

После иммобилизационного стресса концентрация NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> увеличилась на 53 % (таблица 2). Таким образом, при 6-часовой иммобилизации происходила активация окислительного и нитрозилирующего стресса на фоне общего снижения АОА плазмы, что в свою очередь, могло привести к окислению и (или) нитрозилированию сульфгидрильных групп белковых молекул ВК<sub>Ca</sub>-каналов.

После 6-часового иммобилизационного стресса достоверных различий абсолютных значений GSH и GSSG не обнаруживалось, однако их соотношение уменьшалось на 46 % (таблица 3).

Таблица 3 — Концентрация восстановленного, окисленного глутатиона и их соотношение в крови крыс перенесших стресс до и после введения N-ацетил-L-цистеина

Группа животных	GSH мкг/мл крови	GSSG мкг/мл крови	GSH/GSSG
Контроль (n = 11)	521 ± 53	166 ± 25	4,29 ± 0,78
Стресс (n = 10)	424 ± 76	176 ± 21	2,29 ± 0,34*

\* p < 0,029 по сравнению с контролем; n-количество животных в группе

Соотношение GSH и GSSG играет важную роль в поддержании редокс-состояния клеток. Изменение этого соотношения может привести к изменению их функционирования. При иммобилизационном стрессе происходит активация ПОЛ, снижается АОА плазмы крови и соотношение GSH и GSSG изменяется в сторону накопления GSSG. Соотношение GSH и GSSG не только определяет редокс-состояние клеток, но и является своеобразным «молекулярным переключателем» их фенотипических свойств. Это связано с тем, что при изменении соотношения GSSG/GSH меняется характер активности целого ряда клеточных ферментов, факторов транскрипции (AP-1, NF-κB, HIF-1), молекулярных шаперонов, рецепторов, ионных каналов и др. В свою очередь, это может приводить к экспрессии генов, ответственных за синтез антиоксидантных ферментов и активации систем, восстанавливающих глутатион [5].

#### **Выводы**

1. Стресс снижает функциональную активность ВК<sub>Ca</sub>-каналов коронарных сосудов.
2. Под влиянием иммобилизационного стресса наблюдается увеличение интенсивности перекисного окисления липидов на фоне ослабления общей антиоксидантной активности и накопление продуктов деградации монооксида азота.
3. После иммобилизационного стресса соотношение GSH и GSSG уменьшается, что приводит к изменению редокс-состояния клеток.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Веремей, И. С. Восстановление NO<sub>3</sub> в NO<sub>2</sub> цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди: сб. науч. тр. / И. С. Веремей, А. П. Солодков. — Витебск, 1999. — С. 274–277.
2. Журавлев, А. И. Слабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике / А. И. Журавлев, А. И. Журавлева. — М.: Медицина, 1975. — 127 с.
3. Солодков, А. П. Изменение активности эндотелиоцитов коронарных сосудов под влиянием стресса / А. П. Солодков, А. П. Божко // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 1994. — Т. 80, № 4. — С. 65–72.
4. Nelson, M. T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M. T. Nelson, J. M. Quayle // Am. J. Physiol. — 1995. — Vol. 268. — P. 799–822.
5. Schafer, F. Q. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple / F. Q. Schafer, G. R. Buettner // Free Radic. Biol. Med. — 2001. — Vol. 30, № 11. — P. 1191–1212.

УДК 616.149-008.341.1-089

### **КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ**

*Скуратов А. Г.<sup>1</sup>, Лызигов А. Н.<sup>1</sup>, Воропаев Е. В.<sup>2</sup>,  
Петренев Д. Р.<sup>1</sup>, Кондрачук А. Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»

г. Гомель, Республика Беларусь

#### **Введение**

Хронические заболевания печени, в числе которых главное место занимает цирроз печени, приводящий к развитию печеночно-клеточной недостаточности, портальной гипертензии и ее осложне-

ниям, остаются серьезной проблемой современной медицины. В республике Беларусь 1,5 тыс. человек ежегодно заболевают циррозом, смертность от цирроза печени составляет около 35 случаев на 100 тыс. населения. Экстракорпоральная детоксикация и паллиативные хирургические вмешательства не позволяют существенно снизить летальность.

