

14. Fitzpatrick A.M., Gaston B.M., Erzurum S.C., Teague W.G. Features of severe asthma in school-age children: Atopy and increased exhaled nitric oxide // J Allergy Clin Immunol. – 2006. – №118. – P.1218-1225.

15. Fitzpatrick A.M., Teague W.G. Severe Asthma in Children: Insights from the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program // Pediatr Allergy Immunol Pulmonol. – 2010. – Vol. 23. №2. – P.131-138.

16. Fujita H., Soyka M.B., Akdis M., Akdis C.A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy // Clinical and Translational Allergy. – 2012. – №2. – P.1-8.

17. GINA Global Strategy for Asthma Management and

Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2010. www.ginasthma.org.

18. Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000. – №161. – P.309-329.

19. WHO Position Paper Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases // Allergy. – 1998. – Vol. 53. №44 (supl.). / G. Ed. J. Bousquet, R.F. Lockey, H.J. Malling.

20. Zielen S., Kardos P., Madonini E. Steroid-sparing effects with allergen-specific immunotherapy in children with asthma: a randomized controlled trial // J Allergy Clin Immunol. – 2010. – №126. – P.942-949.

Информация об авторах: 664079, Иркутск, м/р Юбилейный 100, ИГМАПО, Горбовской Федор Валерьевич – аспирант кафедры, e-mail: gorbovskoy_84@mail.ru; Воржева Ирина Ивановна – доцент кафедры, к.м.н., e-mail: bores@angara.ru; Буйнова Светлана Николаевна – ассистент кафедры, к.м.н., e-mail: 33s1@rambler.ru

© ЛЕПЕХОВА С.А., ЗАРИЦКАЯ Л.В., КАРГИН А.Г., БАТУНОВА Е.В., ГОЛЬДБЕРГ О.А., КОВАЛЬ Е.В., ПОСТОВАЯ О.Н. – 2012

УДК 602.6:59

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ IN VITRO

Светлана Александровна Лепехова¹, Лариса Васильевна Зарицкая^{1,2}, Александр Германович Каргин¹, Елена Владимировна Батунова², Олег Аронович Гольдберг¹, Елена Владимировна Коваль¹, Ольга Николаевна Постовая²

(¹Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, директор – чл.-корр. РАМН, д.м.н., проф. Е.Г. Григорьев, научный отдел экспериментальной хирургии с виварием, зав. – д.б.н. С.А. Лепехова;

²Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, ректор – д.м.н., проф. В.В. Шпрах, ЦНИЛ, зав. – к.м.н., доц. А.В. Стародубцев)

Резюме. Представленная работа посвящена новому способу оценки жизнеспособности культивируемых эмбриональных клеток печени в среде культивирования. Установлено, что при культивировании полученные клетки вырабатывают фактор роста гепатоцитов (HGF) с максимальной концентрацией на 5-е сутки и увеличением в 3,5 раза по сравнению с начальной концентрацией, что по времени совпадает с пиком митотической активности. Выявлена положительная корреляция между концентрацией HGF и митотической активностью. Предложенный способ оценки жизнеспособности культивируемых клеток печени позволяет точно установить сроки максимальной готовности клеток к трансплантации и стандартизировать по содержанию регуляторного пептида HGF в среде культивирования.

Ключевые слова: эмбриональные клетки печени, культура, жизнеспособность.

ASSESSMENT OF VIABILITY OF CULTURED EMBRYONIC LIVER CELLS IN VITRO

S.A. Lepekhova¹, L.V. Zaritskaya^{1,2}, A.G. Kargin¹, E.V. Batunova², O.A. Goldberg¹, E.V. Koval¹, O.N. Postovaya²

(¹Center of Reconstructive Surgery, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences;

²Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education)

Summary. The given work is devoted to a new way of assessing the viability of cultured embryonic liver cells in the culture medium. Found that when cultured derived cells produce hepatocyte growth factor (HGF) with a maximum concentration on the 5th day and increased by 3.5 times compared with the initial concentration, which will coincide with the peak of mitotic activity. Found positive correlation between the concentration of HGF and mitotic activity. The proposed method of assessing the viability of cultured liver cell can accurately set the time of maximum availability of cells for transplantation and standardize the content of the regulatory peptide of HGF in the culture medium.

Key words: embryonic liver cells, culture, viability.

В медицине используются свиные ткани, в том числе биоискусственные системы, при различных вариантах печеночной недостаточности [3,4], для трансплантации островков Лангерганса при лечении сахарного диабета [1]. Предлагается использовать ксенотрансплантацию гепатоцитов в качестве временной меры перед аллотрансплантацией печени [11].

