

2. FLT3 and NPM1 Mutations in Myelodysplastic Syndromes: Frequency and Potential Value for Predicting Progression to Acute Myeloid Leukemia / A. Bains [et al.] // American Journal of Clinical Pathology. — 2011. — Vol. 135, № 1. — P. 62–69.
3. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease : Presented in part at the 42nd annual meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 3569) / S. Schnittger [et al.] // Blood. — 2002. — Vol. 100, № 1. — P. 59–66.
4. Бавыкин, А. С. FLT3-тирозинкиназа при острых нелимфоцитарных лейкозах / А. С. Бавыкин, М. А. Волкова // Онкогематология. — 2006. — № 1–2. — С. 15–24.
5. Fms Like Tyrosine Kinase (FLT3) and Nucleophosmin 1 (NPM1) Mutations in De Novo Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia (AML) / N. R. Dunna [et al.] // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. — 2010. — Vol. 11. — P. 1811–1816.
6. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) / C. Thiede [et al.] // Blood. — 2001. — Vol. 107, № 10. — P. 4011–4020.
7. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance / R. G. W. Verhaak [et al.] // Blood. — 2005. — Vol. 106, № 12. — P. 3747–3754.
8. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein 1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias / Gombart [et al.] // Blood. — 2002. — Vol. 99, № 4. — P. 1332–1340.
9. Characterization of CEBPA Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Most Patients with CEBPA Mutations Have Biallelic Mutations and Show a Distinct Immunophenotype of the Leukemic Cells / Lin [et al.] // Clinical Cancer Research. — 2005. — Vol. 11. — P. 1372–1379.
10. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML / Doorn-Khosrovani [et al.] // The Hematology Journal. — 2004. — № 4. — P. 31–41.
11. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukaemia / Seifert [et al.] // Leukemia advance online publication, 8 January 2009. — doi:10.1038/leu.2008.375. PMID: 19151774.
12. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia / Nakano [et al.] // Eur J. Haematol. — 2000. — Vol. 65. — P. 23–31.

Поступила 19.08.2013

УДК 616.36: 611.08

## ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ

А. Г. Скуратов, Д. Р. Петренев

Гомельский государственный медицинский университет

**Цель:** изучить теоретические основы и провести экспериментальное обоснование эффективности выделения изолированных гепатоцитов методом ферментативной перфузии печени.

**Материалы и методы.** Крысы линии Вистар массой 200 г, выделение гепатоцитов методом ферментативной перфузии печени, световая микроскопия, оценка функциональной способности клеток синтезировать и накапливать гликоген.

**Результаты.** Показана высокая эффективность метода адаптированной 2-стадийной ферментативной перфузии печени для выделения изолированных гепатоцитов. Получена культура жизнеспособных гепатоцитов с сохраненными морфологическими и функциональными свойствами.

**Ключевые слова:** ферментативная перфузия печени, изолированные гепатоциты.

## ISOLATION OF HEPATOCYTES

A. G. Skuratov, D. R. Petreniov

Gomel State Medical University

**Objective:** to study the theoretical basis and give the experimental validation of the efficiency of hepatocyte isolation by the method of enzymatic perfusion of the liver.

**Material and methods.** Wistar rats at a mass of 200 g, isolation of hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver, light microscopy, assessment of functional cell capacity to synthesize and accumulate glycogen.

**Results.** The article shows the high efficiency of the method of the 2-step adapted enzymatic perfusion of the liver to isolate hepatocytes. The culture of viable hepatocytes with preserved morphological and functional properties was obtained.

**Key words:** enzymatic perfusion of the liver, isolated hepatocytes.

### Введение

Использование изолированных гепатоцитов является прогрессивной технологией, используемой в современной биохимии, клеточной биологии, фармакологии и токсикологии для изучения особенностей протекания метаболических процессов, жизнедеятельности и функциональной активности клеток, а также оценки фармакологического (токсического)

действия различных факторов химической и физической природы и экспериментального (доклинического) изучения эффективности гепатопротективных препаратов [1].

