

УДК 616.36: 611.018.26: 602.9

**А. Г. Скуратов, А. Н. Лызилов, Д. Р. Петренев, Е. В. Воропаев,  
А. А. Призенцов, М. М. П. Ангаге**

*Учреждение образования  
«Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Республика Беларусь*

## **ПОТЕНЦИАЛ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ГЕПАТОЦИТАРНОМ НАПРАВЛЕНИИ**

### ***Введение***

Клеточные биотехнологии занимают одну из лидирующих позиций среди направлений долгосрочных фундаментальных медицинских научных исследований [1]. Перспективным направлением является использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в регенеративной медицине, что связано с их высоким пролиферативным потенциалом, относительной простотой выделения и культивирования, а также возможностью дифференцировки в различные типы соматических клеток. Большой интерес представляет гепатоцитарная дифференцировка МСК с целью их использования для улучшения процессов регенерации печени при остром и хроническом повреждении. Научные результаты исследований показали, что при определенной комбинации ростовых факторов и в специфическом микроокружении возможна индукция гепатоцитарной дифференцировки МСК, ведущая роль в которой, вероятно, принадлежит определенным ростовым факторам и продуктам метаболизма, секретируемым клетками печени. Однако, механизмы этого процесса остаются еще не полностью раскрытыми, а результаты различных исследований зачастую противоречивы.

### ***Цель***

Оценить потенциал гепатоцитарной дифференцировки МСК в эксперименте на основании фенотипических и иммунологических изменений клеток в присутствии ростовых факторов и изолированных гепатоцитов.

### ***Материалы и методы исследования***

Объектом исследования явились МСК, выделенные из костного мозга лабораторных крыс самцов линии Wistar массой тела 180–200 г. МСК культивировали по стандартной методике протокола [2]. Также проведено выделение изолированных гепатоцитов из печени крыс по методике Seglen (2-х стадийная ферментативная перфузия печени) [3], адаптированной в нашей лаборатории.

Протокол дифференцировки МСК проводили по принципам, описанным в литературе [4]. МСК второго пассажа помещали в 6-луночные планшеты (ThinCert, GreinerBioOne) до получения конечной плотности  $2 \times 10^4$  клеток на  $\text{см}^2$ . Затем последовательно в три этапа проводили инкубацию МСК в средах, содержащих комбинации ростовых и дифференцировочных факторов, проводя смену среды каждые 3–4 сутки. Также, для проведения совместного культивирования МСК и изолированных гепатоцитов создали систему из 6-ти луночного планшета и пластиковых мембранных вставок с диаметром пор  $0,4 \mu\text{m}$  (Thin Cert, Greiner Bio One Inc.). МСК помещали в лунки планшета плотностью  $2 \times 10^4$  клеток на  $\text{см}^2$ , а гепатоциты вносили в камеру вставки. Таким образом МСК и гепатоциты были разделены мембраной, проницаемой для среды и растворимых факторов, но непроницаемой для клеток.

Морфологию клеток в процессе эксперимента исследовали с помощью световой инвертированной микроскопии. Для верификации дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки оценивали их способность синтезировать и накапливать гликоген, концентрацию мочевины в культуральной среде. Также исследовали экспрессию маркерных генов: альбумин (ALB), цитохром P-450 1A1 (Cyt1A1), фосфоенолпируват карбоксилаза (Carbox), цитокератин 18 (Krt18), цитокератин 19 (Krt19),  $\alpha$ -фетопротеин (AFP),  $\beta$ -актин (bAactin), глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH).

### ***Результаты исследования и их обсуждение***

При изучении изменении морфологии МСК на первом этапе дифференцировки после 24 часов инкубации клеток в среде, содержащей 1 % FBS, 3 % BSA и  $\beta$ FGF, нами наблюдались гибель и открепление от подложки части клеточных элементов. В то же время наблюдали образование кластеров клеток вокруг адгезированных к субстрату элементов. К окончанию первого этапа культивирования МСК были преимущественно представлены островками клеток, равномерно распределенными по площади культуральных планшетов.

Через 3 суток полностью замены селективной среды на среду «Diff 1», содержащую 10 % FBS и ростовые факторы ( $\beta$ FGF (10 нг/мл.), EGF (10 нг/мл.), HGF (20 нг/мл.)), что индуцировало второй этап дифференцировки. Контрольной группой были ячейки с той же средой, но без факторов роста. Во всех образцах наблюдался активный рост клеток который не был равномерным по всей поверхности сред. Так, на 4-е сутки культивирования в среде «Diff1» наблюдали зоны практически со 100 % монослоем наряду с участками конфлюэнтности (менее 50 %). Вероятно, данная особенность распределения клеток является следствием образования клеточных кластеров на первом этапе дифференцировки.

Было отмечено, что в ячейках с средой «Diff1» и с мембранными вставками, содержащими изолированные гепатоциты, наблюдали образование «фокусов адгезии» – участков клеток с распластанной морфологией и многоярусной организацией, в центральной части которых наблюдали адгезию дебриса и клеточных элементов округлой формы, что свидетельствовало об изменении профиля экспрессии молекул межклеточной адгезии в этих фокусах. Также претерпевала изменения и морфология клеток: веретенообразный фенотип сменялся полигональным с многочисленными выростами мембраны. При этом клетки контроля претерпевали значительные изменения с формированием гетерогенных структур, чередуя участки клеток с распластанной и конденсированной морфологией. Данный феномен, вероятно, обусловлен спонтанной дифференцировкой клеток в произвольном направлении.

На третьем этапе дифференцировки среду заменили на «Diff2», содержащую HGF (20 нг/мл.), дексаметазон (0,1  $\mu$ M), никотиновую кислоту (0,9 мг/мл), 1 % ITS и 0,1 % демитилсульфоксид. По сравнению с окончанием второго этапа дифференцировки значимых изменений в морфологии клеток не наблюдали, а основные изменения были отражены в усложнении многослойной структуры культуры клеток, отмиранием отдельных элементов и заселением опустевших площадей, что в большей степени было характерно для контрольной культуры. При наличии дифференцировочной среды по морфологическим показателям культура МСК была более устойчива, а факторы, выделяемые первичными гепатоцитами, также оказывали «стабилизирующее» влияние на МСК.

По окончании третьего этапа дифференцировки (21–23-е сутки), что соответствовало 43–45-м суткам культивирования клеток *in vitro*, в контрольной культуре без факторов роста наблюдали массовую гибель клеток и открепление их от субстрата.

Культуры МСК, находящиеся в дифференцировочных средах, к этим срокам сохраняли характерный распластаный фенотип и многоуровневую структуру, а в отдельных участках культур наблюдали образование плотных сфер с повышенной плотностью клеток. Мы полагаем, что эти образования подобны так называемым «эмбрионидным телам», образующимся при культивировании эмбриональных стволовых клеток. Для идентификации этих структур после 24 ч инкубации образцов в среде с повышенным содержанием глюкозы мы провели специфическое окрашивание на гликоген. Для контроля использовали свежеизолированные гепатоциты, мелкие гранулы гликогена, находящиеся в цитоплазме которых, при проведении ШИК-реакции давали розовое окрашивание. Аналогичное диффузное розовое окрашивание было отмечено в обнаруженных в культуре МСК структурах. Таким образом, эти скопления являются кластерами гепатоцит-подобных клеток, полученных из недифференцированных МСК и сохраняющими связь со стромой, образовавшейся из недифференцированных элементов.

Стоит отметить, что формирование кластеров клеток с морфологическими и биохимическими маркерами гепатоцитарной дифференцировки проходило в соответствии с «исходной программой» развития печеночной ткани, т. е. сначала формировался слой стромальных элементов, а затем появлялись кластеры клеток с характерными для гепатоцитов морфологическими характеристиками и положительной реакцией на гликоген. Также выявлено, что в образцах содержащих эти клеточные образования наблюдали повышение уровня продукции мочевины на 5–7 % относительно культуры МСК контроля без дифференцировочных факторов: медиана значений 63,1 и 59,3 мкмоль/10<sup>6</sup> клеток при 2 × 10<sup>6</sup> клеток/мл и 5 мМ аммиака за 24 часа культивирования соответственно) Это является дополнительным критерием, подтверждающим дифференцировку МСК в гепатоцитарном направлении.

