

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ГСК И ММСК В КОСТНОМ МОЗГЕ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПОСЛЕ АМПУТАЦИИ

Николаева Людмила Петровна

К.м.н., ассистент, ГБОУ ВПО «Красноярский
государственный медицинский университет им. проф.

В. Ф. Войно-Ясенецкого»

lpnikolaeva@yandex.ru

ASSESSMENT OF THE CONTENT OF HSC AND MMSC IN THE BONE MARROW OF TUBULAR BONES OF THE LOWER EXTREMITIES AFTER AMPUTATION

L. Nikolaeva

Summary. Introduction: New high-tech medical advances offer prospects for treatment of many diseases. New treatments are achieve a more pronounced therapeutic effect. The introduction of cellular technology, the most advanced of them.

Materials and methods: The study included 40 patients with different diseases and different age. These patients underwent lower limb amputation if unable to save it. It was patients with gangrene of the lower limb as a result of ischemia, traumatic injuries, road accidents, hypothermia. Patients were studied in the bone marrow immediately after amputation of the lower extremity. In the laboratory determined the number of hematopoietic and mesenchymal stem cells using specific markers. All samples were carried out the immunohistochemically characterization of the bone marrow.

Results: The results show that the bone marrow of different patients has a certain characteristic with constant parameters. Data show the biological value of bone marrow removed with amputation of the lower limb of the patient. The ease of obtaining bone marrow makes the procedure in surgical practice. The high content of hematopoietic and mesenchymal stem cells shows the biological value of bone marrow bones. This gives the opportunity to their use in autologous cell therapy for the patient.

Keywords: amputation of a limb, bone marrow, autologous cell therapy, stem cells.

Аннотация. Ранее все работы по изучению костного мозга проводились на костном мозге плоских костей — красном костном мозге, полученном при стерильной пункции или из гребня подвздошной кости. Костный мозг трубчатых костей не был охарактеризован из-за невозможности его прижизненного получения. Цель данной работы: количественный анализ мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в образцах костного мозга ампутированных конечностей у пациентов разных возрастных групп.

Исследование было проведено на 40 образцах костного мозга трубчатых костей, полученных от 40 пациентов, которым была произведена ампутация нижней конечности. Показаниями к ампутации были гангрена нижней конечности (сахарный диабет 2 типа с развитием синдрома диабетической стопы смешанной формы — 39 пациентов) и отморожение (1 пациент). Возраст пациентов: 50–75 лет (в среднем 63 года); 25 пациентов — мужчины (62, 5%), 15 пациентов — женщины (37,5%).

Костный мозг извлекали из бедренной кости сразу после ампутации нижней конечности. Количество ММСК и ГСК определяли на проточном цитофлуориметре с помощью набора антител к поверхностным антигенам клеток человека. На всех образцах проводилась иммуногистохимическая характеристика клеток костного мозга.

Количество ММСК в образцах костного мозга составило 0,50–0,92% (среднее значение $0,20 \pm 0,05\%$), ГСК — 0,01–0,92% (среднее значение $0,28 \pm 0,05\%$). При иммунофенотипировании образцов костного мозга было показано, что ММСК положительны по маркерам CD90 (1,73%), CD105 (3,17%), APC CD73 (2,88%), и отрицательны по маркерам CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR, а ГСК положительны по маркерам CD34 (2,73%), CD90 (1,90%) и отрицательны по маркерам CD38, CD45 и CD45RA.

Благодаря высокому содержанию ММСК и ГСК в костном мозге трубчатых костей, он может быть использован в аутогенной терапии при различных заболеваниях.

Ключевые слова: ампутация конечности, костный мозг, аутогенная клеточная терапия, стволовые клетки.

Введение

В хирургической практике периодически вынуждены проводить ампутацию нижней конечности из-за невозможности ее сохранения [1]. Высокие ампутации приводят к ограничению социальной адаптации пациентов [2], существенно сокращают продолжительность жизни больных в результате поражения контралатеральной конечности и различного рода осложнений [3]. Нижняя конечность, удаляемая во время вынужденной ампутации, это важное депо костного мозга, где в полости обеих бедренных костей находится около 25% всего костного мозга пациента. Отличительной особенностью костного мозга является его одновременная принадлежность двум регуляторным системам организма — системе крови и иммунной системе, клетки которых участвуют в обеспечении адаптивных реакций. В настоящее время доказано, что восстановление поврежденного органа происходит не только за счет активации органных регенеративных стволовых клеток, но и за счет миграции в зону повреждения ММСК из других органов, и прежде всего из костного мозга [4]. Основные функции костного мозга — это кроветворение и формирование иммунитета, так называемый иммуногенез. Поэтому, по возможности, при ампутации нужно уменьшать потери костного мозга, содержащего стволовые клетки.