Первичные гепатоциты стали одними из первых типов клеток, использованных для клинических целей — клеточной терапии больных с врожденными и приобретенными повреждениями печени [2, 3, 4]. Однако по

сравнению с клетками-предшественниками и стволовыми клетками культуры первичных гепатоцитов обладают очень ограниченной способностью к делению, что является серьезным лимитирующим фактором для их практического использования [5–8]. Хотя гепатоциты в норме не делятся, в стрессовых условиях (острые поражения печени) развивается их гиперплазия [9, 10]. Данное свойство гепатоцитов легло в основу их использования для восстановительной клеточной терапии печени. Кроме того, изолированные гепатоциты могут быть использованы для совместного культивирования со стволовыми клетками при их дифференцировке *in vitro* в гепатоцитарном направлении [11, 12].

Еще в 1925 г. Харрисоном впервые был выделен изолированный гепатоцит, который стал объектом морфологического, функционального и биохимического исследований. В 1943 г. Шнейдер и Поттер вновь сообщили о возможности разделения органа на изолированные клетки, которые способны осуществлять органоспецифические функции. В 1956 г. Соррентино применил гомогенат печени в биоискусственной поддерживающей системе с хорошим результатом, воспроизведенным в 1957 г. Кимото в экспериментах на гепатэктомированных животных. Систематические исследования в этом направлении начались с 1969 г., когда были разработаны методы получения изолированных клеток печени. Первые попытки выделить зрелые гепатоциты из лабораторных животных предприняты Берри и Фрэндом [13] в 1969 г. и в дальнейшем продолжены Сегленом [14] в 1976 г.

В первых исследованиях по получению изолированных гепатоцитов применялся в основном механический способ диспергирования печени. Различные приемы, используемые при этом, сводились к механическому измельчению ткани с последующими инкубацией кусочков в буферной среде, фильтрацией тканевой суспензии и осаждением клеток. Несовершенство этих способов обнаруживалось уже при простой микроскопии: клетки были неправильной формы, имели частично разрушенную плазматическую мембрану и сильно поврежденные микроворсинки. Выход клеток был небольшим (5–10 % от исходного веса печени), а в полученной суспензии имелось много разрушенных клеток, осколков, цитоплазматических частиц. Метаболическая активность этих клеток была нарушена.

Второй этап в истории получения изолированных гепатоцитов (химическое диспергирование печени) связывают с установлением роли ионов кальция в функционировании межклеточных контактов. В связи с этим появились попытки удалить растворимые соли кальция из межклеточного цемента различными хелаторами

(ЭДТА, цитрат, оксалат). Андерсон впервые применил их при перфузии печени, и выход клеток удалось увеличить. С тех пор перфузия печени бескальциевыми и хелатсодержащими растворами или инкубация срезов в них становятся обязательным этапом выделения гепатоцитов.

Однако качество клеток существенным образом не улучшилось. К механическим повреждениям добавились декальцинация и химическое воздействие хелаторов, что приводило к изменениям свойств плазматической мембраны. Клетки, получаемые с помощью химико-механических способов, по-прежнему имели серьезные морфологические нарушения субклеточных структур.

Значительное улучшение структуры и метаболических свойств гепатоцитов было получено лишь после попытки совместить механический, химический и ферментативный способы обработки перфузируемой печени. Переломным моментом в истории выделения гепатоцитов являются работы Говарда с соавторами. Эти исследователи применили для облегчения процесса диспергирования печени коллагеназу и гиалуронидазу. Полученные таким образом клетки обладали сравнительно высоким исходным эндогенным дыханием. До 75 % клеток были жизнеспособны. Однако общее количество клеток в суспензии продолжало оставаться небольшим и составляло около 10 % от всей популяции клеток печени.

Завершающим этапом в истории развития выделения гепатоцитов стали работы Сеглена [14], которому удалось свести до минимума механическое воздействие на ткань печени. В первом варианте способ Сеглена состоял из трех этапов:

- 1) нерезикулярной перфузии печени с использованием бескальциевой сбалансированной среды или среды, содержащей хелатор кальция — ЭДТА, целью которой является удаление  $Ca_2^+$ -зависимого фактора, влияющего на адгезионные свойства клеток печени;

- 2) рецикулярной перфузии печени бескальциевым раствором, содержащим коллагеназу (и гиалуронидазу) с целью ферментативного разрушения межклеточных контактов;

- 3) введения кальция в ферментсодержащий перфузионный раствор с целью активации коллагеназы.

В своих последних работах Сеглен применял уже только 2 этапа — 1-й и 3-й.

Гепатоциты, получаемые ферментативным способом, сохраняют интактность плазматической мембраны: количество окрашенных трипановым синим клеток (нежизнеспособных) составляет, по данным разных авторов, 5–20 %. Ультратонкая структура клеток не нарушается, эндоплазматический ретикулум и митохондрии сохраняют интактность. Метаболические свойства таких клеток мало отличаются от нативной печени.

