

ритма). Нарушения могут возникнуть на различных этапах повышенной «уязвимости» функций (период полового созревания, гормональных всплесков и т. д.), причем у детей младшего возраста клинически значимые нарушения ритма могут быть асимптомными. Достаточно часто дети могут попробовать себя в различных видах спортивной деятельности, минуя контроль спортивного врача, так как могут «поменять» несколько спортивных секций в течение года. Не нужно категорически настраивать родителей и ребенка в необходимости ограничения занятий спортом, но нужно рекомендовать углубленное обследование. Одним из главных аспектов наблюдения за «спорными» случаями является динамический контроль. При решении вопросов допуска к занятиям профессиональным спортом у юных спортсменов с синдромом CLC рекомендовано применение малоинвазивных кардиохирургических вмешательств: электрофизиологического исследования и аблации дополнительных пучков проведения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макаров, Л. М. Внезапная смерть у молодых спортсменов / Л. М. Макаров // Кардиология. — 2010. — № 2. — С. 78–83.
2. Макарова, Г. А. Справочник детского спортивного врача: клинические аспекты / Г. А. Макарова. — М. : Медицина, 2008. — 437 с.

УДК 616.36: 611.018.26: 602.9

ПОДГОТОВКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЕРЕД ИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

Скуратов А. Г.

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

Хронические заболевания печени и цирроз, развивающиеся в результате воздействия различных этиологических факторов, входят в число шести основных причин смерти пациентов от 35 до 60 лет [1]. Трансплантация печени остается единственным эффективным методом лечения конечных стадий цирроза печени. Однако дефицит донорских органов и высокие экономические затраты делают ее недоступной для многих пациентов. Также, долгосрочное выживание может быть затруднено из-за риска отторжения трансплантата, рецидива первичного заболевания и побочных эффектов последующей пожизненной иммуносупрессивной терапии [2].

Таким образом, необходимо разрабатывать альтернативные подходы к лечению хронических заболеваний печени. При недостаточности собственных резервов регенерации печени заместительная клеточная трансплантация становится перспективной [3, 4].

Научные исследования последних лет направлены на изучение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из-за их высокого потенциала к самообновлению и дифференцировке в различные типы соматических клеток, в том числе в гепатоцитарном направлении [5]. МСК можно получать из соматических клеток, что делает безопасным их применение и решает многие этические проблемы. МСК также обладают иммуномодулирующим, противовоспалительным, антиапоптозным, а также пропролиферативным воздействиями в сайтах поражения печени. Они обладают хемотаксисом к поврежденной печени, способствуют гуморальному и клеточному ответу при восстановлении тканей. Эти универсальные особенности МСК делают их перспективным ресурсом клеток для лечения различной патологии печени.

Однако, до сих пор недостаточно доказанной эффективности гепатоцитарной дифференцировки МСК для клинического применения при их трансплантации.

Цель работы

Разработка метода подготовки мезенхимальных стволовых клеток перед их трансплантацией для лечения хронических заболеваний печени, который включает клинические рекомендации по выделению аутологичных МСК из жировой ткани, культивированию клеточной культуры в лабораторных условиях, а также методику гепатоцитарной дифференцировки МСК.

Материалы и методы

Забор биологического материала для выделения МСК.

Забор жировой ткани производится по принципу липоаспирации. Область забора определяется индивидуально в зависимости от конституциональных особенностей пациента (передняя брюшная стенка, внутренняя поверхность бедер, ягодицы и др.). Проводится местная инфильтрационная анестезия кожи и подкожной клетчатки. Для этого используется раствор Кляйна, который состоит из физиологического раствора натрия хлорида, лидокаина, адреналина, натрия бикарбоната. Натрия бикарбонат улучшает действие местных анестетиков и предотвращает сдвиг рН в кислую сторону. Сочетание адреналина и местного анестетика способствует вазоконстрикции и более длительному блокированию нервных окончаний, что делает процесс липоаспирации более безопасным в плане возможных геморрагических осложнений. Выполняется прокол кожи остроконечным скальпелем. Затем вводится аспирационная игла, подсоединенная к шприцу, в котором создается отрицательное давление. Производят поступательные движения иглой в клетчатке до заполнения шприца жировой массой. Содержимое шприца дважды отмывают физиологическим раствором натрия хлорида от примеси крови и отстаивают в течение 5 минут. Супернатант удаляют.

Далее жировую ткань помещают в стерильный флакон с фосфатно-буферной средой (ФБС), бензилпенициллином, стрептомицином и неомицином. Флакон помещают в стерильный транспортный контейнер и в сроки до 2 часов транспортируют в лабораторию для выделения и культивирования МСК.