Применение тканевой инженерии уже вышло из ряда доклинических исследований. Ближайшая задача биомедицины в этой области — использование инновационных клеточных технологий [5]. Взятие костного мозга у живых лиц с целью последующей трансплантации костного мозга [6] или выделенного концентрата стволовых клеток осуществляют с применением множественной аспирационной биопсии. [7]. Впервые мезенхимальные стволовые клетки были обнаружены именно в костном мозге [8], но все работы по изучению костного мозга проводились на костном мозге плоских костей — красном костном мозге (стерильная пункция или гребень подвздошной кости) [7]. Исследования костного мозга трубчатых костей не выполнялись из-за невозможности его прижизненного получения.

Цель исследования: количественный анализ мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в образцах костного мозга ампутированных конечностей у пациентов разных возрастных групп.

Материал и методы

Характеристика больных

В исследование было включено 40 пациентов, которым была произведена ампутация нижней конечности

после подписания информированного согласия. Показаниями к ампутации были: гангрена нижней конечности (сахарный диабет 2 типа с развитием синдрома диабетической стопы смешанной формы — 39 пациентов) и отморожение (1 пациент). Возраст пациентов 50–75 лет (в среднем 63 года), 25 пациентов — мужчины (62,5%), 15 — женщины (37,5%).

Получение образцов костного мозга

Образцы костного мозга получали в операционной, сразу же после ампутации нижней конечности. Из промета бедренной кости ложкой Фолькмана в стерильную пробирку извлекали костный мозг, который транспортировали в лабораторию.

Для разрушения конгломератов клеток костного мозга и получения суспензии клеток костный мозг подвергали мягкому гомогенизированию в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), а затем отстаивали в течение 10 мин. для удаления жировой ткани (жир костного мозга поднимается в верхний слой). Далее, не затрагивая верхний слой, отбирали нижнюю фазу ядродержащих клеток костного мозга и дважды отмывали в ФСБ с последующим центрифугированием при 400 г в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл ФСБ, количество клеток подсчитывали в камере Горяева, и разводили ФСБ до концентрации 1×10^7 кл/мл.

Имунофенотипирование ГСК и ММСК

Для иммунофенотипирования ГСК использовали антитела к поверхностным антигенам клеток человека по рекомендации фирмы-производителя BD Biosciences (Becton Dickinson) PE-Cy7 CD34, PE CD90 и смесь антител отрицательного контроля (APC CD38, PerCP-Cy5.5 CD45 и PerCP-Cy5.5 CD45RA). Иммунофенотипирование ММСК проводили с помощью набора Human MSC Analysis Kit (Becton Dickinson) который содержит конъюгированные антитела к маркерам ММСК (FITC CD90, PerCP-Cy5.5 CD105 и APC CD73), и смесь антител отрицательного контроля (PE CD45, PE CD34, PE CD11b, PE CD19 и PE HLA-DR).

В образец костного мозга объемом 50 мкл вносили 5 мкл антител, инкубировали в темноте в течение 15 мин., добавляли 500 мкл лизирующего раствора BD FACS Lysing Solution 1X (Becton Dickinson), инкубировали в течение 10 мин. в темноте, потом центрифугировали при 1500 об/мин. в течение 5 мин., супернатант сливали, осадок промывали три раза раствором BD FACS Flow (Becton Dickinson) с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Исследуемый образец разбавляли 300 мкл раствора BD FACS Flow и анализировали на проточном цитофлюориметре BD FACSCantoll (Becton Dickinson).