Таким образом, была завершена длительная методическая работа, позволившая экспериментаторам получить модель для изучения самых различных метаболических процессов в условиях *in vitro*.

### **Цель**

Провести экспериментальное исследование эффективности выделения изолированных гепатоцитов крысы по способу Сеглена, адаптированному в нашей лаборатории.

### **Выделение гепатоцитов**

Для эксперимента использовали крысы линии Вистар массой 200 г. Гепатоциты были изолированы с помощью 2-стадийной ферментативной перфузии печени. Для этого брюшную полость наркотизированного животного вскрывали, канюлировали портальную вену, в которую вводили 1 мл изотонического раствора с 500 ед гепарином. Затем вскрывали нижнюю полую вену и проводили перфузию безкальциевым буферным раствором (9 г/л NaCl, 10 mM HEPES, pH = 7.4) в течение 7 минут при температуре 37,0 °C со скоростью потока не более 30 мл в минуту. Скорость потока создавали перистальтическим насосом. Далее продолжали перфузию в течение 5 минут раствором, содержащим 0,07 % коллагеназу II (Sigma, США) при тех же условиях. После чего печень экстирпировали и переносили в стерильную чашку Петри с холодным раствором Хенкса. С помощью скальпеля и пинцета разрушали капсулу и диспергировали паренхиму. Клеточную суспензию и фрагменты ткани печени пропускали через фильтр (200 μm) и дважды отмывали холодным раствором Хенкса (300 г, 5 мин.). Клеточную суспензию центрифугировали на градиенте плотности Percoll (Sigma, США) для отделения гепатоцитов от примеси эритроцитов и дебриса. Для этого смешивали равные объемы суспензии клеток и 90 % перколла, забуференного 20 mM HEPES, центрифугировали при 400 g в течение 15 мин. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева и ресуспензировали в полной среде для достижения концентрации  $4 \times 10^5$  кл/мл. Жизнеспособность клеток оценивали путем нативного окрашивания трипановым синим. Проводили световую микроскопию клеточной суспензии. Оценивали способность клеток синтезировать гликоген путем проведения ШИК-реакции.

### **Результаты и обсуждение**

**Перфузия печени.** Выбор адекватных режимов и продолжительности перфузии являются одними из определяющих факторов для получения качественных гепатоцитов. Целью первого этапа являются отмывка печени от крови и частичное ослабление межклеточных контактов путем удаления кальция при перфузии бескальциевого раствора.

Скорость потока не должна быть слишком высокой, иначе наступает патологическое набухание печени и разрушение клеток, особенно в бескальциевой среде. Стабильность скорости потока перфузата имеет большое значение для обеспечения равномерного снабжения всех участков печени коллагеназой. Использование нами перистальтического насоса способствовало поддержанию стабильной скорости потока раствора во время перфузии.

При проведении перфузии на первом этапе мы наблюдали быстрое, равномерное по всей поверхности осветление печени, что свидетельствовало о правильном ходе отмывки. В редких случаях появлялись мозаичные пятна бурого-коричневого цвета, из которых не была удалена кровь при потоке перфузата, что является предпосылками для неадекватного их снабжения энзимом на втором этапе перфузии. При этой ситуации проводили мягкий массаж этих зон. Объем перфузата, используемый на первом этапе, составил 250 мл.

На втором этапе перфузию печени проводили раствором, содержащим 0,07 % коллагеназу II с целью окончательного разрушения межклеточного цемента. Имело место небольшое набухание печени при оптимальном режиме перфузии (при скорости 25–35 мл/мин и давлении 10–20 мм водного столба). Продолжительность второго этапа перфузии определяется активностью коллагеназы. Через 3–5 мин. после перфузии печени раствором коллагеназы поверхность печени приобретала специфический вид: становилась заметна сетчатая микроструктура ткани (рисунок 1). При мягком надавливании кончиком пинцета на поверхность печени появлялся медленно исчезающий след. Еще через 4–5 мин. подобная манипуляция приводила к появлению рваного отверстия, из которого происходило вытекание перфузата. Также истончались острые края отдельных долек, появлялась их прозрачность. Это являлось признаком завершения диспергирования ткани печени и ее готовности к механическому разделению клеток.