Единственным радикальным методом лечения конечных стадий цирроза остается трансплантация печени. Ее проведение является показателем уровня оказания специализированной медицинской помощи в стране. Однако для многих пациентов она становится недоступна из-за дефицита донорских органов и высоких экономических затрат. С другой стороны, долгосрочное выживание может быть затруднено из-за риска отторжения трансплантата, рецидива первичного заболевания и неизбежных побочных эффектов последующей пожизненной иммуносупрессии. Потребность в трансплантации печени в Беларуси — не менее 100 операций в год. Беларусь занимает первое место среди стран СНГ по количеству органных трансплантаций (25 операций на 1 млн. населения). К сожалению, ни одна страна мира не способна удовлетворить своих потребностей в количестве трансплантации. По данным ВОЗ, в мире сегодня выполняется только 10 % от необходимого числа трансплантаций.

Таким образом, целесообразно разрабатывать альтернативные подходы к лечению цирроза печени.

Печень характеризуется высокой регенераторной способностью. Однако, в случае, когда собственные резервы регенерации оказываются несостоятельными и становятся патологическими, заместительная клеточная трансплантация может стать весьма перспективной.

Среди долгосрочных приоритетных направлений научных исследований во всем мире особое место занимают биомедицинские клеточные технологии, ожидаемыми результатами которых являются создание продуктов, предназначенных для восстановления нарушенной заболеванием структуры органов или тканей. Перспективной областью исследований является создание систем эффективного культивирования клеток человека, воздействия на их свойства и разработка способов направленной дифференцировки с целью получения функционально активных клеток необходимой специализации для тканевой инженерии и клеточной терапии.

В последнее время огромное внимание привлекают мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Это объясняется относительной простотой выделения, культивирования и манипулирования МСК *ex vivo*. МСК имеют высокий потенциал к самообновлению и дифференцировке в различные типы соматических клеток.

Перспективным направлением может стать создание «терапевтического моста» перед трансплантацией путем разработки инновационных методов с использованием клеточных биотехнологий для поддержания функционирования печени, а может быть, и реконструкции паренхимы органа.

#### **Цель**

Разработать и экспериментально обосновать эффективность методики лечения цирроза печени на основе клеточных биотехнологий.

#### **Этапы исследования:**

1. Моделирование цирроза печени в эксперименте.
2. Выделение и культивирование МСК.
3. Проведение направленной дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении.
4. Отслеживание МСК после их введения в организм реципиента.
5. Оценка морфологических изменений в цирротической печени после трансплантации МСК.

#### **Материал и методы исследования**

Объектом исследования явились лабораторные крысы линии Wistar, ядро F (возраст 6–8 месяцев, массой тела 200–250 г). Для моделирования цирроза печени использовали модели токсического повреждения печени (тетрахлорметановую и тиоацетамидную) путем внутрибрюшинного введения 50 % раствора  $CCl_4$  на оливковом масле (1 мл/кг) 2 раза в неделю или тиоацетамида через день из расчета 100 мг/кг массы тела животного. Для потенцирования гепатотоксических свойств препаратов крысам давали 5 % этиловый спирт в качестве питья вместо воды. Клиническая и морфологическая картина цирроза печени с признаками портальной гипертензии (расширение вен портальной системы, асцит, спленомегалия и др.) развивалась через 2 месяца проведения эксперимента.

МСК выделяли из костного мозга и жировой ткани и культивировали по стандартной методике протокола [1]. Проводили иммунофенотипическую характеристику клеток путем анализа экспрессии маркерных генов МСК (CD 90+, 29+, 44+ и др.).

Для проведения направленной дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении использовали принципы, описанные в литературе [2]. МСК второго пассажа высаживали во флаконы и планшеты. Далее последовательно проводили инкубацию клеток в средах, содержащих комбинации

дифференцировочных факторов (среда DMEM/Ham F12 с добавлением смеси антибиотиков, 1 % FBS, 3 % BSA, 2μM-L-glutamine, βFGF, EGF, HGF, дексаметазона, 1 % ITS, никотиновой кислоты, 0,1 % демитилсульфоксида).