Литературные данные свидетельствуют о том, что клетки, выделенные из органа, сохраняют функциональные свойства и характерную структуру [8]. Известно, что трансплантированные изолированные гепатоциты не столько увеличивают функционирующую массу печени, сколько изменяют гуморальные и молекулярные механизмы, отвечающие за активацию функций оставшихся гепатоцитов реципиента и регенерацию путем выработки регуляторных пептидов, среди которых ведущая роль принадлежит факторам роста. Среди известных факторов роста выделяют один, обладающий наиболее выраженным митогенным эффектом на гепа-

тоциты – фактор роста гепатоцитов. Ответственными за выработку этого фактора являются клетки Ито, а также эндотелиальные и купферовские клетки печени, ретикулярные клетки селезенки. Эмбриональная ткань печени содержит большое количество фактора роста гепатоцитов и его рецепторов; гепатоциты зародыша в первом триместре развития активно отвечают на стимуляцию фактором роста гепатоцитов [9,10]. При разработке технологии необходима стандартизация подготовки клеток к трансплантации.

Целью работы явилась разработка способа оценки жизнеспособности культивируемых эмбриональных клеток печени в среде культивирования.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе клеточного бокса научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН (директор чл.-корр. РАМН

Е.Г. Григорьев), (вет. удостоверение 238 № 0000023 от 28.11.2011 г., служба ветеринарии Иркутской области). Забор биоматериала проводили с соблюдением правил гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом Минздрава СССР №742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и №48 от 23.01.1985 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных», а также основывались на положениях Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг.

Культуру эмбриональных клеток печени получали от плодов свиньи 2-2,5 месячного срока внутриутробного развития. Плоды забирали на мясокомбинате при вынужденном убое супоросных свиноматок. С соблюдением условий асептики беременные матки транспортировали в операционную вивария сразу после забора. Заготовку биоматериала проводили под внутримышечным наркозом по методике Г. Старке [5] в стерильных условиях. Клетки получали комбинированным методом дезагрегации, за основу был взят метод М. Berry (1969) [7].

Подсчет жизнеспособных клеток проводили с помощью теста на исключение красителя с использованием камеры Фукса-Розенталя.

Культивирование выделенных клеток проводили в матрасах Ру с использованием стандартных питательных сред и добавок, производимых фирмами «ПанЭко» и «Sigma», в течение 5 суток по методу Р. Фрешни (1989) [6]. Из флакона, в котором культивируют эмбриональные клетки печени, забирают 0,5 мл среды культивирования для определения содержания регуляторного пептида HGF. Определение HGF проводят в динамике (один раз в сутки в течение всего срока культивирования) методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием анализатора Stat Fax-2000 (Awareness technology INC USA) и набора для определения HGF (HGF ELISA KitBiosource, Бельгия) в сыворотке, супернатанте и среде клеточных культур, буферных растворах. При использовании способа – прототипа определяли уровень альбумина в среде культивирования на анализаторе «Синхрон-5» (Beckman, США) с помощью стандартного набора реактивов фирмы Beckman.

Для сравнения оценку жизнеспособности эмбриональных клеток печени проводили 3-мя способами: 1-ый – окраска трипановым синим, 2-ой – по содержанию альбумина в среде культивирования и 3-ий, предложенный нами, – по количеству регуляторного пептида HGF в среде культивирования. Для каждого способа были проведены исследования *in vitro* на 38 образцах клеточной взвеси, приготовленной из эмбриональной печени свиньи. Во всех случаях максимальный срок культивирования составил 144 часа.

Данные представляли в виде медианы с нижним и верхним квартилями (25-й и 75-й процентиля). Определение значимости различий полученных данных (p) в сравниваемых выборках проведено по критериям Манна-Уитни (U), Вилкоксона (W). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p=0,05$ [2].

Результаты и обсуждение

Методом культивирования добивались приобретения клетками печени максимальной пролиферативной активности. Культивирование всех образцов проводили в стандартных условиях.

При подсчете окрашенных и неокрашенных клеток в камере Фукса-Розенталя по первому способу число

жизнеспособных клеток составило: $98,5 \pm 1,2\%$. Этот метод имеет низкую точность, так как оценку жизнеспособности культивируемых клеток проводят по целостности их мембран, а не по функциональной активности клеток. Кроме этого, для проведения суправитальной окраски трипановым синим необходимо снять клетки с культивирования, что приводит к их потере и, следовательно, к необходимости дополнительной закладки клеточного материала.

