

Установлено, что при алкогольной тревоге у 80 % пациентов имеется тремор пальцев рук [5]. Однако, тремор в подавляющем большинстве случаев начинается с латентных (субклинических) форм, которые невозможно диагностировать визуально. Нами предложен способ идентификации и количественного измерения латентного (скрытого) тремора с помощью лазерной указки, наводимой испытуемым на стандартную спортивную мишень. При способности удержания лазерного луча в границах десятки — тремор отсутствует, а чем более «зайчик» выходит за центр мишени — тем более выражен тремор. При измерении тремора у пациентов первой группы «зайчик» редко выходил за границы десятки, среднее значение выраженности тремора равнялось $0,21 \pm 0,2$ балла, тогда как во второй группе пациенты редко удерживали луч в границах десятки, средняя выраженность тремора у них составила $1,53 \pm 0,61$ балла ($p < 0,001$). Выявление латентного тремора предложенным способом возможно как при длительном динамическом наблюдении за пациентами, так и при однократном осмотре, просто по своей технологии, доступно во всех случаях как амбулаторной, так и стационарной практики и высокоэффективно в плане раннего выявления рецидивоопасных клинических состояний у лиц с алкогольной зависимостью в ремиссии.

Заключение

В амбулаторной практике для раннего выявления РОКС у пациентов с алкогольной зависимостью в ремиссии можно использовать данные анамнеза, клинические признаки (повышение артериального давления, увеличение частоты сердечных сокращений, появление тремора), лабораторные показатели, а также психологические тесты. Выявление у лиц с алкогольной зависимостью в период воздержания от употребления алкоголя значимого ($p < 0,05$) повышения ситуативной тревоги и снижения (ниже 0,52 по соотношению сегментоядерные нейтрофилы/лимфоциты, чувствительность 64,86 %, специфичность — 92,02 %) уровня неспецифической адаптационной реакции организма свидетельствует об угрозе рецидива алкогольной зависимости. В таких случаях, кроме обязательного проведения для всех пациентов с алкогольной зависимостью психологической коррекции (осознания болезни, терапевтической установки на абсолютную трезвость), необходимо уточнение клинической структуры рецидивоопасного расстройства с целью его адресной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерышев, О. Ф. Алкогольная зависимость: формирование, течение, противорецидивная терапия / О. Ф. Ерышев, Т. Г. Рыбакова, П. Д. Шабанов. — СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2002. — 192 с.
2. Либих, С. С. О профилактике рецидивов алкоголизма / С. С. Либих // Вопросы профилактики нервных и психических заболеваний: Тр. НИИ им. В. М. Бехтерева. — Л., 1962. — Т. 27. — С. 277–285.
3. Обьедков, В. Г. Об эффективности работы в психиатрии и наркологии, итогах работы психиатрической и наркологической служб РБ за 2010 год и задачах на 2011 год / В. Г. Обьедков, А. В. Копытов // Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. — 2011. — № 2 (4). — С. 142–147.
4. Сквиря, И. М. Количественная оценка структуры рецидивоопасных клинических ситуаций ремиссионного периода при алкоголизме / И. М. Сквиря // Сб. науч. ст. респ. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы медицины» и 17-й итоговой сессии Гомельского ГМУ: в 4 т. / ред. колл. А. Н. Лызинов [и др.]. — Гомель: УО «Гомельский ГМУ», 2008. — Т. 3. — С. 190–193.
5. Сосин, И. К. Алкогольная тревога (Монография) / И. К. Сосин, Е. Ю. Гончарова, Ю. Ф. Чуев. — Харьков: Коллегиум, 2008. — 752 с.

