

УДК 616.5-001.17-089-031:616.71-018.46-089.843

М.Ф. Расулов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ЛЕЧЕНИИ ОЖГОВЫХ РАН

НИИ трансплантологии и искусственных органов
МЗ РФ (г. Москва)

Ключевые слова: костный мозг, мезенхимальные стволовые клетки, фибробласты, ожог.

Методы клеточной биотехнологии начинают все шире использоваться при лечении тяжелых повреждений различных органов. Особое значение получает применение этих методов при лечении обширных поверхностных и глубоких ожогов [4, 5, 10, 11]. Ранее было показано, что трансплантация эмбриональных фибробластов (ЭФ) существенно ускоряет заживление ожоговых ран и снижает летальность среди пострадавших [2, 3]. Однако существование этических, правовых и юридических проблем, связанных с использованием эмбрионального донорского материала, заставило нас обратиться к изучению возможности использования аутогенного и алло генного костного мозга, который может служить источником получения мезенхимальных стволовых клеток, способных дифференцироваться в фибробластоподобные мезенхимальные стволовые клетки (ФМСК) [1, 6-9, 13, 14].

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ особенностей регенерации глубоких ожоговых ран под влиянием трансплантации на их поверхность аллогенных и аутогенных ФМСК и ЭФ.

Глубокий термический ожог кожи моделировали на 40 беспородных крысах-самцах массой 300-350 г. Под эфирным наркозом (хирургическая стадия) к коже животных через влажную салфетку прикладывали металлическую пластинку, через которую циркулировала вода, нагретая до 97,7°C. Время экспозиции — 8 сек., площадь пластины — 18-20% от общей поверхности кожи крысы. При указанном режиме достигалось повреждение всех слоев кожи. Животные были разделены на 4 группы по 10 особей в каждой: 1) крысы с трансплантацией аллогенных ФМСК, 2) крысы с трансплантацией аутогенных ФМСК, 3) крысы с трансплантацией аллогенных ЭФ, 4) контрольная группа — спонтанная регенерация.

Суспензию ФМСК и ЭФ наносили на поверхность ожоговой раны с помощью пипетки в количестве 2×10^6 клеток на вторые сутки после моделирования ожога и иссечения образовавшегося некротического струпа. После трансплантации клеток ожоговую поверхность покрывали марлевой салфеткой, смоченной физиологическим раствором с гентамицином. Контроль эффективности клеточной терапии осуще-

ствляли визуально, планиметрическим и морфологическим методами.

Забор клеток костного мозга для получения мезенхимальных стволовых клеток и затем из них — ФМСК проводили у взрослых беспородных крыс под эфирным наркозом. Клетки получали из бедренных костей с промыванием полости кости забуференным физиологическим раствором объемом 0,5 мл с использованием иглы 16G. ЭФ получали из легких 14-17-дневных эмбрионов, взятых у беременных крыс в условиях наркотического сна. ЭФ и клетки костного мозга для получения стволовых элементов предварительно культивировали на чашках Петри при 37°C в инкубаторе в атмосфере с 5%-ным CO₂ и с 95%-ной влажностью. ЭФ культивировали в течение 4-6 суток. Для получения монослоя мезенхимальных стволовых клеток требовалось 14-17 суток. В дальнейшем их сохраняли методом криоконсервации. Для получения ФМСК клетки размораживали и затем культивировали в течение 4 суток, причем количество образующихся ФМСК более чем в 3 раза превосходило количество ЭФ, образующихся в течение того же срока культивирования. Визуальный, планиметрический и гистологический контроль осуществляли на 1, 3, 7, 15 и 30 сутки после трансплантации клеток на ожоговую поверхность. Для морфологического исследования брали биоптаты из зоны ожогового повреждения в указанные сроки и готовили криостатные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Для выявления трансплантированных клеток в ожоговых ранах на этапе культивирования их генетически метили, используя вирусный шатл-вектор на основе рекомбинантного аденовируса пятого типа, несущего Lac-Z ген, который кодирует (3-галактозидазу *K coli*). Живые клетки в различные сроки после трансплантации выявляли иммуногистохимически в криосрезах добавлением субстрата X-Gal, дающего характерное сине-зеленое окрашивание [12, 15].