Для проведения совместного культивирования МСК и гепатоцитов использовали систему, состоящую из 6-луночного планшета и пластиковых вставок (inserts) с полупроницаемой мембраной. МСК вносили в лунки планшета, а свежeweделенные гепатоциты вносили в камеру вставки, т. е. МСК и гепатоциты оказывались разделенными мембраной, проницаемой для факторов среды, но предотвращающей перемещение клеток между компартментами. Гепатоциты были изолированы методом ферментативной перфузии печени [3]. Для этого брюшную полость наркотизированного животного вскрывали, канюлировали v.portae, вводили 1 мл физраствора с гепарином (500 ед.). Вскрывали v. cava inf. и перфузировали печень безкальциевым буферным, далее раствором, содержащим коллагеназу. Затем печень экстирпировали, разрушали капсулу и диспергировали паренхиму. Клеточную суспензию и фрагменты ткани фильтровали и центрифугировали. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева и ресуспензировали для достижения концентрации  $4 \times 10^5$  кл/мл.

Для оценки морфологии клеток проводили световую микроскопию. Характерной особенностью дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки является экспрессия различных генов, характерных для собственно гепатоцитов или для выполнения свойственных им функций. Был проведен анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты глюконеогенеза, детоксикации ксенобиотиков, белки плазмы крови и гепатоцитарные цитокератины.

Трансплантацию МСК лабораторным животным производили путем внутривенного системного и внутрипортального введения взвеси МСК в концентрации  $3-5 \times 10^6$  кл/мл.

Для отслеживания МСК после их трансплантации производили предварительное окрашивание МСК флуоресцентным липофильным красителем РКН 67 или флуоресцентными зондами DiI и DiI-СМ. Изготавливали криосрезы органов толщиной 7μм для проведения флуоресцентной микроскопии. Для дополнительного контрастирования производили окраску ядер клеток пропидий йодидом (PI).

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

Первичные МСК составляют менее 1 % от общего количества клеток костного мозга. В этой связи выделенную популяцию МСК обогащали на основе их способности прилипать к субстрату. На этапах культивирования и дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении во всех образцах наблюдали активный рост клеток с одновременным изменением морфологии клеточных элементов. МСК приобретали сначала веретенообразный фенотип, который затем сменялся полигональным с многочисленными выростами мембраны. Было замечено, что в ячейках с дифференцировочной средой и с мембранными вставками, содержащими первичные гепатоциты, наблюдали формирование многоуровневых клеточных кластеров, т. е. «фокусов адгезии», на поверхности фиксированных МСК. Для идентификации этих образований мы провели специфическое окрашивание на гликоген (ШИК реакция). В качестве контроля использовали свежeweделенные гепатоциты. Аналогичное диффузное розовое окрашивание было характерно для обнаруженных в культуре МСК образований. Также, в образцах, содержащих эти клеточные образования, наблюдали повышение уровня продукции мочевины.

Эти структуры, по-видимому, являются кластерами гепатоцит-подобных клеток, выращенными из недифференцированных СК и сохраняющими контакт со стромой, сформированной из недифференцированных элементов. Представляется важным, что формирование кластеров клеток с морфологическими и биохимическими признаками гепатоцитарной дифференцировки происходило в соответствии с «исходной» программой. Т. е. сначала формировался слой стромальных элементов, а лишь потом происходило формирование кластеров клеток с положительной реакцией на гликоген.

При анализе профиля экспрессии специфических генов в процессе дифференцировки МСК было выявлено, что зачастую, экспрессия этих генов является индуцибельной под воздействием ряда факторов среды. Более того, гепатоциты изолированные из органа и культивируемые *in vitro* быстро теряют свой характерный профиль экспрессии генов и при отсутствии специфических факторов окружения погибают. Экспрессия генов AFP, Krt19, Carbox и ALB, ассоциируемых с гепатоцитарной дифференцировкой МСК, в первичных гепатоцитах снижается в тысячи раз уже после 4 часов извлечения клеток из организма. В то же время экспрессия генов детоксикации ксенобиотиков (Cyt1A1) может возрасти, очевидно, вследствие изменения условий среды. Это следует учитывать при использовании метода ПЦР для типирования культур МСК, так как текущий профиль экспрессии может быть отражением совокупности действия различных факторов в ограниченный промежуток времени, но не отражать направленность процессов дифференцировки. Вполне вероятно, что профиль экспрессии генов клеток культивируемых *in vitro* во многом зависит от состава среды и особенностей партии эмбриональной сыворотки.