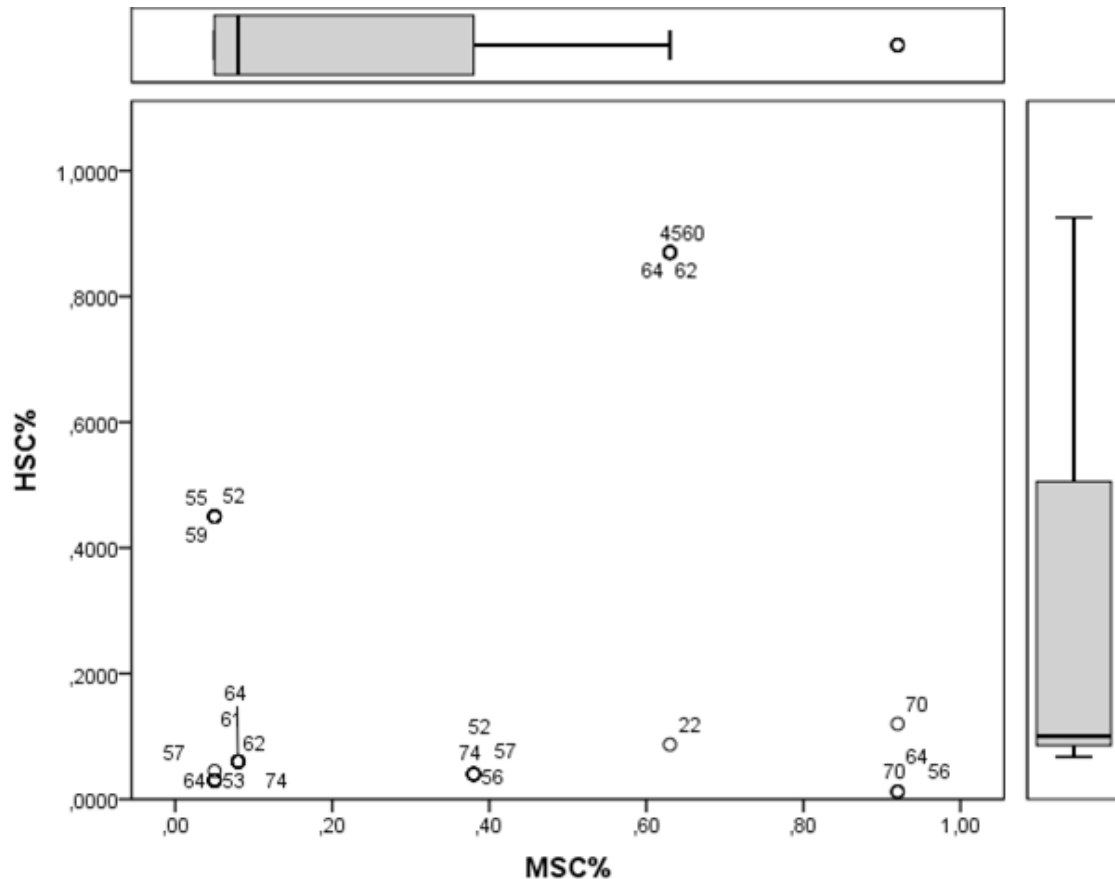


Рис. 1. Диаграмма переменной регрессии для ММСК и ГСК (в процентах) в зависимости от возраста.

Иммуногистохимический метод исследования костного мозга

Образцы костного мозга фиксировали в 1% формалине, заливали в парафиновые блоки, из которых готовили срезы толщиной 5–7 мкм и обрабатывали антителами CD34 (Vecton Dickinson), согласно инструкции фирмы-производителя, с последующим докрасиванием гематоксилин-эозином. На микроскопе Olympus CX 41 (Япония) определяли наличие ГСК по CD34 положительным маркерам.

Количественно-морфометрическое исследование клеточного состава костного мозга проводили на срезах толщиной 5–7 мкм под микроскопом Olympus CX 41 (Япония) при увеличении $\times 400$ по методу, описанному ранее, с помощью 100 точечной сетке Автандилова [8]. Количество клеток подсчитывали в 10 случайно выбранных полях зрения.

Статистический анализ

Статистика представлена абсолютными значениями, процентами и средними арифметическими величинами

со стандартным отклонением. Для определения наличия связей между учетными признаками применялся коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты

Уровень ампутации в настоящем исследовании определялся индивидуально. Объем извлеченного костного мозга зависел от уровня ампутации (верхняя, нижняя или средняя треть бедра) и равнялся 10–100 мл. Наибольшее количество костного мозга (до 100 мл) получали при ампутации конечности на уровне верхней трети бедра. Количество клеток в костном мозге напрямую коррелировало с количеством полученного костного мозга и составляло примерно от 50×10^4 до 75×10^6 клеток на образец. Содержание ММСК находилось в пределах 0,50–0,92%, ГСК 0,01–0,92%, средние значения — $0,20 \pm 0,05\%$ и $0,28 \pm 0,05\%$ соответственно. При иммунофенитипировании образцов костного мозга было показано, что ММСК положительны по маркерам: CD90 (1,73%), CD105 (3,17%), APC CD73 (2,88%), и отрицательны по маркерам CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR, а ГСК положительны по маркерам CD34 (2,73%), CD90 (1,90%) и отрицательны по маркерам CD38, CD45 и CD45RA.

