

4. Ризик народження дитини з ПВР при анемії у матері складає 0,97 при довірчому інтервалі (0,33; 2,53). Ризик народження дитини із ПВР при гестозі першої половини вагітності становить 1,1 при довірчому інтервалі (0,44; 2,54). Ризик народження дитини із ПВР при гестозі другої половини вагітності становить 1,0 при довірчому інтервалі (0,55; 2,62).

Впровадження моніторингу ПВР дозволяє визначити рівень поширеності природженої патології серед новонароджених. Отримані дані свідчать про необхідність подальшого моніторингу природжених вад розвитку серед новонароджених та дитячого населення з метою оцінки та попередження факторів ризику виникнення ПВР.

Література

1. Чебан В.І. Вроджені вади розвитку як показник порушень популяційного репродуктивного розвитку // Буковинський медичний вісник. – 2003. – Т. 7, №2. – С.200–203.
2. Поширеність генетичної патології серед живонароджених в Україні / О.І. Тимченко, В.В.Єлагін, В.О. Галаган та ін. // ПАГ. – 2001. – №5. – С. 5–8.
3. Тимченко О.І., Єлагіна В.В. та інші Генетична обумовленість здоров'я // Матеріали 4 конгресу неонатологів України “ Актуальні проблеми неонатології” - Київ – 2006.- с.158-160.
4. [http://www. ibis – birthdefects.org/start/uabdp.htm](http://www.ibis-birthdefects.org/start/uabdp.htm)
5. Наследственные и врожденные болезни: вклад в детскую заболеваемость и инвалидность, подходы к профилактике / Л.П. Андреева, Н.П.Кулешов, Г.Р. Мутовин, и др.// Педиатрия, журнал имени Г.Н.Сперанского.- 2007.- № 3.- С. 8-14.

Резюме

Проведен анализ пренатальных факторов риска у женщин, родивших детей с врожденными пороками развития в г. Львове и Львовской области за 2002-2007 гг. Выявлено статистически значимую разницу ($P < 0,05$) по мертворождениях (3,4%) у матерей исследуемой группы сравнительно с женщинами контрольной группы (0,27%).

Проведено аналіз пренатальних факторів ризику у жінок, які народили дітей із природженими вадами розвитку у м.Львові та Львівській області за 2002-2007 рр. Виявлено статистично вірогідну різницю ($P < 0,05$) по мертвонародженнях (3,4%) у матерів досліджуваної групи порівняно із жінками контрольної групи (0,27%).

The analysis of prenatal risks factors among womens, which gave birth to newborns with congenital malformations in Lviv and Lviv district during 2002-2007 was carried out.

The statistically significant increase ($P < 0,05$) in stillborns (3,4%) among mothers of examined group comparatively to control group (0,27%) was revealed.

**ГУЛЬКО Т.П.¹, ТОПОРОВА Е.К.¹, СУХОРАДА Е.М.¹, РУБАН Т.А.¹,
АЛЕКСЕЕВА Т.А.², ПРОДОВ Д.М.¹, КОРДЮМ В.А.¹**

*1 - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Заболотного, 150, г. Киев.*

*2 - Институт Металлофизики им. В.Г. Курдюмова НАН Украины,
бул. Вернадского, 16, Киев.*

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ КАК МАТРИКСОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ В СИСТЕМАХ IN VITRO И IN VIVO

Благодаря развитию новой области клинической медицины - тканевой инженерии - технологии scaffold приобретают все большую актуальность и широкое применение в регенеративной медицине. При этом часто используются комбинации живых клеток и поддерживающей структуры, которая и называется scaffold. Сам

процесс тканевой инженерии заключается в том, что ткани могут быть взяты у человека, размножены, высеяны на матрикс из определенного биоматериала с целью формирования тканевой конструкции, которая затем может быть пересажена этому же человеку в качестве замещающей ткани или пораженного органа. Основные принципы данного подхода заключаются в разработке и применении при имплантации в поврежденный орган или ткань носителей из биodeградирующих материалов. Однако существует проблема биологической совместимости материалов, используемых сегодня в качестве матриксов. Происходит отторжение многих искусственных материалов, несмотря на постоянное применение химических иммунодепрессантов. Необходим поиск новых инертных и биосовместимых материалов. Особый интерес представляют углеродные материалы, которые достаточно совместимы с живым организмом [1]. Их получают термической обработкой химических или природных органических волокон (чаще всего используются вискозные), при которой в веществе остаются в основном атомы углерода (99%). Углеродные материалы уже сейчас интенсивно используются в адсорбционной терапии — гемосорбции (очистка крови, лимфы от токсических веществ), энтеросорбции (лечение желудочно-кишечных заболеваний, аллергии, диабета), а также аппликационной сорбции (использование волокнистых тканей из углеродных адсорбентов в качестве аппликационного и перевязочного материала при лечении ран, ожогов и трофических язв). Адсорбционные свойства углеродных материалов позволяют расширить возможности использования их в клинической практике для регенерации поврежденной ткани или органа, в частности в качестве матриксов для выполнения задач тканевой инженерии [2].