Для оценки пролиферативной активности клеток рассчитывали прирост клеточной массы в процессе культивирования. Прирост клеточной массы в процессе культивирования к 5-м суткам составил 135×10^6 против 40×10^6 клеток, засеянных во флакон. Пролиферативную активность культивируемых эмбриональных клеток печени оценивали по митотическому индексу (табл. 1).

Таблица 1

Динамика митотического индекса (МИ) в культуре эмбриональных клеток печени (медиана, квартили)

МИ	24 часа	48 часов	72 часа	96 часов	120 часов	144 часа
Индекс пролиферативной активности	0,01 (0,01–0,01) (n=6)	0,12* (0,09–0,2) (n=6)	0,26* (0,1–0,3) (n=6)	0,39* (0,3–0,5) (n=6)	0,65* (0,6–0,7) (n=6)	0,36 (0,1–0,4) (n=6)

Примечание: * – значимость различий определена по сравнению с МИ на 1-е сутки по критерию Манна-Уитни.

Максимальный уровень пролиферативной активности клеток печени был выявлен на 5-е сутки культивирования. Следует отметить снижение митотического индекса к шестым суткам.

Для оценки функциональной активности клеток печени в культуре нами был оценен уровень альбумина в среде культивирования. Этот показатель был неизменным в динамике наблюдения: в первые сутки культивирования уровень альбумина составил 8,0 (6,5–9,0) г/л, на 5-е сутки – 8,7 (6,2–10,0) г/л. К недостаткам этого способа оценки жизнеспособности культивируемых клеток печени следует отнести недостаточную точность, так как функционально активные гепатоциты синтезируют и выделяют альбумин в среду культивирования, а в тоже время альбумин является необходимым компонентом среды для культивирования клеток. Следовательно, сложно отделить количество синтезированного альбумина от внесенного.

Предложенный 3-ий способ оценки основан на том, что в динамике определяли содержание регуляторного пептида HGF в среде культивирования, по которому и судили о пролиферативной активности культивируемых клеток. При достижении наибольшей концентрации регуляторного пептида HGF в среде культивирования жизнеспособность эмбриональных клеток печени оценивали как высокую и считали готовность клеток к трансплантации максимальной.

Определение содержания регуляторного пептида HGF в динамике дало возможность установить состояние клеточной культуры и выявить пик пролиферативной активности.

Нами установлено, что определение содержания HGF в среде культивирования позволяет оценить жизнеспособность клеток в процессе роста, т.е. без снятия клеток с культивирования можно установить высокую готовность клеток к трансплантации.

При изменении условий культивирования происходит замедление процессов пролиферативной активности культивируемых клеток, что требует удлинения сроков культивирования. Определение HGF в среде культивирования в динамике, предложенное нами, позволяет независимо от календарного срока культивирования выявить максимум пролиферативной активности эмбриональных клеток печени и, тем самым, обеспечить оптимальную пригодность клеточного материала к трансплантации. При оценке жизнеспособности культивируемых эмбриональных клеток печени по предлагаемому способу было выявлено, что содержание

HGF менялось в динамике исследования:

- среда после центрифугирования клеток (супернатант) – 0,66 (0,47–1,02) нг/мл;
- среда культивирования через 2-е суток – 14,3 (13–15,6) нг/мл;
- среда культивирования через 5 суток – 46,8 (38,4–50) нг/мл;
- среда культивирования через 6 суток – 31,2 (26,8–34) нг/мл.

Из приведенных данных следует, что на 5-е сутки культивирования содержание HGF было максимальным. Выявлено статистически значимое увеличение количества регуляторного пептида на 5-е сутки до 46,8 (38,4–50,0) нг/мл против 14,3 (13–15,6) нг/мл на 2-е сутки ($p_u = 0,003$).

Для доказательства связи уровня HGF и показателя митотического индекса, характеризующего пролиферативную активность культивируемых клеток, был проведен корреляционный анализ. Выявлена положи-

тельная корреляционная связь: коэффициент корреляции Кендала составил $t_b=1,0$, $p=0,042$. Это служит доказательством того, что содержание регуляторного пептида HGF в среде культивации свидетельствует об уровне пролиферативной активности и не требует расчета МИ.