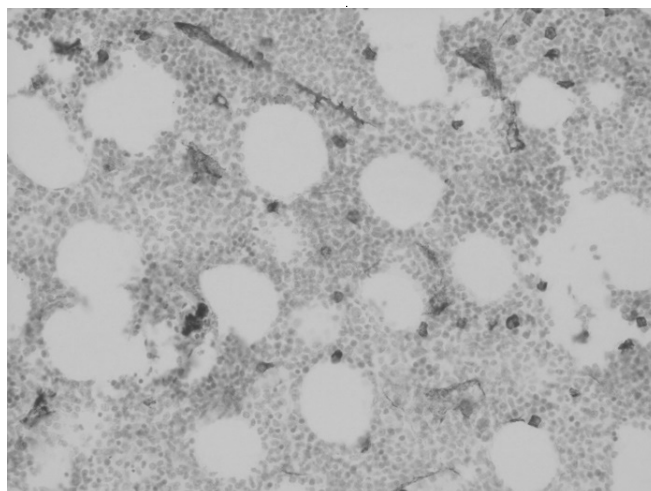


Рис. 2. Иммуногистохимический анализ срезов костного мозга бедренной кости: антитела к CD34, окраска гематоксилином, ув. x400

Анализ зависимости содержания ММСК и ГСК от возраста пациента, обнаружил, что в среднем содержание ММСК и ГСК в костном мозге ампутированной конечности одинаково во всех возрастных группах, с небольшим преобладанием количества ММСК. Следовательно, в настоящем исследовании было выявлено, что содержание стволовых клеток в костном мозге бедренной кости не зависит от возраста, что подтверждается отсутствием статистически значимой корреляции Спирмена (рис. 1).

При иммуногистохимическом исследовании образцов костного мозга было обнаружено, что в среднем содержание клеток на срезах составляет в различных участках от 50 до 80% в 100 точечной сетке Автандилова. В участках клеточного строения костного мозга видны клетки реактивного окружения, представленные расположенными вблизи капилляров гистиоцитами, эозинофилами, плазматическими клетками, единичными тучными клетками. Иммуногистоархитектоника костного мозга сохранена.

В большом количестве обнаруживаются клетки гранулопоэза различной степени зрелости со смещением в сторону незрелых промежуточных форм. Клетки эритропоэза представлены небольшими скоплениями эритробластов, формирующих эритропоэтические островки; в составе части скоплений находятся клетки макрофагального ряда. Мегакариоциты имеют морфо-

логию зрелых клеток, находятся в центральных отделах костномозговых ячеек, часто вблизи сосудов синусоидного типа без формирования кластеров. Лимфоидные элементы распределены диффузно, не формируя скоплений и агрегатов, имеют морфологию типа малого лимфоцита. Сосуды синусоидного типа, содержат клетки разной степени дифференцировки. При иммуногистохимическом исследовании в образцах выявляются CD34-экспрессирующие клетки с мононуклеарной морфологией, располагающиеся дискретно без кластерообразования. В среднем число CD34⁺ клеток при 400-кратном увеличении составило в нашем исследовании 6–8 клеток в поле зрения (рис. 2), а в костном мозге, получаемом при пункции подвздошной кости, среднее число CD34⁺ составляет 3–4 клетки в поле зрения.

Заключение

Полученные данные показывают биологическую ценность костного мозга, удаляемого при ампутации нижней конечности пациента. Простота получения костного мозга делает эту процедуру доступной в хирургической практике. Наличие ГСК и ММСК в костном мозге трубчатых костей дает возможность использовать их как в аутогенной, так и в аллогенной клеточной терапии.

На проведение данного исследования было получено разрешение этического комитета (протокол № 56/2014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Николаева Л.П., Черданцев Д. В., Горбенко А. С., Ольховский И. А. Костный мозг ампутированной конечности как возможный источник стволовых клеток. *Фундаментальные исследования* 2013; 7: 606–608.
2. Bruder S.P., Fink D. J., Caplan A. I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell. Biochem.* 1994; 56(3): 283–94.

3. Николаева Л.П., Черданцев Д.В., Хват Н.С. Особенности миелограммы костного мозга трубчатых костей. Ж. Современные проблемы науки и образования. — Москва, 2015. — № 4. — 6с.
4. Weaver C.V., Garry D. G. Regenerative biology: a historical perspective and modern applications. Regen. Med. 2008; 3(1): 63–82.
5. Krause J. Bone marrow overview. In: Rodak B., editor. Hematology: Clinical Procedures and Applications. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2002. p. 188–95.
6. Сисла Б. Руководство по лабораторной гематологии. М.: Практическая медицина; 2011.
7. Jamshidi K., Swaim W. R. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. J. Lab. Clin. Med. 1971; 77(2): 335–42.
8. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина; 1990.

© Николаева Людмила Петровна (lpnikolaeva@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Красноярский Государственный Медицинский Университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого