

2. Инфекционный эндокардит сопровождается активацией тканевого распада, который способствует формированию компенсированной эндогенной интоксикации;

3. В результате нарушения иммунологической реактивности организма при инфекционном эндокардите частыми являются инфекционно-воспалительные осложнения.

Литература:

1. Виноградова Т.Л. Инфекционный эндокардит: современное течение / Т.Л. Виноградова // Клиницист. – 2011. – №3. – С. 4-9.

2. Мустафина Ж.Г. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией / Ж.Г. Мустафина, Ю.С. Крамаренко, В.Ю. Кобцева // Клин. лаб. диагностика. – 1999. – №5. – С. 47-48.

3. Que Y.A. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in Staphylococcus aureus experimental endocarditis / Y.A. Que, J.A. Haefliger, L. Piroth, P. François, E. Widmer, J.M. Entenza, B. Sinha, M. Herrmann, P. Francioli, P. Vaudaux, P. Moreillon // J. Exp. Med. – 2005. – Vol. 201(10). – P. 1627-1635.

4. Thiene G. Pathology and pathogenesis of infective endocarditis in native heart valves / G. Thiene, C. Basso // Cardiovasc. Pathol. – 2006. – Vol. 15. – P. 256-263.

УДК 576.538

**А.Д. Балданшириева, В.В. Мелехин, Н.В. Дорофеева, О.Г. Макеев
СУБСТРАТНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТОВ**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий генной и клеточной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина
Екатеринбург, Российская Федерация

**A.D. Baldanshirieva, V.V. Melekhin, N.V. Dorofeeva, O.G. Makeev
SUBSTRATE REGULATION OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF
CULTURED FIBROBLASTS
DEPARTMENT OF MEDICAL BIOLOGY AND GENETICS**

Ural statement medical university
Institute of medical cell technologies
Ural federal university

Ekaterinburg, Russian Federation

Контактный e-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В данной статье рассмотрена зависимость пролиферативной активности клеточной популяции фибробластов от особенностей смены среды. Выявлены оптимальные соотношения объема сменяемой среды к кондиционной среде для обычного ведения культуры, ее разгона и торможения. Результатом работы стала разработка алгоритма по оптимизации режима смены среды.

Annotation. The article describes the dependence between proliferative activity of cell line of fibroblasts and characteristics of the environment change. It was shown the optimal ratio of the volume of conditioned medium to be replace.

Ключевые слова: фибробласты, кривая роста, смена среды.

Keywords: the culture of human fibroblasts, growth curve.

Неоднократно было замечено, что при полной замене среды на свежую в монослойной культуре происходит замедление роста клеток. При этом предотвратить означенное торможение субстратным дообогащением или введением в среду специфических стимуляторов (факторов роста) не удастся. В настоящее время не существует единого алгоритма смены среды, многие исследователи при проведении данных манипуляций полагаются на свой опыт. Для обучающихся важно знание особенностей соотношения сменяемой и кондиционной сред для правильного ведения культуры с учетом особенностей клеточной линии.

Цель исследования – разработка алгоритма смены среды в культуре клеток для оптимизации клеточного роста.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на клетках фибробластического дифферона человека. Первичная культура была получена по оригинальной методике [2]. Для исследования был использован эксплантат кожи 50-ти летнего донора-мужчины. Источником послужил фрагмент ткани передней брюшной стенки, удаленный при иссечении грыжи и подлежащий утилизации.

Культивирование производили при условиях 37⁰C, концентрации CO₂ 5% и влажности 95% в среде DMEM/Ham F-12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки в инкубаторе (Sanyo, Япония).

Ростовые характеристики определяли методом построения кривых роста и определения периода удвоения клеточной популяции. Отдельные временные точки не всегда достаточны для мониторинга роста культуры, тем не менее кривые роста остаются важнейшим подходом для оценки клеточного роста. Для построения кривой роста был проведен посев клеток в культуральные чашки Петри (35 мм). Были определены 5 опытных групп, в которых производили смену среды на разный объем в зависимости от конfluence культуры.