Статистическую обработку результатов планиметрии ран проводили, используя критерий достоверности Стьюдента.

В результате визуального, планиметрического и гистологического контроля за состоянием ожоговой раны было установлено, что уже на 3 сутки после трансплантации клеток в выделенных группах выявлялись различия в течении раневого процесса. На 7 сутки эта разница становилась отчетливой. Так, у животных 1-й и 2-й групп рана приобретала интенсивную розовую окраску, грануляционная ткань разрасталась на всей ее площади до уровня эпидермиса, а ожоговая поверхность начинала значительно сокращаться в размерах. Благодаря высокой способности аллогенных и аутогенных ФМСК стимулировать рост эпителия и эндотелия сосудов, на 7-8 сутки усиливалась эпителизация с краев раны. Несколько истончалась образовавшаяся на поверхности раны коллагеновая пленка, но она продолжала покрывать всю ожоговую поверхность.

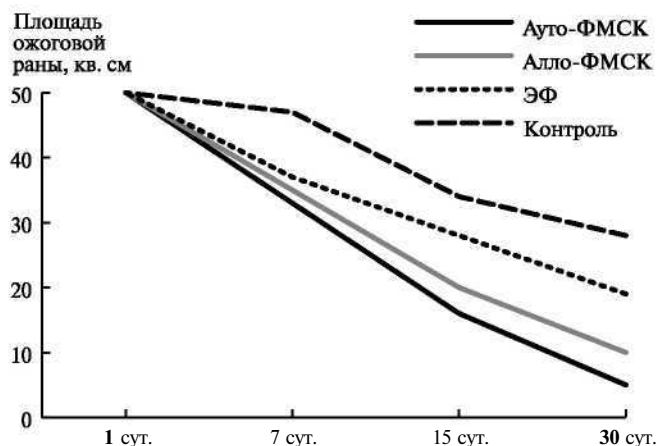


Рис. 1. Динамика уменьшения площади ожоговой раны в зависимости от типа трансплантируемых клеток.

В те же сроки плазморея из раны у животных 3-й группы была выражена больше, чем в 1-й и 2-й группах. Эпителизация краев раны была выражена слабо, а первоначально образовавшаяся коллагеновая пленка практически исчезла.

В контрольной группе на 7-е сутки ожоговая рана представляла собой бледную, изрытую, неживую ткань, покрытую фибрином, плазморея наблюдалась по всей ожоговой поверхности.

На 15-е, но особенно на 30-е сутки, различия в заживлении ран между исследуемыми группами животных становились еще более отчетливыми (рис. 1). Так, в 1-й, 2-й и 3-й группах животных площадь ожоговой поверхности в указанные сроки была значительно меньше, чем в контроле, что указывало на важную роль трансплантированных клеток в регуляции регенерационного процесса ожоговых ран. При сопоставлении скорости заживления ран в зависимости от источника донорского материала было установлено, что в 1-й и 2-й группах процесс регенерации шел достоверно более высокими темпами по сравнению с регенерацией ран в 3-й группе животных. Хотя заживление ожоговых ран во 2-й группе происходило в более ускоренном темпе, чем в 1-й, эти различия были недостоверными.

Гистологически более высокий темп заживления ожоговых ран под влиянием трансплантированных клеток выражался в ускорении смены фаз регенераторного процесса. Сокращались сроки периода клеточной инфильтрации и ускорялся темп формирования грануляционной ткани. Наиболее густая сеть новообразованных сосудов регистрировалась в 1-й и 2-й группах, где были использованы ФМСК, но особенно плотная сеть сосудов была во 2-й группе, где использовались аутогенные клетки. В 3-й группе количество новообразованных сосудов также было достоверно выше по сравнению с контролем, но уступало по плотности сосудистой сети в 1-й и 2-й группах (рис. 1).

