценить в сравнении с другими субстратами.

В ходе дальнейшего исследования будет продолжена работа по детальной оценке иммунофенотипической характеристики клеток-предшественников в образцах ПК в разных сроках культивации и более уточненные результаты будут представлены в следующих публикациях.

Считается, что пуповинная кровь содержит клетки ранних предшественников в большей концентрации, чем костный мозг. В ходе дальнейшего исследования будет продолжена работа по детальной оценке иммунофенотипической характеристики клеток-предшественников в образцах ПК.

По литературным данным предполагается [4, 5, 6], что пуповинная кровь содержит клетки ранних предшественников в большей концентрации, чем костный мозг.

В ходе дальнейшего исследования будет продолжена работа по детальной оценке иммунофенотипической характеристики клеток-предшественников в образцах ПК в разных сроках культивации.

Литература

1. Айзенштадт А.А., Енукашвили Н.И., Золина Т.Л., Александрова Л.В., Смолянинов А.Б. Сравнение пролиферативной активности и фенотипа МСК, полученных из костного мозга, жировой ткани и пупочного канатика. – Вестник Северо-Западного государственного университета им. И.И. Мечникова. – 2015.- Т. 7. - №2. – С.14-22.
2. Арутюнян И.В. Макаров А.В. Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки пупочного канатика: биологические свойства и клиническое применение. – Гены и клетки. – 2015. – Т. X. - №2. – С.30-38.

3. Владимирская Е.Б. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в клеточной терапии. – Онкогематология. – 2007. - №1. – С.4-16.
4. Сабурина 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. БГ Вестник новых медицинских технологий. – 2009 – Т. XVI, № 4 – С.11-17.
5. Сарсенова М.А., Укбаева Т.Д. Мезенхимальные стволовые клетки: культивирование и применение в регенеративной медицине. – Вестник КазНУ. – 2013. - №3/2 (59). – С.422-424.
6. Табанакова А.В. Разработка прогностических критериев качества заготовки стволовых клеток пуповинной крови. - Современные наукоемкие технологии. – 2009. –№ 11 (приложение) - С. 163-171.
7. Drenka Trivanović, Jelena Kocić, Slavko Mojsilović, Aleksandra Krstić, Vesna Ilić et al. Mesenchymal Stem Cells isolated from Peripheral Blood and Umbilical Whartons Jelly. Мезенхимальные стволовые клетки выделены из периферической крови и пуповины Wharton's Jelly. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 2013; 141; (3-4): 178-186. <https://doi.org/10.2298/SARH1304178T>.
8. Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L. et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16:557—64.
9. Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363:1439—41.
10. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371(9624):1579—86.
11. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006; 24:1294-301.
12. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:307 -16.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ И КОГНИТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ.

*Коцюбинская Ю.В.,
Казakov А.В.,
Гатауллин М.Р.*

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева» МЗ РФ,
Санкт-Петербург*

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2019.4.63.209

CHARACTERISTICS OF THE EMOTIONAL STATE AND COGNITIVE PROCESSES IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE IN THE ACUTE PERIOD.

Kotsyubinskaya Yu.V., Kazakov A.V., Gataullin M.R.

*FSBI "National Medical Research Center psychiatry and neuroscience them. V.M. Bekhtereva
"Ministry of Health of the Russian Federation,
St. Petersburg*

АННОТАЦИЯ

В настоящее время исследования, направленные на оценку эмоционального состояния и когнитивных процессов, связанных с обработкой эмоционально обусловленной информации у больных с ишемическим инсультом, а также поиск взаимосвязи между ними являются особенно актуальными, главным образом для последующей оптимизации лечебного процесса. С целью выявления особенностей эмоционального состояния и когнитивных процессов обследовалась группа больных с ишемическим инсультом в остром периоде в количестве 25 человек. Установлено, что у больных с очагом поражения в передних отделах коры депрессивные состояния в остром периоде инсульта выражены сильнее. Больные успешнее воспроизводят эмоционально значимые слова по сравнению с нейтральными словами, обнаружена взаимосвязь уровня тревожности и депрессии, что свидетельствует о коморбидности этих состояний. Но, в свою очередь, связь выраженности тревоги и депрессии с когнитивными процессами узнавания и воспроизведения, а также различия в мнестической и гностической деятельности у больных с различным уровнем тревожности и депрессии выявлены не были.