

рительные результаты проведенных к настоящему времени исследований свидетельствуют о возможности выделения МСК из костного мозга или жировой ткани взрослого организма, культивирования и дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении, указывают на безопасность введения МСК и положительный эффект трансплантации, проявляющийся в регрессии фиброза печени у экспериментальных животных.

Выводы

К настоящему времени сформулированы современные представления о патофизиологии и разработаны рекомендации по лечению портальной гипертензии и ее осложнений, основанные на данных контролируемых рандомизированных исследований и метаанализов. Однако, несмотря на прогресс в подходах к диагностике и лечению портальной гипертензии, летальность при циррозе печени сохраняется на высоком уровне. Возможности органной трансплантологии далеко не всегда покрывают потребности в ней. Поэтому разработка новых методов лечения, основанных на клеточных биотехнологиях, является перспективным направлением в современной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Готье, С. В. Трансплантация печени: современное состояние проблемы / С. В. Готье // Альманах ин-та хирургии им. А.В. Вишневецкого. — 2008. — Т. 3, № 3. — С. 9–17.
2. Долгих, М. С. Перспективы терапии печеночной недостаточности с помощью стволовых клеток / М. С. Долгих // Биомедицинская химия. — 2008. — Т. 54, вып. 4. — С. 376–391.
3. Кулеша, В. Ф. Портальная гипертензия: учеб. пособие / В. Ф. Кулеша. — Благовещенск: Амурская гос. мед. академия. — 2011. — 60 с.
4. Продолжительность жизни больных и прогностическое значение проявлений и осложнений цирроза печени / Г. К. Мирджов [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2010. — Т. 20, № 5. — С. 27–32.
5. Franchis, R. Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension / R. Franchis // J. Hepatol. — 2010. — Vol. 53. — P. 762–768.

УДК 616.1.9-055.5

ПЦР-АНАЛИЗ КОПИЙНОСТИ ГЕНА SRY ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СУДЬБЫ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Скуратов А. Г., Петренев Д. Р., Рубанник Н. Н., Голубых Н. М., Осипов Б. Б.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Внедрение клеточных технологий в экспериментальную и практическую медицину сопряжено с появлением ряд вопросов. Наиболее актуальные из них: насколько эффективно прошла процедура трансплантации клеток, в каком количестве представлены клетки трансплантата и их потомки в тканях реципиента, какова локализация клеток в тканях и как прошла их дифференцировка и ассимиляция [1, 2, 3].

Существуют методы, основанные на включении специальных красителей (РКН 67 и др.). Однако они имеют определенные недостатки: токсичность для клеток, непродолжительность мечения, потеря специфического сигнала после нескольких клеточных делений. Другие методы генной модификации помогают преодолевать эти ограничения и позволяют, помимо приобретения клетками трансплантата новых функций, (устойчивость к антибиотикам, синтез инсулина, мультипотентность и др.), получить устойчивый генетический маркер, который сохраняется на протяжении жизни клеток трансплантата. Но существует весомый недостаток этого подхода: вмешательство в геном

клетки и сложность оценки потенциальных рисков неотрансформации в дальнейшем.

Хорошей альтернативой вышеуказанных методов может стать использование естественных генетических различий мужского и женского организмов. Возможно с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) оценивать наличие генов мужского организма в тканях женского и, следовательно, отслеживать судьбу клеток мужского организма после трансплантации их в женский организм. Особенно актуален этот подход в экспериментальных работах на лабораторных животных, так как при использовании линейных животных нивелируется проблема отторжения тканей.

В нашей работе для изучения терапевтического потенциала мезенхимальных стволовых клеток (МСК) используются белые крысы линии Вистар. Как и у большинства других млекопитающих, в геноме крыс присутствует ген *sry* локализованный в Y-хромосоме и ответственный за развитие организма по мужскому типу. Таким образом, определяя копияность гена *sry*, можно оценивать уровень присутствия трансплантированных клеток в тканях реципиента в различные сроки после трансплантации.

Цель

Апробировать способ отслеживания донорских мезенхимальных стволовых клеток в организме реципиента на основе определения копияности гена *sry* в тканях реципиента.

Материалы и методы исследования

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) получали из костного мозга самцов белых крыс по стандартной методике протокола. В работу брали МСК третьего пассажа. Дифференцировку в гепатоцитарном направлении производили в соответствии с принятыми протоколами путем последовательного культивирования в присутствии определенного набора ростовых факторов. Непосредственно перед трансплантацией дифференцированные и недифференцированные клетки снимали с пластика обработкой трипсином, отмывали порцией полной среды для нейтрализации ферментативной активности и ресуспензировали в минимальной среде в концентрации 10^6 кл/мл.

Клеточную трансплантацию проводили под общим наркозом путем введения суспензии МСК перитонеально, а также в системный кровоток через хвостовую вену и в портальный кровоток через портальную вену. Трансплантацию проводили интактным самкам, а также самкам крыс с индуцированным хроническим гепатитом, который развивался у крыс в течение 2 месяцев внутрибрюшинного введения 50 % раствора тетрахлорметана (CCl₄) на оливковом масле из расчета 1мл на 1 кг массы тела животного.

Через 45 суток после трансплантации животных выводили из эксперимента и выделяли внутренние органы. Отбирали фрагменты тканей печени, миокарда, селезенки, сальника и легкого, помещали в полипропиленовые 1,5 мл пробирки и хранили при -70 °С до выделения ДНК. Геномную ДНК выделяли в соответствии с рекомендациями производителя набора # K0512 (Fermentas, Литва).

Анализ ПЦР проводили при стандартных условиях с соответствии с рекомендациями производителя набора # K0252 (Fermentas, Литва) на оборудовании Rotor Gene 3000 (Corbet). Использовали праймеры специфичные для *sry* крысы **F** 5'-GAG ATC AGC AAG CAT CTG GGA-3', **R** 5'-CCT CTG TGG CAC TTT AAC CCT-3'(ампликон 156 п.о.) Для нормализации копияности гена применяли праймеры специфичные для гена *cut p450c* **F** 5'-AGC AAT GAG TTT GGG GAG GT-3', **R** 5'-GCA TCC AGG GAA GAG TTA GGG -3'(ампликон 89 п.о.). Специфичность праймеров и эффективность ПЦР были определены в предварительном эксперименте.

Копийность гена *sry* рассчитывали в процентах относительно представленности гена *cut p450c* в проанализированных образцах ДНК. Для определения относительного уровня экспрессии гена значение эффективности амплификации возводили в степень $-\Delta Ct$ для анализируемого гена и гена сравнения (для расчетов использовали значение эффективно-

сти ПЦР для гена сравнения 1,92). Эффективность ПЦР для выбранных пар праймеров составила 92–97 %, что соответствует требованиям к постановке количественной ПЦР.

Результаты исследования и их обсуждение

На предварительных этапах эксперимента были получены данные по определению копийности гена *sry* в тканях крыс-самок на уровне 0,0001 %. Однако оптимизация условий проведения реакции путем снижения концентрации матрицы до 40 нг ДНК позволило увеличить специфичность проводимого анализа ПЦР и установить, что в норме это значение ниже предела чувствительности метода. Увеличение сигнала ПЦР в реальном времени происходит после 35 цикла и идентифицировать продукт по кривым плавления не удастся вследствие его малой концентрации. Кроме того, при такой низкой концентрации искомого последовательности ДНК невозможно избавиться от неспецифических реакций.

Трансплантация дифференцированных и недеференцированных МСК была произведена 14 животным. На 45 сутки после трансплантации клеток экспериментальных животных выводили из эксперимента в соответствии с международными требованиями по гуманному отношению к лабораторным животным, отбирали образцы органов и замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения анализа.

Было проанализировано более 100 образцов ДНК. Положительный результат ПЦР на последовательность гена *sry* был обнаружен у всех реципиентов в образцах тотальной ДНК двух и более органов. При этом позитивный результат выявили в тканях печени в 9 случаях, селезенки — 14, сердца — 11, легкого — 10 и костного мозга в 11 случаях из 14. Наличие искомого гена верифицировали по температуре плавления продукта ПЦР только в 4 случаях (2 — сердце, 1 — легкое, 1 — костный мозг).

Было установлено, что копийность гена *sry* по отношению к гену *сут* р450с в образцах ДНК тканей мужского организма составляет $397,6 \pm 36,96\%$ ($M \pm SE$, $N = 14$). Для этого параметра в образцах тканей женского организма с положительным результатом ПЦР было выявлено непараметрическое распределение признака (тест Шапиро — Вилкинсона, $P < 0,0001$) и медианное значение составило 0,00049; 0,00024–0,00106 (Me ; 25–75 %) при среднем значении $0,0012 \pm 0,0003\%$ ($M \pm SE$, $N = 54$).