В данной работе показаны возможности применения углеродных материалов различной структуры для scaffold технологий при имплантации в биологические объекты. Изучено поведение иммобилизованных клеток на нерастворимых углеродных материалах различной структуры (волокнистая ткань, шарики, нити, электропроводящей саже в виде нанотрубок) в системах *in vitro*, исследована судьба имплантационных биоматериалов в организме модельных животных.

Материалы и методы

В экспериментах использованы стабильные рекомбинантные клеточные линии, экспрессирующие маркерный зеленый флуоресцентный белок медузы (СНО-K1egfp) и инсулин человека (СНО-K1hins) (3,4). Культивирование клеток проводили в среде DMEM (Sigma, США). Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ (фирма Sigma, США). В качестве матриксов для иммобилизации клеток использовали активированные углеродные материалы различной структуры: сферический углеродный сорбент марки СКН, углеродное волокно, полученное методом карбонизации ацетатного волокна и многостенные углеродные нанотрубки (сажа) производства ООО ТМСпецмаш, Киев, Украина. Характеристики материалов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Физические характеристики углеродных материалов

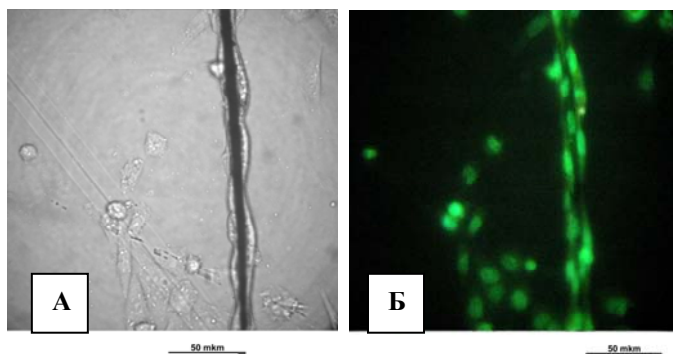
Матрикс	Насыпная плотность г/мл	Сорбционная емкость по CH_3I г/г	Объем сорбционных пор $\text{см}^3/\text{г}$	Удельная поверхность $\text{м}^2/\text{г}$	Удельное сопротивление Ом.см
Углеродное волокно	0,3	2,96	0,6-1,5	480-800	04.июн
Углеродный сорбент СКН	0,48-0,5	1,23	0,56	550	-
Углеродные нанотрубки	0,015-0,04	-	-	200-400	0,5-0,1

После культивирования матрицы с клетками или без них трансплантировались под брюшину или вшивались в разрез открытой раны модельным животным.

Эксперименты *in vivo* проводили на самцах мышей линии C57BL/6j массой 18 – 20 г. (6). Все манипуляции с животными проводили с использованием седативных и анестезирующих препаратов в соответствии с ветеринарным законодательством. На один показатель в эксперименте использовали образцы от трех животных. Функциональную активность инсулинпродуцирующих клеток в составе биоинженерных конструкций *in vivo* исследовали на мышинной модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. По окончании экспериментов проводился гистологический и цитологический анализ имплантов.

Результаты и обсуждение

Использованные нами углеродные материалы сходные по природе, но имеющие различные физические характеристики, по-разному вели себя по отношению к клеткам линии CHO-K1 и эмбриональным фибробластам мыши в системах *in vitro* и *in vivo*. При изучении адгезионной активности клеток в отношении к представленным углеродным материалам наблюдалась разная степень иммобилизации клеток из-за отличий между типами материалов по сорбционной активности, что, по-видимому, связано с различной степенью пористости поверхностей исследуемых материалов [3]. Самый высокий потенциал к клеточной адгезии в системах *in vitro* наблюдался у волокнистой углеродной ткани, для которой такие параметры, как объем сорбционного



пространства пор (0,6–1,5 см³/г) и удельная поверхность пор (450–800 м²/г) значительно выше чем у других типов исследуемых материалов [3]. Волокнистая ткань оказалась самой оптимальной структурой для иммобилизации клеток и длительного удержания их на своей поверхности. Углеродные материалы с другими физическими характеристиками в дальнейших

исследованиях практически не использовались из-за низких количественных показателей иммобилизации клеток на их поверхности и трудностей пространственной инвазии клеток. Культивированные эпителиеподобные (CHO-K1, CHO-K1egfp, CHO-K1ins) клетки, а также культивируемые эмбриональные фибробласты мыши достаточно быстро адгезируются к углеродному волокну и активно пролиферируют (рис. 1, 2).