Выделение и получение МСК в лабораторных условиях

Полученную жировую суспензию смешивают с равным объемом 0,075 % раствором коллагеназы I типа. Инкубируют в течение 45–60 мин. при 37 °С (в термостате) при периодическом (каждые 10–15 мин) легком помешивании. Для нейтрализации фермента добавляют к смеси равный объем фосфатного буфера (р-р Хэнкса). Центрифугируют при 1200 г^г 10 мин. Отбирают и удаляют супернатант, оставляя 1–2 мл осадка. Добавляют 8–10 мл фосфатного буфера (р-р Хэнкса) с 10 % ФБС. Полученная суспензия клеток собирают в стерильную пробирку и отмывают с 10–15 мл раствора Хэнкса с 2 % телячьей эмбриональной сывороткой путем центрифугирования в течение 7 мин. при скорости 1000 г^г. Процедуру отмывки повторяют. Отбирают супернатант в новую стерильную пробирку. Оставшийся осадок удаляют. Отмывают полученную клеточную суспензию, добавив 8–10 мл фосфатного буфера (р-р Хэнкса) с 10 % ФБС. После максимально возможного удаления супернатанта объем клеточной суспензии доводится до 1–2 мл.

Подсчитывают количество клеток и оценивают жизнеспособность, используя камеру Горяева.

Культивирование МСК жировой ткани

Клеточную суспензию для получения первого пассажа высевают в концентрации 1×10^4 клеток на 1 см^2 в культуральные флаконы. В качестве культуральной среды используют Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), содержащей 10 % ЭТС, 1 % раствора глутамина и смеси антибиотиков: пенициллин 100 U/ml, стрептомицин 100 µg/ml, неомицин 0,25 µg/ml («Sigma», США). Флаконы помещают в CO₂-инкубатор (37 °С, 5 % CO₂) и выдерживают для прикрепления клеток в течение 48 ч. Среду с неприкрепившимися клетками удаляют, культуры отмывают D-PBS и заменяют средой культивиру-

вания на свежую. Дальнейшие смены среды проводят через 3–4 суток. Мониторинг культуры проводят с помощью инвертированного микроскопа. По мере роста и достижения субконфлюэнтного состояния (75 % конфлюэнтности) клетки снимают 0,25 % трипсином-ЭДТА («Sigma», США) и пересевают в новые флаконы с разведением 1:3–1:10. Для экспериментов используют МСК второго пассажа.

Контроль фенотипа мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани

Выделенные и культивированные клетки оценивают морфологически при световой микроскопии. Оценку иммунофенотипа клеток проводят путем исследования экспрессии поверхностных маркеров. Для того, чтобы отнести клетки к МСК, они должны экспрессировать определенные антигены, характерных для мезенхимальных клеток предшественниц: CD90+, CD105+, CD13+, CD44+, CD 73+, CD 54+, CD 29+, CD9+, CD34–, CD45–, HLA-DR–.

Бактериологический контроль стерильности

Микробиологический контроль проводят в специализированной микробиологической лаборатории, аттестованной для проведения исследований медико-биологических препаратов. При отсутствии роста микроорганизмов трансплантат считается прошедшим контроль стерильности.

Дифференцировка МСК в гепатоцитоподобные клетки

Мезенхимальные клетки второго пассажа высаживаются во флаконы для получения конечной плотности клеток 2×10^4 кл/см². Далее последовательно проводят инкубацию клеток в средах, содержащих комбинации дифференцировочных факторов, перечисленных в таблице 1. На этапах 2 и 3 проводят 50 % смену среды каждые 3–4 сутки.

Таблица 1 — Состав среды и продолжительность этапов дифференцировки МСК

№ этапа	Продолжительность	Состав культуральной среды
—	—	Базовая среда: среда DMEM/HamF12 (Invitrogen-GIBCO, США) с добавлением смеси антибиотиков: пенициллин 100 U/ml, стрептомицин 100 µg/ml, амфотерицин В 0,25 µg/ml («Sigma», США). Среду стерилизовали фильтрованием (0,22 µm) и хранили в холодильнике
1	3 сут.	Базовая среда с добавлением 1 % FBS (HyClone, ThermoFisher), 3 % BSA, 10 % FBS, 2µM-L-glutamine, 10 ng/ml βFGF
2	8 сут.	«Diff1»: базовая среда с добавлением 10 % FBS, 2µM-L-glutamine, βFGF (10 нг/мл.), EGF (10 нг/мл.), HGF (20 нг/мл.)
3	> 10 сут	«Diff2»: базовая среда с добавлением HGF (20 нг/мл.), дексаметазола (0,1 µM), 1 % ITS, никотиновой кислоты (0,9 мг/мл), 0,1 % демитилсульфоксида

При определении степени экспрессии генетических маркеров гепатоцит-подобных клеток отрицательным контролем служит культура МСК до начала их дифференцировки (день 0). Группой сравнения являются культуры МСК, находившиеся в тех же условиях, но без добавления ростовых дифференцировочных факторов HGF, EGF, βFGF. В качестве положительного контроля использовались биоптаты тканей нативной печени и первичные гепатоциты, выделенные после перфузирования и ферментативной обработки печени коллагеназой II типа.