Затем печень экстирпировали и осторожно переносили в чашку Петри для механического диспергирования и отделения гепатоцитов от посторонних примесей (рисунок 2). В результате очистки суспензии происходило отделение паренхиматозных клеток от других типов клеток, клеточных агрегатов, кусочков соединительной ткани и сосудов, а также субклеточных осколков.

При проведении световой микроскопии взвеси клеток гепатоциты в первичной суспензии имели неправильную полигональную форму, что отражает их истинную геометрию. Значительная часть гепатоцитов была представлена диплоидными и даже полиплоидными клетками, они имели глубокую раздельную борозду на поверхности (рисунок 3).

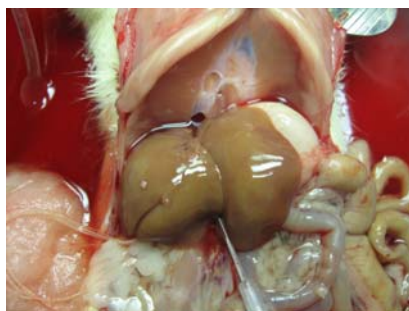
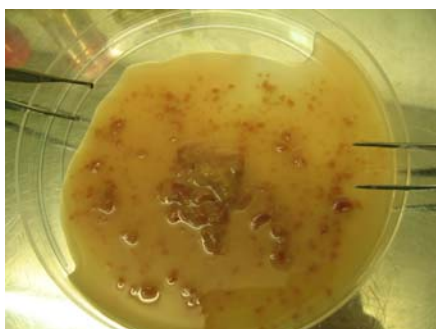


Рисунок 1 — Перфузия печени раствором коллагеназы через канюлированную воротную вену

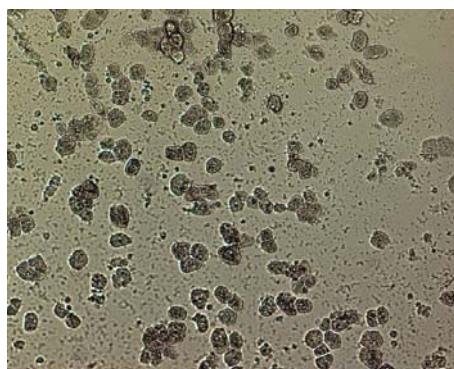


А



Б

Рисунок 2 — А: Фрагментирование и диспергирование паренхимы печени; Б: Сепарация и суспензирование гепатоцитов



А



Б

Рисунок 3 — А: Световая микроскопия культуры гепатоцитов (увеличение x40); Б: Двухядерные гепатоциты (x100)

В процессе инкубации гепатоциты становились выпуклокруглыми. Конечная суспензия клеток использовалась для дальнейших экспериментов. Масса оставшихся в ней клеток соответствовала примерно 30 % от начального сырого веса ткани. Непаренхиматозные клетки составили 1–2 %. При окрашивании трипановым синим нами получено соотношение жизнеспособных гепатоцитов к разрушенным как 9:1 (90 % клеток не окрасились трипановым синим).

С целью изучения метаболических процессов в гепатоцитах оценивали их способность синтезировать и накапливать гликоген. Провели специфическое окрашивание на гликоген (ШИК-реакция). Мелкие гранулы гликогена, находящиеся в цитоплазме гепатоцитов, давали розово-красное окрашивание.

### Заключение

Таким образом, внедрение и адаптация к условиям лаборатории способа Сеглена по выделению изолированных гепатоцитов позволили получить культуру жизнеспособных клеток, которые могут быть использованы для дальнейших экспериментов в области клеточных биотехнологий, клеточной трансплантации, а также для изучения гепатотоксических и протективных свойств различных внешних факторов, химических соединений и новых лекарственных препаратов.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Fitzpatrick, E. Human hepatocyte transplantation: state of the art / E. Fitzpatrick, R. R. Mitry, A. Dhawan // J. Intern. Med. — 2009. — Vol. 266. — P. 339–357.
2. Применение изолированных клеток печени с целью лечения больных с печеночной недостаточностью различного ге-

неза / И. И. Шиманко [и др.] // Проблемы криобиологии. — 1995. — № 2. — С. 49–52.

3. Шумаков, В. И. Лечение тяжелой печеночной недостаточности перфузией крови больного через взвесь криоконсервированных гепатоцитов / В. И. Шумаков, В. С. Арзуманов, Н. А. Онищенко // Хирургия. — 1990. — № 2. — С. 113–116.