Медианное значение копийности гена *sry* для неverifiedированных положительных случаев составило 0,00046; 0,00021–0,00097 (Me ; 25–75 %, $N = 50$), а для verifiedированных $0,00503 \pm 0,00193$ ($M \pm SE$, $N = 4$). При сравнении медианных значений копийности гена *sry* в этих группах были выявлены достоверные отличия $P = 0,001$ (тест Манна — Уитни, $U = 12$). Медианное значение копийности гена *sry* в неverifiedированной группе соответствовало количеству трансплантированных клеток $1,07 \times 10^{-6}$, в verifiedированной — $9,93 \times 10^{-6}$ или одна и десять донорских клеток на миллион клеток реципиента соответственно.

Выводы:

1. Апробирован метод определения генетического материала донорских клеток в тканях реципиента методом ПЦР. Установлено, что положительный результат ПЦР может быть получен для единичных клеток донора в образцах ткани, однако для получения надежного verifiedированного (по кривым плавления продукта ПЦР) результата необходимо, чтобы донорские клетки присутствовали в тканях в концентрации не менее 10^{-5} .

2. Предложенный метод является значительно более чувствительным и менее трудоемким чем гистологическое выявление и позволяет идентифицировать очень малые количества донорских клеток в тканях.

3. Экспериментально подтверждено выживание клеток донора в тканях реципиента в течение 45 суток после сингенной клеточной трансплантации МСК. Малое количество выявленных клеток может быть связано с иммунным отторжением сингенных клеток т. к. линия экспериментальных животных является аутбредной, а также относительно ма-

лым количеством клеток трансплантата, низкой жизнеспособностью или же неоптимальным способом их введения, что требует проведения дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis / V. Volarevic [et al.] // Stem. Cells. — 2014. — Vol. 10. — P. 1002; 1818.
2. *Аверьянов, А. В.* Эффекты аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в экспериментальном лечении эмфиземы легких / А. В. Аверьянов [и др.] // Клиническая практика. — 2011. — № 4. — С. 35–43.
3. *Космачёва, С. М.* Стволовые клетки взрослых: проблемы получения, дифференцировки in vitro, перспективы клинического применения / С. М. Космачёва, М. В. Волк, М. П. Потапнев // Медицинские новости. — 2008. — № 9.

УДК 616.147.3-007.64-089-036.8

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИЙ ПО ПОВОДУ ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ

*Скуратов А. Г., Призенцов А. А., Осипов Б. Б.,
Колько А. П., Снежко Т. О., Бандель В. Е.*

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

Введение

Оценка качества жизни (КЖ) — надежный, информативный и экономичный метод изучения здоровья пациента как на индивидуальном, так и на групповом уровне. История изучения качества жизни начинается с 1947 г., когда проф. Колумбийского университета США D. Karnovsky опубликовал работу «Клиническая оценка химиотерапии при раке», где всесторонне исследовал личность пациента, страдающего соматическими заболеваниями. В разработке методологии изучения КЖ важную роль сыграли исследования А. McSweeney, предложившего оценивать КЖ, основываясь на четырех аспектах (эмоциональном состоянии, социальном функционировании, повседневной активности и проведении досуга). В настоящее время КЖ по рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) оценивается по следующим критериям: физические, психологические, уровень независимости, общественная жизнь, окружающая среда, духовность.

Исследования КЖ у флебологических пациентов являются перспективными для проведения анализа эффективности лечения варикозной болезни нижних конечностей (ВБНК). Изначально КЖ пациентов с заболеванием вен нижних конечностей оценивали при помощи общих опросников: NHR, SF-36, EuroQol [2]. Однако вскоре стало очевидно, что ни один из существующих тестов в полной мере не позволяет адекватно оценивать КЖ при венозных заболеваниях. Это и привело к необходимости в разработке отдельного опросника для пациентов с заболеваниями венозной системы. Вначале тест, разработанный для больных с хроническими заболеваниями вен, содержал анкету из 95 вопросов. После проведения длительного статистического и математического анализа была выпущена первая версия опросника Chronic Venous Insufficiency Questionnaire (CIVIQ-1), состоящая из 18 пунктов: 17 — общих и 1 — оценивающий трудовую деятельность [2, 3]. Вторая версия опросника (CIVIQ-2), включает 20 вопросов, каждый из которых оценивался по шкале от 1 до 5 баллов [1]. При последнем анализе в опросник был включен пункт о влиянии состояния здоровья на ежедневную деятельность, что позволило использовать данный опросник как для работающих, так и для неработающих пациентов. Кроме перечисленного добавились вопросы, отражающие интенсивность боли при тромбозе и возможности больного выйти за пределы дома.

Цель