

КОСТНЫЙ МОЗГ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ

THE BONE MARROW

L. Nikolaeva

The purpose of the study: to conduct a comparative characteristic of the bone marrow of the flat and tubular bones. Assess the biochemical parameters of bone marrow of the bones

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. For comparison, a sternal puncture was obtained and the results of blood parameters were taken into account.

Results. The results of the study show a significant difference in the microenvironment of the bone marrow tubular bones and flat, both in cell composition and biochemical. The bone marrow of flat bones coincides with blood counts.

Keywords: limb amputation, bone marrow, autogenous cell therapy, stem cells, Cell transplantation, therapeutic strategy.

Николаева Людмила Петровна

К.м.н., ассистент, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого»
lpnikolaeva@yandex.ru

Аннотация. Цель исследования: провести сравнительную характеристику костного мозга плоских и трубчатых костей. Оценить биохимические показатели костного мозга трубчатых костей.

Материалы и методы. Материалы и методы. В исследование были включены 40 пациентов с разными заболеваниями и разного возраста. Эти пациенты перенесли ампутацию нижней конечности, если не смогли ее спасти. Это были больные с гангреной нижней конечности в результате ишемии, травматических повреждений, дорожно-транспортных происшествий, переохлаждения. Пациенты изучались в костном мозге сразу после ампутации нижней конечности. Для сравнения была получена стерильная пункция и учтены результаты анализа крови.

Результаты. Результаты исследования показывают значительную разницу в микроокружении трубчатых костей костного мозга и плоских, как по клеточному составу, так и по биохимическим. Костный мозг плоских костей совпадает с показателями крови.

Ключевые слова: ампутация конечности, костный мозг, аутогенная клеточная терапия, стволовые клетки, трансплантация клеток, терапевтическая стратегия.

Введение

В последнее десятилетие активно развивается и вводится в клиническую практику клеточная терапия. В связи с этим приобретает все большее значение костный мозг, как основная «ниша» стволовых клеток. Для нормальной жизнедеятельности и выполнения основных функций, к которым относятся самообновление и дифференцировка, стволовые клетки (СК) нуждаются в микроокружении с постоянными показателями и свойствами [1]. Среди ткани, в которой находятся стволовые клетки необходимо присутствие различные виды вспомогательных клеток, только при наличии этих условий стволовые клетки могут функционировать [2]. Накопленные данные позволили создать гипотезу о существовании в костном мозге двух различных ниш стволовых клеток: мезенхимальных и гемопоэтических. Для поддержания клеток в недифференцированном состоянии необходимо поддерживать постоянство микроокружения, которое включает в себя внеклеточный матрикс, определенное рН, концентрацию электролитов, определенных клеточных элементов [3,4,5]. Постоянство гомеостаза создает оптимальные условия для

стволовых клеток и исключает раннюю дифференцировку.

Характеристика больных

В исследование было включено 30 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). Следует учитывать, что пунктат костного мозга плоских костей брался у пациентов гематологического отделения, где обследовали пациентов при подозрении на онкозаболевание, в случае исключения этого заболевания, результат брался для исследования. Пункция проводилась однократно, когда необходимо было изучить мелограмму и одновременно часть пунктата брался для исследования. Стерильная пункция не проводилась у пациентов, которым была проведена ампутация, из-за угрозы ухудшения состояния пациента и этическим нормам. Показатели крови пациентов, которым проводилась ампутация, получали из истории болезни, в период нормализации состояния.

Получение образцов костного мозга

Исследуемые образцы костного мозга получали в операционной, сразу же после ампутации нижней конечности [6,7]. Из просвета бедренной кости ложкой Фолькмана в стерильную пробирку извлекали костный мозг, который транспортировали в лабораторию.

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 бедренной кости зависело от объема полученного костного мозга и составляло примерно от 500 тыс. до 7 млн. клеток на образец.

Для разрушения конгломератов клеток и перевода клеток в суспензионное состояние костный мозг подвергался мягкому гомогенизированию с добавлением фосфатно-солевого буфера. Удаление жировой ткани проводили посредством 10 мин. отстаивания образца, при этом жир костного мозга поднимается в верхний слой. Не затрагивая верхний слой, в новую пробирку отбирали нижнюю фазу ядродержащих клеток костного мозга и дважды отмывали в фосфатном буфере с последующим центрифугированием при 400g в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буфера, их количество подсчитывали в камере Горяева. Суспензию клеток разводили фосфатным буфером до концентрации 1×10^7 клеток/мл. Количественное определение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в образцах костного мозга. Абсолютное количество ГСК и ММСК в образцах костного мозга рассчитывали по формуле: количество клеток = концентрация клеток * объем пробы. Для определения концентрации ГСК и ММСК костного мозга использовали пробирки BD Trucount™ Tubes, которые содержат известную концентрацию микрочастиц, выделяемых в отдельную область по прямому и боковому светорассеянию на проточном цитофлуориметре. По соотношению микрочастиц и клеток определяли концентрацию клеток в образце.