Группа № 1 обозначена контрольной, смену среды в ней производили по общепринятой методике (объем сменяемой среды в процентах равен конfluence культуры) [3]. В группах №2 и №3 процент сменяемой среды увеличивали на 10% и 20% по сравнению с контрольной группой. В группах №4 и №5 объем сменяемой среды уменьшали на 10% и 20% по сравнению с контролем. Каждые 2 дня осуществляли микроскопический контроль за состоянием культуры и подсчет клеток в камере Фукса-Розенталя в 10-кратной повторности.

Время удвоения популяции рассчитывалось по формуле [1]:

$$td = \frac{2 \cdot \Delta t \cdot x_0}{x}$$

где td – время удвоения популяции, x_0 – количество клеток в начале интервала времени, x – количество клеток в конце интервала времени, Δt – интервал времени.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы Excel. Для оценки значимости различий между группами использовали критерий Манна-Уитни. При вероятности ошибки $p < 0,05$ различия между средними значениями считались достоверными.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе ведения клеточной культуры были замечены некоторые тенденции: при изменении объема среды, предназначенной для смены (увеличении или уменьшении) – пролиферативная активность клеток изменялась. При увеличении объема сменяемой среды при последующем просмотре культуры конfluence была выше, чем при уменьшении объема. Данное наблюдение нашло подтверждение.

Так, время удвоения популяции в log-фазу для группы № 1 занимает 70 час, для групп № 2 и 3 – 59 и 60 час, для групп № 4 и 5 – 112 и 114 час. Означенное подтверждает, что увеличение объема сменяемой среды до 75% способствует активации клеточного деления.

Рост клеточной культуры описывается S-образной кривой (рис. 1). Из графика следует, что концентрация клеток на единицу площади в группах №4 и № 5 существенно ниже, чем в группах №1, 2 и 3. Клетки первой, второй и третьей групп вышли на фазу плато на 8 сутки, клетки четвертой и пятой групп за время проведения опыта не достигли этой фазы. Это свидетельствует о снижении скорости деления клеток в клеточных культурах под номером 4 и 5 [3].

По мере роста клеточных культур происходит истощение среды и накопление в ней различных клеточных метаболитов. При замене среды на больший процент удаляется и большее количество клеточного «мусора», что может влиять на увеличение скорости деления клеток, так как при ежедневном обновлении среды клетки будут продолжать делиться, несмотря на высокую концентрацию клеток на единицу площади [3]. При этом смена всего объема среды не будет способствовать увеличению пролиферативной активности, так

как некоторые вещества, образующиеся в результате клеточного метаболизма (белок фибронектин), способствуют росту культур, адгезии клеток к поверхности субстрата [3].

На основании полученных данных был выведен алгоритм смены среды в зависимости от конfluence клеточной культуры (рис. 2). Смену среды по средней кривой рекомендуется проводить при плановом ведении культуры клеток. При этом объем сменной среды будет равен конfluence клеточной культуры.

Верхнюю кривую для смены среды рекомендуется использовать при разгоне культуры, например, при получении первичной культуры клеток. При высокой клеточной плотности объем кондиционной среды должен быть снижен, так как образуется большое количество метаболитов, которые необходимо удалить, заменив новой средой с факторами роста, способствующими активации клеточного деления.

Если существует необходимость торможения клеточной культуры, например, при подготовке к криоконсервации клеток, возможно использование третьей кривой предлагаемого алгоритма. Смену среды рекомендуется начинать при конfluence 50%, при которой среда будет значительно истощена, а пролиферативная активность клеток снижена. Объем сменяемой среды должен быть меньше объема кондиционной среды при низкой конfluence клеточной популяции.