При исследовании трекинга МСК, введенных в организм крыс с индуцированным циррозом печени и здоровым крысам, и анализируя изображения флуоресцентной микроскопии органов, были выявлены очаги яркой флуоресценции (желто-зеленой РКН67 и красной DiI-CM) размером с клетку на фоне аутофлуоресценции цитоплазмы клеток и флуоресценции ядер. Наибольшая плотность очагов была отмечена в селезенке и в цирротической печени с тенденцией к увеличению плотности очагов от 1-х к 5-м суткам наблюдения. В здоровой печени, почках, миокарде, легких специфической флуоресценции не выявлено.

Однако, методы, основанные на включении специальных красителей (РКН 67, DiI и др.), имеют определенные недостатки: относительная токсичность для клеток, непродолжительность мечения и потеря специфического сигнала после нескольких клеточных делений. Альтернативой может стать использование естественных генетических различий мужского и женского организмов. А именно, возможность с помощью метода ПЦР оценивать наличие пол-специфического гена Sry, локализованного в Y-хромосоме МСК, выделенных от самца, в тканях женского организма после их трансплантации. Нами экспериментально подтверждено выживание клеток донора-самца в тканях реципиента-самки в течение 45 суток после трансплантации МСК.

Была проведена сравнительная оценка морфологических изменений в цирротической печени крыс после трансплантации взвеси МСК. Предварительные результаты исследования указывали на положительное влияние трансплантации МСК на обратное развитие фиброза печени у экспериментальных животных.

#### **Выводы**

Предварительные результаты экспериментальных исследований указывают на безопасность и эффективность клеточной трансплантации с использованием МСК при лечении цирроза печени, что открывает новую перспективную технологию для клинического применения. Однако, требуются дальнейшие исследования в этом направлении.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone / H. Zhu [et. al.] // Nat Protoc. — 2010. — № 5(3). — P. 550–560.
2. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в гепатоцитоподобные клетки in vitro / Я. И. Исайкина [и др.] // Вести Национальной академии наук Беларуси. — 2011. — № 1. — С. 10–15.
3. Seglen, P. O. Preparation of rat liver cells / P. O. Seglen // Methods Cell Biol. — 1976. — № 13. — С. 29–83.

**УДК 616.126.-42-053.2**

### **АСИМПТОМНАЯ ПАРОКСИЗМАЛЬНАЯ ТАХИКАРДИЯ У 11-ЛЕТНЕЙ ДЕВОЧКИ: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ**

*Скуратова Н. А.<sup>1,2</sup>, Беляева Л. М.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

<sup>2</sup>Учреждение

«Гомельская областная детская клиническая больница»

г. Гомель, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Государственное учреждение образования

«Белорусская медицинская академия последипломного образования»

г. Минск, Республика Беларусь

Нередко в детском возрасте аритмии носят асимптомный характер. Позднее и несвоевременное их выявление влечет к развитию резистентных к терапии нарушений ритма. Особенно эта проблема актуальна у детей, активно занимающихся спортом и имеющих очаги хронической инфекции [1, 2, 3].

Ниже представлен клинический случай выявления нарушения ритма у 11-летней девочки, занимающейся легкой атлетикой.

Анастасия А., 11 лет, поступила в оториноларингологическое отделение по поводу острого гайморита. В плановом порядке девочке была проведена электрокардиограмма, впоследствии по поводу изменений на ЭКГ девочка была переведена в кардиологическое отделение Гомельской областной детской клинической больницы. Жалоб не предъявляет, считает себя здоровой, в течение 2 лет активно занимается легкой атлетикой (спринтерский бег на 60 метров), тренировки 6 раз в неделю, регулярно участвует в проводимых соревнованиях. Наблюдается в спортивном диспансере 2 раза в год, ЭКГ проводилась ежегодно, изменений на ЭКГ не было, к занятиям спортом допущена, имеет 8 по-