Определение электролитов и биохимических показателей костного мозга определяли на больничном анализаторе. Использование больничного анализатора было большим риском из-за возможности выведения из рабочего режима [7,8]. Удаление конгломератов клеток и жировой ткани проводили посредством 10-ти минутного отстаивания образца, при этом жир костного мозга поднимается в верхний слой. Не затрагивая верхний слой

в новую пробирку отбирали нижнюю фазу, содержащую ядерные клетки костного мозга. Дополнительно, для исключения повреждения анализатора, дважды пропускали костный мозг через четыре слоя марли. Содержание ионов определяли на анализаторе кислотно-щелочного и газового состава крови.

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

Показатели клеточного состава и биохимических данных костного мозга и крови.

1. Анализ полученных данных показывает, что в плоских костях обнаруживаются преимущественно гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), а в трубчатых костях, как ГСК, так и мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Мезенхимальные стволовые клетки определяются в большем количестве, чем гемопоэтические.
2. Процентное содержание в костном мозге бедренной кости ММСК равнялось 0,08%, ГСК 0,04%. Биологическая ценность костного мозга бедренной кости значительно выше, чем из других источников.
3. Биохимический состав и кислотно-щелочные показатели стеральной пункции практически совпадают с показателями крови.
4. Показатель pH костного мозга бедренной кости $6,88 \pm 0,13$, где обнаружены мезенхимальные и гемопоэтические стволовые клетки, а pH стеральной пункции $7,43 \pm 0,014$, где преимущественно только гемопоэтические стволовые клетки. В крови pH 7,35–7,45. Можем сделать однозначный вывод, pH стеральной пункции и крови совпадают.
5. Показатели pCO₂ и pO₂, которые влияют на кислотно-щелочное состояние, в костном мозге бедренной кости $14,88 \pm 2,77$ и $113,86 \pm 26,68$ соответственно. Эти данные выходят за показатели нормы крови. В костном мозге стеральной пункции pCO₂ и PO₂, имеют цифры $23,00 \pm 8,36$ и $104,94 \pm 15,31$ соответственно, что входит в диапазон нормального колебания крови.
6. Данные по электролитам неоднозначные: К и Na во всех трех образцах совпадают с показателями крови (колебания в пределах нормы). Но ионов Ca² костном мозге бедренной кости несколько выше, чем в крови и равняется $1,37 \pm 0,46$, а в стер-

нальной пункции, наоборот, ниже и имеет значение $0,99 \pm 0,081$. Эти данные влияют на функциональное состояние клеток и во всех образцах поддерживаются на определенном уровне. Без присутствия этого элемента нарушается процесс свертывания крови, теряется эластичность сосудов и повышается их проницаемость. Чем выше метаболизм органа и чем быстрее в нем идут биохимические процессы, тем больше кальция потребуется ткани.

7. Показатель кальция в костном мозге бедренной кости выше чем в стеральной пункции и крови, можно предположить, что обменные процессы в костном мозге бедренной кости более ускорены.
8. Выше по сравнению с кровью данные по Cl^- который в костном мозге бедренной кости составляет $131,22 \pm 15,35$, но в стеральной пункции этот показатель $105,57 \pm 1,75$ как в крови. Cl^- оказывает содействие в сохранении кислотно-щелочного равновесия. Основная часть анионов Cl^- сосредоточена в межклеточном пространстве, в клетках их содержание в несколько раз меньше. Для установления водно-солевого баланса хлор «следит», чтобы объем имеющейся жидкости имел постоянные показатели. В костном мозге бедренной кости хлора несколько больше, чем в крови и костном мозге стеральной кости, можно предположить, что нагрузка по сохранению кислотно-щелочного равновесия в бедренной кости больше и требования к постоянству pH выше.
9. Мочевина и креатинин в стеральной пункции 7,9 и 104,0 соответственно, как в пределах показателей крови. В костном мозге бедренной кости мочевина 0,20 и креатинин 3,00, что значительно ниже показателей крови и костного мозга, полученного при стеральной пункции. Мочевина образуется в результате распада белков на аминокислоты. Креатинин — это продукт распада, который образуется в мышечной ткани, после расщепления на составные части креатина. Креатин является частью энергетического обмена веществ, который организм использует для сокращения мышц. Чаще всего эти показатели связаны с обменом белка и высокой скоростью обмена веществ.
10. В костном мозге трубчатой кости уровень щелочной фосфатазы 24,8, а в стеральном пункте 285,0, что значительно выше, чем в мозговой ткани бедренной кости и в крови. Щелочная фосфатаза — фермент гидролаза, отщепляющая фосфат от многих типов молекул, например, нуклеотидов, белков и алкалоидов. Фермент проявляет наибольшую активность в щелочной среде. Щелочная фосфатаза относительно