При окраске на (3-галактозидазу после трансплантации ФМСК и ЭФ на протяжении всего срока наблюдения на поверхности и в глубине регенерирующих ран трансплантированные клетки сохраняли

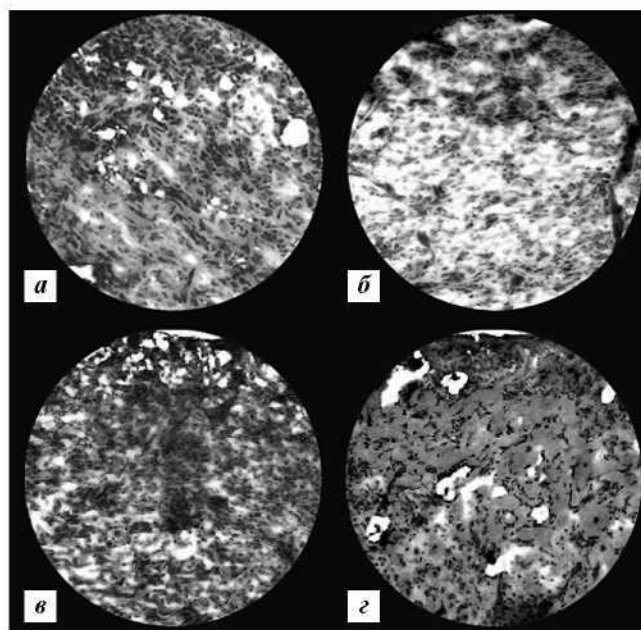


Рис. 2. Микрофотография криостатного среза биоптата ожоговой раны на 15-е сутки после клеточной терапии:

а - после трансплантации аллогенных ФМСК; б - после трансплантации аутогенных ФМСК; в - после трансплантации ЭФ; г - контроль. Окр. гематоксилином и эозином, $\times 200$.

свою жизнеспособность, а это значит, не теряли способности продуцировать факторы, ускоряющие процесс регенерации [4, 5]. Так как ФМСК представляют собой предифференцированные клетки, а ЭФ — дифференцированные, можно предполагать, что более высокий темп регенерации ран при использовании алло- и аутогенных ФМСК обусловлен выделением ими в процессе созревания активных биологических факторов, которые и способствуют более быстрому заживлению ожоговых ран.

Выводы

1. Алло- и аутогенные ФМСК, так же как и ЭФ, ускоряют темп регенерации глубоких ожоговых ран за счет длительного сохранения их жизнедеятельности после трансплантации и продукции в рану биологически активных веществ.

2. Ускорение процесса заживления ран и формирования грануляционной ткани под влиянием трансплантированных клеток зависит от ускорения темпов разрастания сосудистой сети в области ожоговой раны.

3. При выборе клеточного материала предпочтение следует отдавать ФМСК, так как их использование характеризуется более высоким темпом регенерации ожоговых ран, а на этапе подготовки клеточного материала к трансплантации (т.е. на этапе направленного культивирования) отмечается более высокий темп накопления клеточной массы для последующего применения по сравнению с ЭФ.

4. Отсутствие достоверных различий в регенерационной активности алло- и аутоФМСК указывает на возможность использования аллогенных ФМСК для стимуляции ускоренного заживления ожоговых ран.

Литература

1. Расулов М.Ф., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. и др.//Вестн. трансплан. - 2003. - № 3. - С. 78-80.
2. Расулов М.Ф., Хаджибаев А.М., Уразметова М.Д.//Мед. журн. Узбекистана. - 2001. - № 5-6. - С. 87-88.
3. Саидгалин Г.З., Салистый П.В., Панова О.В. и др.//Комбустиология на рубеже веков: Мат. конгресса. — М., 2000. - С. 166.
4. Саркисов Д.С., Алексеев А.А., Глуценко Е.В. и др.//Вестник РАМН. - 1996. - № 6. - С. 6-11.
5. Федоров В.Д., Саркисов Д.С., Алексеев А.А. и др.//Анналы хирургии. — 1996. — № 4. — С. 16.
6. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Расулов М.Ф. и др.//Вестн. хирургии. - 2003. - №4- С. 38-41.
7. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Расулов М.Ф. и др.//Бюл. exper. биол. - 2003. - Т. 136, № 8. - С. 220-223.
8. Шумаков В.И., Расулов М.Ф., Крашенинников М.Е. и др.// Вестн. трансплантол. и искусствен. органов. - 2002. - №4.- С. 7-11.
9. Asahara T., Murohara T., Sullivan A.//Science. — 1997. Vol. 275. - P. 964-967.
10. De Lapp, Dieckman D.K.//J. Invest. Dermat. - 1990. - Vol. 94, No. 6. - P. 817-822.
11. Dedovic Z., Koupilovia I., Suchanek I.//Ann. Burns and Fire Disasters. - 1998. - Vol. 11, No 1. - P. 37-40.
12. Goto H., Shuler F.D., Lamsam C. et al.//J. Bone Joint Surg. Am. - 1999. - Vol. 81, No. 7. - P. 918-925.
13. Gruber R., Mayer C., Schulz W., et. al.//Cytokine. - 2000. - Vol. 12, No. 11. - P. 1630-1638.
14. Seshi B., Kumar S., Sellers D.//Blood Cells, Molecules, and Diseases. - 2000. - Vol. 26, No. 3. - P. 234-246.
15. Teramoto S., Ito H., Ouchi Y.//Thromb. Res. - 1999. - Vol. 93, No. 1. - P. 35-42.