УДК 616.36: 611.018.26: 602.9

ВОЗМОЖНОСТИ ГЕПАТОГЕННОЙ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Скуратов А. Г., Кондрачук А. Н.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Среди большого разнообразия типов стволовых клеток, предлагаемых в клинику, в последнее время значительный интерес вызывают стволовые клетки жировой ткани. Эти клетки по своим свойствам и регенеративному потенциалу наиболее сходны с

мультипотентными стромальными/стволовыми клетками костного мозга, но при этом они имеют множество преимуществ, главными из которых являются относительная доступность, простота и безопасность получения в сравнении с методиками забора стволовых клеток из других источников. Современный уровень хирургии и анестезиологического сопровождения позволяет проводить кратковременные, малоинвазивные оперативные вмешательства для получения минимального количества цельной жировой ткани или липоасpirата, достаточного для непосредственного применения клеток или их дальнейшего культивирования. Не менее важной является возможность практически в любом возрасте пациента получить необходимое количество аутологичных клеток, что позволяет предупредить реакции отторжения трансплантата, риск передачи трансмиссивных инфекций и снять многие юридические и этические ограничения клеточной терапии [1].

В 1964 г. была описана популяция клеток, полученная из фрагментов жировой ткани придатка яичка крыс путем обработки ее протеолитическими ферментами и центрифугированием. Она включает в себя различные группы моноклеарных клеток (моноциты, макрофаги, эндотелиоциты, фибробласты, перициты, гладкомышечные клетки, преадипоциты) и названа стромальной васкулярной фракцией (Stromal Vascular Fraction — SVF) [2]. Впоследствии предшественники адипоцитов были выделены также из фрагментов жировой ткани человека. Однако к углубленному изучению и практическому применению этого типа стволовых клеток пришли только в последние годы благодаря усовершенствованию технологий липосакции и клеточных культур, позволивших выделять клетки с мультипотентными свойствами из обработанного липоасpirата [3].

Согласно консенсусу Международного общества технологий по применению жировой ткани (2004 г.), для клеток, полученных из SVF или непосредственно из жировой ткани путем культивирования и соответствующих общепринятым критериям МСК, принято определение «Adipose-Derived Stem Cells» (ASCs) — стволовые клетки из жировой ткани [4].

Цель

Выделение и культивировании МСК из жировой ткани, изучение подходов к гепатогенной дифференцировке МСК.

Материалы и методы

Заслуживает внимания возможность гепатогенной дифференцировки ASCs, которые, по сравнению с МСК костного мозга, способны дольше культивироваться в гепатогенном направлении для получения большего количества клеток и лучше выживают. При дифференцировке они меняют фибробластоподобную форму на полигональную и начинают продуцировать альбумин. Под влиянием фактора роста гепатоцитов HGF, а также FGF-1, FGF-4, онкостатина-М и дексаметазона ASCs человека приобретали фенотип гепатоцитов, встраивались в поврежденную тетрахлористым углеродом паренхиму печени мышей и восстанавливали ее функции. При внутривенной трансплантации недифференцированных ASCs также снижались значения показателей интоксикации, но морфологическая структура органа не восстанавливалась. Увеличение эффективности заселения поврежденной печени, снижение фиброза и восстановление величин показателей белкового обмена удалось получить при прекультивировании ASCs с фактором FGF-2 перед трансплантацией мышам. Также показано, что направленно дифференцированные в гепатогенном направлении ASCs более эффективны при внутрипортальном введении. Разработана технология выращивания направленно дифференцированных в гепатогенном направлении ASCs в 2–3-х-слойной культуре на полипропил-акриламидном матриксе]. ASCs на пористом полилактид-гликолидном матриксе продуцируют альбумин и поддерживают печеночный фенотип на протяжении 14 сут. после имплантации гепатэктомированным крысам [5].

Выделение МСК жировой ткани.