Рис.1. Иммобилизация клеток CHO-K1egfp на углеродных волокнах (1 сутки)

А – микрофотография клеток в проходящем свете

Б - флуоресценция белка EGFP

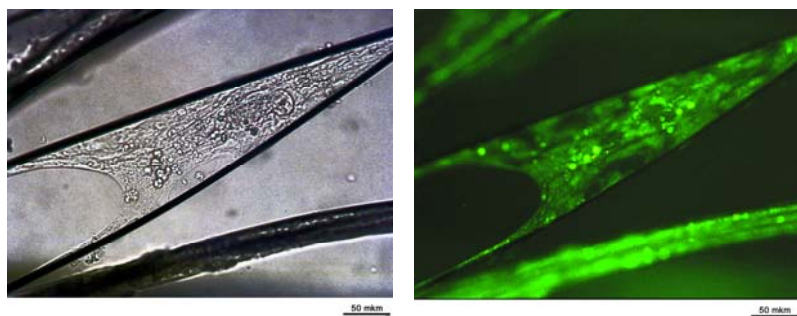


Рис.2. Пролиферация культивируемых эмбриональных фибробластов мыши, экспрессирующих флуоресцирующий белок EGFP, на углеродных волокнах (14 суток).

А – микрофотография клеток

в проходящем свете

Б - флуоресценция белка EGFP

В экспериментах с культивируемыми клетками и при имплантации углеродных волокон с иммобилизованными клетками изучали токсичность, изменение структуры материала в зависимости от окружающей среды и биосовместимость импланта с тканями организма. В процессе трансплантации под брюшину или ушивания в разрез раны кусочков углеродных волокон без клеток (или с клетками СНО-К1 или мышинными фибробластами, генетически маркированными EGFP) были выявлены особенные свойства исследуемых материалов, дающие большое преимущество этому материалу. Углеродные волокна оказались очень удобным в обращении матриксом, поскольку во время операции можно было легко и свободно манипулировать размерами, объемом импланта и его формой, что не наблюдалось при использовании углеродных материалов другой структуры. Из-за легкости и эластичности волокнистого углеродного материала имплант с клетками или без них можно легко разместить или распределить под брюшиной либо по длине разреза открытой раны, а его форма быстро адаптируется к окружающим структурам (мышцам, органам). Помещенные под брюшину углеродные волокна в большинстве случаев хорошо самофиксировались, поэтому дополнительного подшивания не требовалось. Исключительно важным достоинством углеродных волокон является их высокая инертность и гибкость, этот материал не токсичен и, как показал гистологический анализ имплантированных биоматриков и прилегающих тканей, не вызывает воспалительной реакции организма, т.е. в высокой степени биосовместим (рис.3).

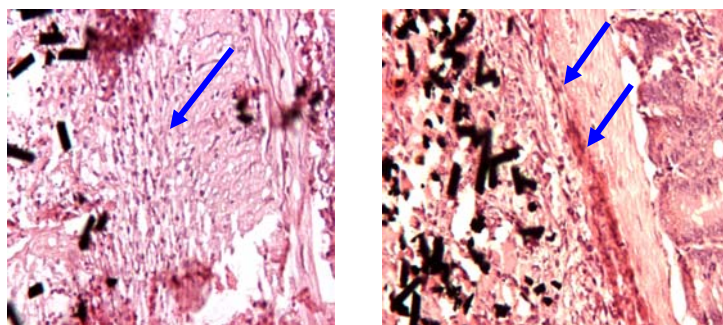


Рис.3. Гисто-морфологический анализ места имплантации матриков под брюшину мыши.

А- . формирование спаечного образования брюшины, нейтрофилы и макрофаги малочислены, новообразованная соединительная ткань бедна сосудами и фибробластами,

показано отсутствие раздражения брюшины используемыми волокнами. Окраска: гематоксилин-эозин, объектив 20х, окуляр 10х. Б- формирование спаечного образования брюшины, стрелками показано образование соединительнотканной капсулы, включающей в себя имплантированные волокна, с развивающейся соединительной тканью. Окраска: гематоксилин-эозин, объектив 40х, окуляр 10х.