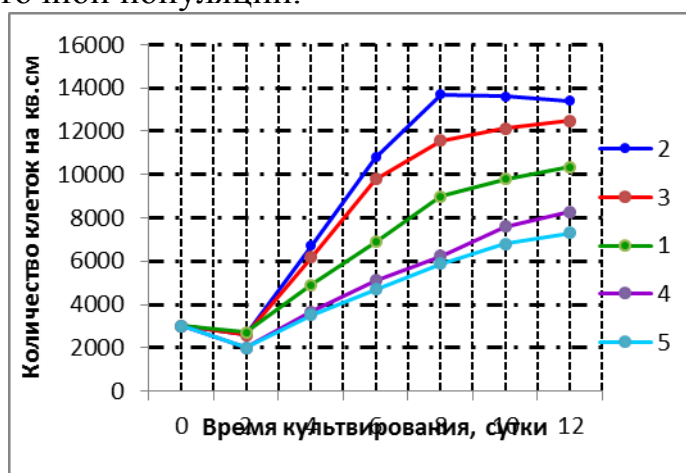


Рис.1. Кривые роста культур фибробластов при смене среды на разный объем

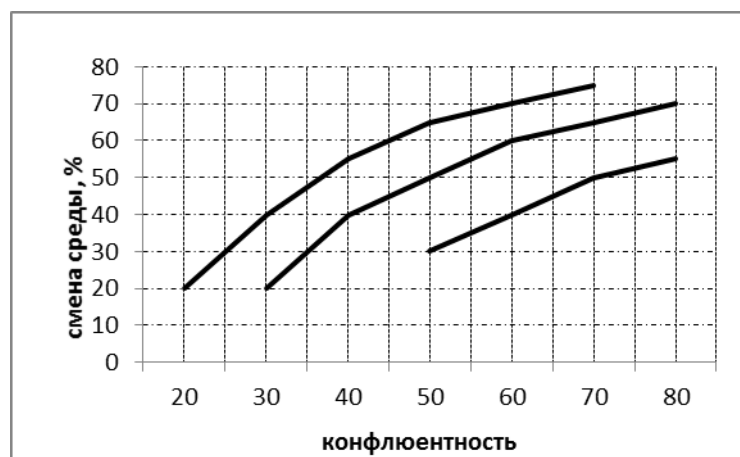


Рис. 2. Зависимость объема заменяемой смены среды от конфлюентности культуры

Выводы:

1. Разработан алгоритм смены среды в зависимости от конфлюентности клеточной культуры, который может быть использован как при обычном ведении клеточной культуры, так и при проведении различных исследований;
2. Соотношение субстрат/метаболиты оказывает значительное влияние на активность клеточного деления. Накопление метаболитов отрицательно влияет на пролиферативную активность, тем не менее их полное исключение также дает отрицательный результат. Для разгона культуры необходимо увеличивать количество субстрата, т.е. увеличивать количество новой среды. При торможении и плановом ведении клеточной культуры объем сменяемой среды следует минимизировать.

Литература:

1. Домнина А.П. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации / А.П. Домнина, И.И. Фридлянская, В.И. Земелько, Н.А. Пуговкина, З.В. Ковалева, В.В. Зенин, Т.М. Гринчук, Н.Н. Никольский // Цитология. – 2013. – Том 55, № 1. – С. 69-74.
2. Макеев О. Г., Улыбин А. И., Зубанов П. С. Патент No 2345781 «Способ получения культуры клеток кожи» // Бюллетень изобретений №4, 10.02.2009.
3. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство // пер. с 5-го англ. Изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 691с.

УДК 616.36-008.52

Н.Н. Баязитова, А.А. Красноперова, И.В. Гаврилов, В.А. Лукаш
ДИНАМИКА БИЛИРУБИНА ПРИ ОПЕРАТИВНОМ ЛЕЧЕНИИ
БОЛЬНЫХ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ

Кафедра биохимии

Уральский государственный медицинский университет