С целью изучения подходов к направленной гепатогенной дифференцировке нами было произведено выделение МСК из жировой ткани белых крыс-самцов линии Vistar

(возраст 6 месяцев, масса тела 200 г). Под общей ингаляционной анестезией сбрасывали на передней брюшной стенке волосяной покров крыс. После обработки операционного поля йодонатом производили лапаротомию путем рассечения кожи, подкожной жировой клетчатки и рассечения апоневроза по средней линии живота. Выделяли участок большого сальника и резецировали его объемом примерно 1 см^3 . В последующем ушивали рану брюшной стенки. Рану обрабатывали йодонатом. В послеоперационном периоде животное оставалось живым. Образцы жировой ткани размером $0,5\text{--}1\text{ см}^3$, полученные в ходе операции помещали в стерильный холодный ($4\text{ }^\circ\text{C}$) раствор Хэнкса. Ткань гомогенизировали с помощью хирургического инструмента (ножницы, пинцеты). Фрагменты ткани энергично встряхивали на вортексе. Полученную суспензию смешивали с равным объемом $0,075\%$ раствором коллагеназы I типа (Sigma, США). Инкубировали в течение $45\text{--}60$ мин. при $37\text{ }^\circ\text{C}$ (в термостате) при периодическом (каждые $10\text{--}15$ мин) легком помешивании. Для нейтрализации фермента добавляли к смеси равный объем фосфатного буфера (р-р Хэнкса) с 10% ФБС. Центрифугировали при 1200 rpm (330 g) 10 мин. Отбирали и удаляли супернатант, оставляя примерно $1\text{--}2$ мл осадка. Добавляли $8\text{--}10$ мл фосфатного буфера (р-р Хэнкса) с 10% ФБС. Центрифугировали кратковременно в течение 10 с при 1200 rpm (330 g). Полученная суспензия клеток осторожно собиралась в стерильную пробирку и отмывалась с $10\text{--}15$ мл раствора Хэнкса с 2% телочьей эмбриональной сывороткой путем центрифугирования в течение 7 мин. при скорости 1000 rpm . Процедуру отмывки повторяли дважды. Отбирали супернатант в новую стерильную пробирку. Оставшийся осадок удаляли. Отмывали полученную клеточную суспензию, добавив $8\text{--}10$ мл фосфатного буфера (р-р Хэнкса) с 10% ФБС. После максимально возможного удаления супернатанта объем клеточной суспензии доводился до $1\text{--}2$ мл. Подсчитывали количество клеток и оценивали жизнеспособность, используя камеру Горяева.

Культивирование МСК жировой ткани.

Клеточную суспензию для получения первого пассажа высевали в концентрации 1×10^4 клеток на 1 см^2 в культуральные флаконы. В качестве культуральной среды использовали Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), содержащей 10% ЭТС, 1% раствора глутамина и смеси антибиотиков: пенициллин 100 U/ml , стрептомицин $100\text{ }\mu\text{g/ml}$, неомицин $0,25\text{ }\mu\text{g/ml}$ («Sigma», США). Флаконы помещали в CO_2 -инкубатор ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2) и выдерживали для прикрепления клеток в течение 48 ч . Среду с неприкрепившимися клетками удаляли, культуры бережно отмывали D-PBS и заменяли среду культивирования на свежую. Дальнейшие смены среды проводили через $3\text{--}4$ суток. Мониторинг культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа. По мере роста и достижения субконфлюэнтного состояния (75% конфлюэнтности) клетки снимали $0,25\%$ трипсином-ЭДТА («Sigma», США) и пересевали в новые флаконы с разведением $1:3\text{--}1:10$. Для экспериментов использовали МСК второго пассажа.

Основные стадии формирования первичных колоний и роста культур МСК не отличались от описанных в литературе. На 2-м пассаже культуры были представлены морфологически гомогенной популяцией одноядерных фибробластоподобных веретеновидных клеток, иногда с небольшим количеством отростков (рисунок 1).