4. Fausto, N. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation / N. Fausto, J. S. Campbell // Mech. Dev. — 2003. — Vol. 120. — P. 117–130.

5. Cell-based therapy for liver diseases / C. Di Campli [et al.] // 7 Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. — 2003. — Vol. 7. — P. 41–44.

6. Lee, L. A. Advances in hepatocyte transplantation: a myth becomes reality / L. A. Lee // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 108. — P. 367–369.

7. Malhi, H. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges / H. Malhi, S. Gupta // J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. — 2001. — Vol. 8. — P. 40–50.

8. Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation / K. Yamanouchi [et al.] // Hepatology. — 2009. — Vol. 49. — P. 258.

9. Katoonizadeh, A. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study / A. Katoonizadeh // Liver Int. — 2006. — Vol. 26. — P. 1225–1233.

10. Fausto, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells / N. Fausto // Hepatology. — 2004. — Vol. 39. — P. 1477–1487.

11. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells / C. Lange [et al.] // World J Gastroenterol. — 2006. — Vol. 12. — P. 2394–2397.

12. Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells / I. Avital [et al.] // Bioch. Biophys. Res. Commun. — 2001. — Vol. 288. — P. 156–164.

13. Berry, M. N. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study / M. N. Berry, D. S. Friend // J. Cell. Biol. — 1969. — Vol. 43. — P. 506–520.

14. Seglen, P. O. Preparation of rat liver cells / P. O. Seglen // Methods. Cell. Biol. — 1976. — Vol. 13. — P. 29–83.

Поступила 20.11.2013

## ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ, ГИГИЕНА

УДК 616.1:614.212

### ЭКСПЕРТНАЯ ОЦЕНКА ДИСПАНСЕРИЗАЦИИ ПАЦИЕНТОВ ТРУДОСПОСОБНОГО ВОЗРАСТА С БОЛЕЗНЯМИ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ПЕРВИЧНОГО ЗВЕНА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Я. И. Будник, А. Л. Лопатина, И. А. Чешик, Т. М. Шаршакова

Гомельский государственный медицинский университет

**Цель:** провести экспертную оценку диспансерного наблюдения пациентов трудоспособного возраста с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца на терапевтическом участке.

**Материал и методы.** Экспертная оценка диспансерного наблюдения пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца проводилась по карте-схеме, разработанной авторами в соответствии с Инструкцией о порядке организации диспансерного наблюдения взрослого населения Республики Беларусь, утвержденной Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 12.10.2007 г. № 92 (в редакции от 01.06.2011 г. № 51).

Необходимые сведения выкопировывались из формы N 025/у-07 «Медицинская карта амбулаторного больного» в экспертную карту-схему и переносились в электронную базу данных. Всего проанализирована медицинская документация 300 пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца, которые находились на амбулаторном наблюдении в одном из филиалов ГУЗ «Гомельская центральная городская поликлиника» (200 пациентов) и в поликлиническом отделении УЗ «Петриковская центральная районная больница» (100 пациентов).

Статистический анализ результатов исследования проводился на персональном компьютере с использованием программы «Microsoft Excel», 2011.

**Результаты.** В существующей системе организации медицинской помощи в первичном звене здравоохранения пациентам трудоспособного возраста с болезнями системы кровообращения (БСК) амбулаторному этапу уделяется особое внимание. Именно в поликлинике осуществляется первичная диагностика БСК, выявляются факторы риска, проводится диспансеризация и реабилитация пациентов. В статье представлены результаты экспертной оценки диспансерного наблюдения пациентов трудоспособного возраста с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца на терапевтическом участке.

**Заключение.** Результаты экспертизы качества диспансерного наблюдения пациентов с БСК на терапевтическом участке свидетельствуют о недостаточной работе с этой группой пациентов.

**Ключевые слова:** болезни системы кровообращения, диспансеризация, динамическое наблюдение, факторы риска.

### EXPERT ASSESSMENT OF MEDICAL OBSERVATION OF ABLE-BODIED PATIENTS SUFFERING FROM BLOOD CIRCULATION DISEASES IN PRIMARY HEALTH CARE

Ya. I. Budnik, A. L. Lopatina, I. A. Cheshik, T. M. Sharshakova

Gomel State Medical University

**Objective:** to give an expert assessment of the medical observation of able-bodied patients with arterial hypertension and ischemic heart disease in one district covered by therapeutic care.