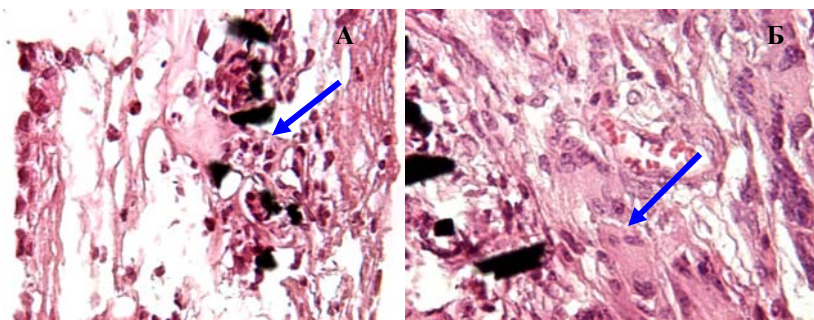
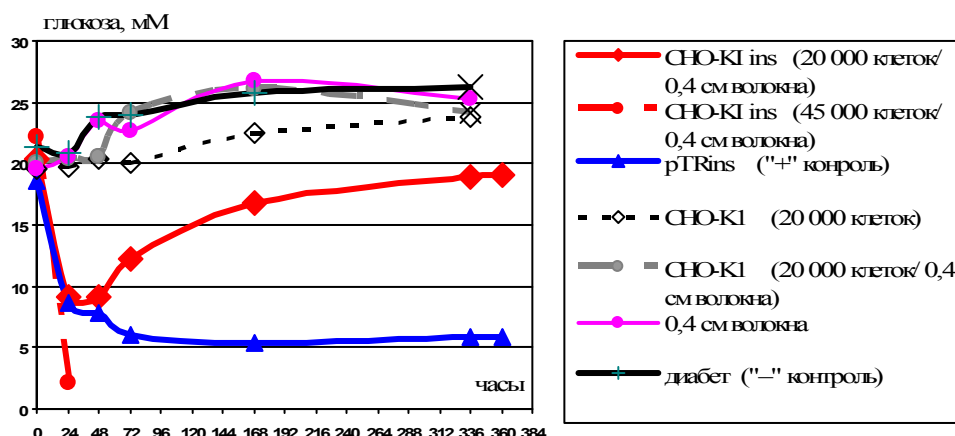


Рис.4. Гисто-морфологический анализ биоимплантов через 4 суток после операции. Окраска: гематоксилин-эозин, Объектив 40х, окуляр 10х.

На рисунке 4 представлены микрофотографии поперечных гистологических срезов имплантированных волокон с клетками эпителиального происхождения (СНО-К1) . На фотографии А видно формирование колоний эпителиоцитов, мигрировавших с нитей в формируемое спаечное образование брюшины, а также выявлен переход эпителиальных клеток с нитей на сформированное спаечное образование (фото Б)

Функциональную активность клеток, перенесенных в организм животных на углеродном волокне, мы изучали на модели стрептозотоцинового диабета с использованием клеточной линии стабильных трансформантов, экспрессирующих инсулин человека.



человека.

Рис.5.Содержание глюкозы в крови экспериментальных диабетических мышей.

Модельные животные были разделены на 7 групп, на момент формирования в группы подбирали животных с аналогичным уровнем глюкозы в крови, так что группы не отличались по среднему показателю. Мониторинг гликемии проводили ежедневно, уровень глюкозы в крови мышей натощак измеряли глюкометром. В одном эксперименте внутрибрюшинно модельным животным имплантировали матрицы с иммобилизованными клетками CHO-K1ins, матрицы с иммобилизованными клетками CHO-K1, матрицы без клеток и клетки CHO-K1ins. В качестве положительного контроля диабетическим животным в паренхиму печени вводили препарат рекомбинантной ДНК, содержащей ген препроинсулина человека (7). Результаты эксперимента представлены на рисунке 5.

У всех животных, которые были задействованы в опытах, послеоперационный период протекал спокойно без каких-либо видимых негативных изменений. Животные наблюдались ежедневно в течение достаточно длительного времени. В течение первой недели после операции отмечалось умеренное заживление раны, а к началу второй — исчезновение всяких следов покраснения в области швов, да и самого шва практически не было видно. Результаты подшивания имплантов под брюшину или ушивания в разрез открытой раны нами были оценены как удовлетворительные. При исследовании самих имплантов и окружающих их тканей не было замечено ни очагов некроза, ни каких-либо следов воспалительного процесса, что является обязательным условием успешного приживления импланта.