Поступила в редакцию 12.01.04.

APPLICATION OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS AND EMBRYONAL FIBROBLASTS DURING BURN WOUNDS TREATMENT

M.F. Rasulov
Scientific Research Institute of Transplantology and Bioartificial Organs of the Ministry of Public Health of the Russian Federation (Moscow)
Summary — While conducting experiment on rats, the author has inquired into deep burn wounds regeneration in the course of transplantation of allogenic and autogenic fibroblast-like mesenchymal bone marrow stem cells and embryonal fibroblasts onto the burn surface. As is shown, the transplantation lessens cellular infiltration of the wound, as well as accelerates granulation tissue generation. Regeneration processes were well-marked, when using fibroblast-like mesenchymal cells, that is determined by their lesser differentiation, as compared with the embryonal fibroblasts.

Pacific Medical Journal, 2004, No. 1, p. 7-9.

УДК 616.36-089.843

К.С. Тан

ПЕРЕСАДКА ПЕЧЕНИ ОТ ЖИВОГО ДОНОРА

Медицинский центр компании Parkway Group Healthcare Ltd. (Сингапур)

Ключевые слова: пересадка печени, трупная печень, живые доноры.

Успех пересадки печени у пациентов с терминальной стадией заболеваний этого органа обернулся увеличивающейся смертностью среди больных, стоящих в очереди на пересадку. По данным ассоциации врачей США, к концу 1999 г. из 14 710 больных, находящихся в списке ожидавших пересадки печени, операция была проведена только 4480 [1]. В этом году список увеличился до 18 000 человек, в то время как количество трупных донорских органов осталось без изменений. До недавнего времени, несмотря на распространенность заболеваний печени, в Азии было очень мало центров, занимающихся пересадками этого органа от живого донора (в основном детям). Огромному числу взрослых больных с последней стадией заболевания пересадка не выполнялась из-за нехватки материала от мертвых доноров. Развитие и клиническое применение пересадки печени от живого донора (ППЖД) продвинулось за счет большого разрыва между потребностями больных и количеством донорских органов.

Первая попытка ППЖД с использованием левого бокового сегмента была проведена двум детям в Бразилии [2]. Хотя послеоперационный период протекал удовлетворительно, оба реципиента не выжили после операции. Исследования по пересадке печени от живого малолетнего донора, проведенные в Чикаго, позволили достичь успешного результата трансплантации, обеспечили большую выживаемость, а также снизили риск донорской заболеваемости и смертности [3, 4]. Пересадка органа от малолетнего живого донора закрепилась в большинстве центров, практикующих пересадку печени.

По мере накопления опыта по пересадке печени от малолетнего живого донора стали предприниматься попытки пересадки левой доли печени от взрослого донора [5, 6]. Возможности детской печени часто оказывались недостаточными для удовлетворения метаболических потребностей взрослого организма [7]. Было установлено, что для увеличения выживаемости после ППЖД коэффициент «имплантант-реципиент» должен быть более 0,8% [8, 9]. В Азии первая попытка пересадки правой доли печени от взрослого живого донора была предпринята в 1994 г. в Японии [10], затем последовала серия подобных операций в Гонконге [11]. Отсутствие в Азии достаточного количества органов от мертвых доноров дало толчок для поиска альтернативного источника донорской печени для взрослых больных [12, 13]. К настоящему времени в Азии с удовлетворительными результатами были проведены около 4000 ППЖД.