На протяжении всего срока дифференцировки происходили относительно незначительные изменения в профиле экспрессии генов. Отмечали рост уровня относительной экспрессии гена *bActin* на протяжении всего срока культивирования. В контрольных культурах наблюдали постепенное снижение уровня экспрессии *AFP*, в то время как под воздействием факторов дифференцировочных сред уровень экспрессии *AFP* повышался. Экспрессия генов *Carbox* и *Krt19* изменялась немонотонно. Как правило, смена среды или внесение новых компонентов в состав сред совпадало с появлением экспрессии *Krt19* и изменением уровня экспрессии *Carbox* и *Cyt1A1*.

### **Выводы**

Проведенное исследование продемонстрировало высокий потенциал МСК к дифференцировке в гепатоцитарном направлении. Наличие ростовых факторов, выделяемых первичными гепатоцитами оказывало «стабилизирующее» влияние на культуру МСК. Наблюдаемые изменения в профиле экспрессии генов на протяжении этапов дифференцировки также свидетельствовали о присутствии в культуре МСК клеток, дифференцированных в гепатоцитарном направлении, однако экспрессия генов *Carbox*, *Krt18*, *Krt19* и *Cyt1A1* зависела от состава среды и носила индуцибельный характер.

Полученные результаты исследования позволяют экспериментально обосновать эффективность клеточной трансплантации МСК, которые при попадании в ткань пораженной печени под воздействием микроокружения способны дифференцироваться в гепатоцит-подобные клетки, улучшая функционирование органа.

### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Hany E Mare. Stem cell therapy: a revolutionary cure or a pandora's box / Hany E Mare // *Styem. Cell. Res. Ther.* – 2025. – № 16. – P. 255.

2. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone / H. Zhu [et. al.] // Nat Protoc. – 2010. – Vol. 5, № 3. – P. 550–60.
3. Seglen, P. O. Preparation of rat liver cells / P. O. Seglen // Methods Cell Biol. – 1976. – Vol. 13. – P. 29–83.
4. Hepatic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Strategies / S. Snykers [et. al.] // Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications, Methods in Molecular Biology. – 2011. – Vol. 698 – P. 305–314.

**УДК 616.614:617.55**

**А. Г. Скуратов, А. Н. Лызиков, С. И. Слизько,  
А. А. Призенцов, Е. Г. Молодой, М. М. П. Ангеге**

*Учреждение образования  
«Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Республика Беларусь*

## **КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАЗЕРНОГО ЛЕЧЕНИЯ СИНОВИАЛЬНЫХ КИСТ И ГИГРОМ**

### ***Введение***

Синовиальные кисты и гигромы представляют собой доброкачественные образования, возникающие в результате специфических патологических процессов в синовиальной оболочке суставов и сухожилий. Эти образования встречаются преимущественно в области кисти, запястья, стопы и коленного сустава. Их распространенность составляет около 5–20 % среди всех доброкачественных образований мягких тканей у взрослых. Механизм формирования связан с хронической травмой, нарушением обменных процессов и дегенеративными изменениями в суставах, что ведет к образованию грыжеподобных выпячиваний синовиальной оболочки пораженных суставов.

Традиционные методы лечения таких образований включают консервативные подходы, такие как наблюдение и использование противовоспалительных средств, пункцию с аспирацией и последующим введением склерозантов или кортикостероидов, а также хирургическое удаление. Однако все эти методы сопряжены с определенными рисками: повторными рецидивами, инфекциями, повреждением окружающих тканей и длительным восстановительным периодом.

В последние годы появляется интерес к лазерным методикам, которые позволяют минимально инвазивным способом воздействовать на патологический очаг, минимизировать травму тканей и снизить вероятность рецидивов. Лазерное лечение характеризуется высокой точностью, возможностью контролируемого деструкции внутренней оболочки кисты с последующим асептическим воспалением и облитерацией полости, и быстрым восстановлением пациента. В связи с этим актуальной задачей является оценка эффективности и безопасности лазерных методов при лечении синовиальных кист и гигром.

### ***Цель***

Провести клиническую оценку результатов лазерной терапии у пациента с синовиальными кистами и гигромами, а также выявить возможные преимущества по сравнению с традиционными подходами.

### ***Материалы и методы исследования***

В исследование было включено 85 пациентов, находившихся на стационарном лечении в хирургическом отделении № 2 ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 3». Возраст пациентов составил от 22 до 58 лет (средний возраст –