Таким образом, нами установлено, что при культивировании полученные клетки вырабатывают фактор роста гепатоцитов с максимальной концентрацией на 5-е сутки и увеличением в 3,5 раза по сравнению с начальной концентрацией, что по времени совпадает с пиком митотической активности. Выявлена положительная корреляция между концентрацией HGF и митотической активностью. Предложенный способ оценки жизнеспособности культивируемых клеток печени позволяет точно установить сроки максимальной готовности их к трансплантации. Способ также позволяет стандартизировать клетки по содержанию регуляторного пептида HGF в среде культивации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арбошкин В.А., Лепехова С.А., Гольдберг О.А., Кравченко А.А. Трансплантация островков Лангерганса для профилактики пострезекционной гипергликемии в эксперименте // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2010. – №6 (76) ч.1. – С.153–155.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
3. Лепехова С.А., Анарцин К.А., Зарицкая Л.В. Влияние ксенотрансплантации культуры клеток печени на изменения неспецифической резистентности организма при остром токсическом повреждении печени // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2009. – №7. – С.101–104.
4. Соловьев В.В. Разработка биореактора для системы «биологическая искусственная печень»: Дис. ... канд. биол. наук. – Пушино, 2001. – 207 с.
5. Старке Г. Практическая вирусология. – Пер. с нем. –

М.: Колос, 1970. – 352 с.

6. Фреши Р. Культура животных клеток. Методы. – Пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 333 с.
7. Berry M.N., Friend D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study // J. Cell Biol. – 1969. – Vol. 43. – P.506–520.
8. Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. Liver cell culture techniques // Methods Mol Biol. – 2009. – Vol. 481. – P.35–46.
9. Liu K.X., et al. Characterization of the enhancing effect of protamine on the proliferative activity of hepatocyte growth factor in rat hepatocytes // Pharm Res. – 2009. – Vol. 26. №4. – P.1012–1021.
10. Shikanai M., et al. A novel method of mouse ex utero transplantation of hepatic progenitor cells into the fetal liver // Biochem Biophys Res Commun. – 2009. – Vol. 381. №2. – P.276–282.
11. Weber A., et al. Hepatocyte transplantation in animal models // Liver Transpl. – 2009. – Vol. 15. №1. – P.7–14.

Информация об авторах: Лепехова Светлана Александровна – заведующая отделом, д.б.н., 664079 Иркутск,

Юбилейный, 100, а/я 23, ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН, тел. (3952) 407666, e-mail: lepekhova_sa@mail.ru;

Зарицкая Лариса Васильевна – заведующая лабораторным отделом ЦНИЛ, к.б.н.; Каргин Александр Германович – м.н.с.;

Батунова Елена Владимировна – м.н.с.; Гольдберг Олег Аронович – заведующий лабораторией патоморфологии, к.м.н.;

Коваль Елена Владимировна – м.н.с.; Постовая Ольга Николаевна – м.н.с.

© ГУС А.И., БАЧУРИНА С.М., СЕМЕНДЯЕВ А.А., ФЛОРЕНЦОВ В.В., ЧЕРЕПАНОВА М.А. – 2012

УДК: 618. 1/616

ЛЕЧЕНИЕ ТАЗОВОЙ НЕВРАЛГИИ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПРИДАТКОВ МАТКИ

Александр Иосифович Гус¹, Светлана Михайловна Бачурина², Андрей Александрович Семендяев³,

Владимир Вадимович Флоренцов³, Мария Андреевна Черепанова⁴

(¹Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, директор – акад. РАМН, д.м.н., проф. Г.Т. Сухих, отделение функциональных методов исследования, зав. – д.м.н., проф. А.И. Гус;

²Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, ректор – д.м.н., проф. В.В. Шпрах, кафедра семейной медицины, зав. – д.м.н., проф. Л.В. Меньшикова; ³Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра акушерства и гинекологии с курсом детской и подростковой гинекологии, зав. – д.м.н., проф. В.В. Флоренцов; ⁴Российский университет дружбы народов, ректор – акад. РАО, д.м.н., проф. В.М. Филиппов, кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии, зав. – д.м.н., проф. В.Е. Радзинский)

Резюме. Представлены сравнительные результаты дифференцированного лечения 180 женщин с синдромом тазовой боли, обусловленной хроническими воспалительными заболеваниями придатков матки. Использован новый метод лечения тазовой невралгии – пресакральная нейроплегия и традиционная терапия заболевания. Все больные до и после лечения были протестированы с применением опросника Мак-Гилла, визуально-аналоговой, словесно-рейтинговой и линейной цифровой шкалы. Путем анкетирования оценено состояние «Качества жизни». В результате проведенного исследования было установлено преимущество применения в лечении указанных больных комбинации пресакральной нейроплегии в сочетании с противорецидивной терапией, позволявших добиться длительной (более 2,5 лет) ремиссии тазовой невралгии.

Ключевые слова: тазовая боль, хронические воспалительные заболевания придатков матки, пресакральная нейроплегия.