Совместное культивирование МСК костного мозга и гепатоцитов

Выделение гепатоцитов. Гепатоциты изолируют с помощью 2-х стадийной ферментативной перфузии печени описанной в работе Seglen и адаптированной в нашей лаборатории. Для проведения совместного культивирования МСК и первичных гепатоцитов используют систему, состоящую из 6-ти луночного планшета и пластиковых вставок с полупроницаемой мембраной с диаметром пор 0,4 µm. МСК вносят в лунки планшета для получения плотности клеток 2×10^4 клеток/см². Свежевыделенные гепатоциты вносят в камеру вставки, т.о. МСК и гепатоциты оказываются разделенными мембраной, проницаемой для растворимых факторов и среды, но предотвращающей перемещение клеток

между компартментами. Этапы культивирования и дифференцировочные среды используют такие же, как и в протоколе направленной дифференцировки МСК.

Определение эффективности гепатогенной дифференцировки. В процессе и по окончании этапов дифференцировки состояние и морфологию клеточных культур оценивают с помощью световой инвертированной микроскопии. Для верификации дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки оценивают их способность синтезировать и накапливать гликоген, а также концентрацию мочевины в культуральной среде.

Анализ экспрессии маркерных генов в культурах МСК. Оценивается синтез специфических веществ и экспрессия генов, характерных для гепатоцит-подобных клеток: Альбумин (ALB), цитохром P-450 1A1 (Cyt1A1), фосфоенолпируват карбоксилаза (Carbox), цитокератин 18 (Krt18), цитокератин 19 (Krt19), α -фетопротеин (AFP), β -актин (bActin), глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH)

Обсуждение

Подготовка МСК перед трансплантацией при лечении хронических заболеваний печени включает выделение аутологичных МСК из жировой ткани, культивированию клеточной культуры в лабораторных условиях, а также гепатоцитарную дифференцировку МСК.

Критериями «готовности» культуры МСК являются: содержание МСК не менее 10^6 клеток в 1 мл; иммунофенотипическая характеристика CD90+, CD105+, CD13+, CD44+, CD 73+, CD 54+, CD 29+, CD9+, CD34-, CD45-, HLA-DR-; пассаж P1-P3 (не более 40 дней культивирования); стерильность культуры и отрицательный тест на инфекционные агенты (гепатит В, С, ВИЧ, сифилис, цитомегаловирус); жизнеспособность МСК не менее 95 %; положительные тесты на специфические для гепатоцитов маркеры по окончании дифференцировки.

Заключение

Проведенные испытания показали эффективность метода предтрансплантационной подготовки клеточной культуры МСК для лечения хронических заболеваний печени. Метод может применяться в лабораториях, сертифицированных для работы с культурами клеток. В последующем клеточные культуры могут быть трансплантированы пациентам с хроническими заболеваниями печени или подвергнуты криоконсервации с включением в фонд криобанка.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белякин, С. А.* Смертность от цирроза печени как индикатор уровня потребления алкоголя в популяции / С. А. Белякин, А. Н. Бобров // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2009. — Т. 3. — С. 189–194.
2. *Готье, С. В.* Трансплантация печени: современное состояние проблемы / С. В. Готье // Альманах Института хирургии имени А. В. Вишневского. — 2008. — Т. 3, № 3. — С. 9–17.
3. *Кирик, В. М.* Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине / В. М. Кирик, Г. М. Бутенко // Журн. АМН Украины. — 2010. — Т. 16, № 4. — С. 576–604.
4. *Яргин, С. В.* Стволовые клетки и клеточная терапия: на подступах к научному подходу / С. В. Яргин // Цитология. — 2010, Т. 52 (№ 11). — С. 918–920.
5. *Wu, X. B.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells / X. B. Wu, R. Tao // Hepatobiliary Pancreat Dis Int. — 2012 Aug 15. — № 11(4). — P. 360–371.

УДК 616.36: 611.018.26: 602.9

КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Скуратов А. Г., Лызиков А. Н., Петренев Д. Р., Осипов Б. Б.

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

Введение

Цирроз печени и связанная с ним печеночно-клеточная недостаточность остается серьезной проблемой. В Республике Беларусь смертность от цирроза печени составляет около 35 случаев на 100 тыс. населения. Паллиативные хирургические вмешательства