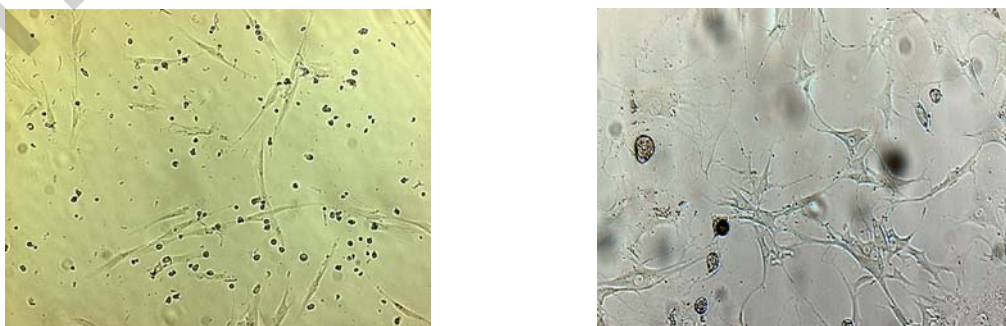


Рисунок 1 — Морфология нативной культуры МСК, 7, 10-е сутки культивирования. Объектив 30x, 40x

В логарифмической фазе роста среднее время удвоения клеточных популяций варьировало от 18 до 36 ч. Липоаспират превосходит костный мозг по выходу стромальных клеток. Это может быть связано с особенностями кровоснабжения жировой ткани и высокой плотностью капилляров. Однако, среди эндотелиальных клеток, перипитов, тканевых фибробластов и некоторых других клеточных типов, попадающих в осадочную фракцию после центрифугирования и способных прикрепляться к поверхности культурального пластика, вероятно, только МСК находят необходимые условия для активного роста. Помимо биологических, одной из особенностей МСК жировой ткани можно считать и относительную доступность материала для последующего выделения клеток. В этих условиях жировая ткань может стать не только дополнительным источником постнатальных (взрослых) МСК для биомедицинских исследований, но и представлять реальную альтернативу костному мозгу, получение которого связано с определенными техническими и медицинскими проблемами.

Заключение

Таким образом, стволовые клетки из жировой ткани благодаря своей доступности и безопасности получения, потенциалу дифференцировки и уникальным иммунологическим свойствам могут стать новым эффективным инструментом во многих направлениях регенеративной медицины. Экспериментальные исследования на культурах клеток *in vitro* и на животных *in vivo* как первый необходимый этап их изучения подтверждают перспективы клеточной терапии ASCs. Известно, что последующие клинические испытания достаточно дорогостоящие и сопряжены с трудностями и ограничениями разрешительных процедур. Однако, значительное количество таких испытаний в последние годы в США и странах Европы является доказательством того, что клеточные технологии с использованием ASCs заслуживают внимания клиницистов, и некоторые из них уже в скором времени могут быть официально рекомендованы к применению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кирик, В. М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине // Журн. АМН України. — 2010. — Т. 16, № 4. — С. 576–604.
2. *In vitro* and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells / G. Astori [et al.] // J. Transl. Med. — 2007. — № 5. — P. 55.
3. Characterization of human adult stem cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue / S. Baglioni [et al.] // FASEB J. — 2009. — 23, № 10. — P. 3494–3505.
4. Gimble, M. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine / M. Gimble, A. Katz, B. Bunnell // Circ. Res. — 2007. — № 100. — P. 1249–1260.
5. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure / A. Banas [et al.] // J. Gastroen. Hepatol. — 2009. — Vol. 24, № 1. — P. 70–77.

УДК 616-053.2-092.11:796.071

ГРУППЫ РИСКА МИОКАРДИОДИСТРОФИИ И ОБМОРОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ СРЕДИ ДЕТЕЙ-СПОРТСМЕНОВ

Скуратова Н. А.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Проблема отбора детей для занятий спортом была и остается одной из самых важных проблем для каждого вида спорта. Правильное ее решение обеспечивает развитие вида спорта и успехи спортсменов [1, 2]. ССС юных спортсменов является лимитирующим фактором в физической активности, однако отсутствие адекватных критериев отбора детей для занятий спортом увеличивает риск развития дезадаптивных реакций со стороны аппарата кровообращения [1, 3].