устойчива к инактивации, денатурации и деградации. Возможно, одной из функций фосфатазы является отщепление фосфатов от органических молекул, так как многие фосфорилированные соединения не могут проникать через плазматическую мембрану. Щелочная фосфатаза — фермент, входящий в подгруппу гидролаз (расщепляет связи с участием молекулы воды). Его основная функция — проведение реакции дефосфорилирования на молекулярном уровне, при которой происходит отщепление фосфата от органических веществ. В норме щелочная фосфатаза имеет постоянную активность, участвуя в переносе фосфора через клеточную мембрану. Фермент является маркером протекания фосфорно-кальциевого обмена. Уровень щелочной фосфатазы в костном мозге бедренной кости значительно ниже, чем в стеральной пункции и в крови. Этот низкий уровень говорит о пониженной потребности костного мозга в функциях щелочной фосфатазы.

11. Остальные биохимические показатели бедренной кости: глюкоза 0,02; холестерин 00; триглицериды 0,05, намного ниже чем в стеральной пункции и крови, где они совпадают.

Заключение

Данные исследования показывают, что при трансплантации костного мозга, необходимо учитывать показатели «ниши» костного мозга и соответственно, показатели той среды в которую будут вводятся клетки костного мозга [9,10,11]. При несовпадении этих показателей, клетки костного мозга могут дифференцироваться хаотично и терапевтический эффект можно не получить [12,13]. При культивировании клеточных культур для получения клеток нужной дифференцировки необходимо учитывать полученные биохимические показатели для создания оптимальных условий жизнедеятельности клеток [14].

Наличие ГСК и ММСК в костном мозге трубчатых костей дает возможность использовать их в аутогенной клеточной терапии пациента. Клеточная терапия в хирургической практике становится реальной. Необходимость использовать костный мозг, получаемый при ампутации, это объективная реальность и терять эту возможность недопустимо.

Костный мозг из ампутированной конечности, это уникальная возможность пополнения банка костного мозга.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Ding L., Morrison S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 2013 Feb 24.
2. Greenbaum A., Hsu Y. M., Day R. B. et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 2013 Feb 24.
3. Николаева Л. П. Особенности кроветворения в желтом костном мозге. *Ж. Современные проблемы науки и образования*. — М. 2015. — № 6 С. 5–6
4. Николаева Л. П., Черданцев Д. В., Титов К. С. Характеристика стволовых клеток пациентов с осложненным сахарным диабетом. *Российский биотерапевтический журнал*. 2017. Т. 16. № 1. С. 47–50.
5. Nikolaeva L. P. Features of acid — base balance of bone marrow. *Acta Medica International*. — 2018. T.5. № 2. P.55–57.
6. Chee C. Y., Virshup D. M., Madan B. 2015. The intestinal stem cell niche. In: *Tissue-specific stem cell niche* (Ed. K. Turksen). Cham: Springer. 135–162.
7. Papadea C, Foster J, Grant S, et al. Evaluation of the i-STAT portable clinical analyzer for point-of-care blood testing in the intensive care units of a university children's hospital. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 32:231–43. 7.
8. Klimczak A., Kozłowska U. 2016. Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: their role in tissue homeostasis. *Stem Cells Intl*. 2016: 1–11.
9. García-Prat L., Sousa-Victor P., Muñoz-Cánoves P. 2017. Proteostatic and metabolic control of stemness. *Cell Stem Cell*. 20: 593–608.
10. Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P. 2014. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim. biophys. acta. Gen. Subj.* 1840: 2506–2519.
11. Stzepourginski I., Nigro G., Jacob J.-M., Dulauroy S., Sansonetti P. J., Eberl G., Peduto L. 2017. Cd34+ mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 114: E506— E513.
12. Pires A. O., Mendes-Pinheiro B., Teixeira F. G., Anjo S. I., Ribeiro-Samy S., Gomes E. D., Serra S. C., Silva N. A., Manadas B., Sousa N., Salgado A. J. 2016. Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and human umbilical cord perivascular cells: a proteomic analysis. *Stem Cells Develop*. 25: 1073–1083.
13. Rumman M., Dhawan J., Kassem M. 2015. Concise review: quiescence in adult stem cells: biological significance and relevance to tissue regeneration. *Stem Cells*. 33: 2903–2912.
14. Visvader J. E., Clevers H. 2016. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nature Cell Biol*. 18: 349–355.

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

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



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