Выводы

1. Метод электронной микроскопии показал, что поверхность волокнистых углеродных материалов имеет объем сорбционного пространства пор (0,6–1,5 см³/г) и удельную поверхность пор (450–800 м²/г) значительно более высокую, чем у других типов исследуемых материалов [3]. Волокнистая ткань оказалась самой оптимальной структурой для иммобилизации клеток и длительного удержания их на своей поверхности. Пониженная способность к иммобилизации клеток на поверхности и затрудненная пространственная инвазия клеток ограничивают применение углеродных материалов другой структуры в биологических системах.
2. Углеродное волокно является гибким, эластичным, удобным в употреблении материалом, не токсичным для клеток, инертным для тканей хозяина при имплантации в организм. Такие волокнистые матрицы со стволовыми клетками можно использовать в создании биологических конструкций для дальнейшей трансплантации в организм с целью восстановления поврежденной ткани или органа.
3. Гистологический и цитологический анализы имплантов углеродное волокно-клетки

после длительного нахождения в организме животных подтвердили отсутствие какого-либо рода воспалительных процессов.

4. Углеродные волокна перспективны для выращивания тканей *in vitro*. По сравнению со многими современными материалами, применяемыми в качестве имплантов, высокая механическая прочность, гибкость, простота условий стерилизации и хранения, малый вес углеродных материалов, делают их оптимальными для производства биологических конструкций с дальнейшей трансплантацией в живой организм.

Литература

1. . *Перепелкин К. И*, Углеродные волокна. – Москва. – Мир. – 1987.- 215 с.
2. *Васильев Ю. А.*, Углеродные материалы в медицине. – Москва. – Мир. – 2001.- 187 с..
3. *Кордюм В.А., Топорова Е.К., Окунев О.В., Похолоенко Я.А., Сухорада О.М., Рубан Т.А., Андриенко В.И., Иродов Д.М.* Новая множественно маркированная линия клеток – производная от СНО-К1.-Биополимери і клітина. 2002.-Т.19.-№3.- С.252
4. *О.Топорова, Т.Титок, Т.Рубан, Н.Сухорада, Д.Иродов, В.Кордюм.* Human preproinsulin gene delivery into mammalian liver cells *in vivo*. Journal of artificial orga-ns.2004.- V.27.№7.P.608
5. *Mikhailovsky S. V. and Alexeeva T. A.* , Bioselective medical activated carbons-are they real?// ACS.- 2001.- P. 42-44.
6. *Титок Т.Г., Гулько Т.П., Топорова О.К., О.М., Кордюм.* Дозо-зависимые особенности развития СТЦ-индуцированной модели диабета 1-го типа у животных. Зб. наук. праць: Фактори експериментальної еволюції організмів.-2006.-Т.3.-С.649-653
7. *Olena Toporova, Tamara Titok, Tamara Gulko, Vitaly Kordium* . Experimental gene therapy for Type 1 diabetes. Abstract Book XIV An-nual Congress of European Society of Gene Therapy.-2006.-P.56

Резюме

В данной работе изучены возможности использования активированных углеродных материалов различной структуры (волокна, нити, шарики, многостенные углеродные нанотрубки) для иммобилизации клеток млекопитающих различного видового и тканевого происхождения с целью имплантации в организм. Представленные результаты исследований позволяют говорить о перспективности использования активированных углеродных волокнистых структур для scaffold технологий в регенеративной медицине.

В цьому дослідженні були вивчені можливості використання активованих вуглецевих матеріалів різної структури (волокна, нитки, кульки, вуглецеві нанотрубки) для іммобілізації клітин ссавців різного видового та тканинного походження з метою імплантації в організм. Наведені результати досліджень дозволяють говорити про перспективність використання активованих вуглецевих волокнистих структур для scaffold технологій у регенеративній медицині.

The possibilities of the use of the different structure activated carbon materials (fibers, spheres, sponges and ash) for immobilization mammal cells of different specific and tissue origin with the aim of implantation in an organism. The presented results allow to talk about perspective of the use the activated carbon fibers for scaffold technologies in regenerative medicine

ДИБИРОВА Х.Д.

Государственное учреждение Медико-генетический научный центр РАМН, Россия, Москва, Москворечье, 1.

hadizha-dibirova@mail.ru