

ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ОСЛОЖНЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Л. П. Николаева¹, Д. В. Черданцев¹, К. С. Титов^{2,3}

¹ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Россия, 660077 Красноярск, ул. П. Железняка, 1;

² ГБУЗ «Московский клинический научный центр Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, ш. Энтузиастов, 86;

³ ФГБОУ «ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Людмила Петровна Николаева lpnikolaeva@yandex.ru

Введение. Увеличение численности больных с сахарным диабетом и большое количество ампутаций нижних конечностей заставляет искать новые методы лечения данных пациентов.

Материалы и методы. В исследование включено 17 пациентов с осложненной формой сахарного диабета. У пациентов исследовался костный мозг сразу же после ампутации нижней конечности. В лаборатории определяли количество гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток с использованием специфических маркеров. Проводилась иммуногистохимическая оценка всех образцов костного мозга.

Результаты и заключение. Полученные данные показывают биологическую ценность костного мозга, удаляемого при ампутации нижней конечности пациента с осложненным сахарным диабетом. Простота получения костного мозга делает эту процедуру доступной в хирургической практике. Гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки можно использовать в аутологичной клеточной терапии для пациента.

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

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-47-50

THE CHARACTERISTIC OF BONE MARROW STEM CELLS OF PATIENTS WITH THE COMPLICATED DIABETES

L. P. Nikolaeva¹, D. V. Cherdantsev¹, K. S. Titov^{2,3}

¹ V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 St. P. Zheleznyaka, Krasnoyarsk 660077, Russia;

² Moscow Clinical Research Center of Health Department of Moscow; 86 Sh. Entusiastov, Moscow 111123, Russia;

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianov St., Moscow, 117997, Russia

Introduction. An increase in patients with diabetes and a large number of amputations of limbs make the search for new treatments for these patients.

Materials and methods. The study included 17 patients with complicated forms of diabetes. Patients were studied in the bone marrow immediately after surgery – the amputation of the limb. The number of hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells using specific markers were determined in the laboratory. The immunohistochemical characteristics of bone marrow were carried out for all samples.

Results and conclusion. The obtained results indicate the biological value of bone marrow removed with amputation of the lower limb of the patient with complicated diabetes mellitus. The ease of obtaining bone marrow makes the procedure approachable in surgical practice. The presence of hematopoietic and mesenchymal stem cells provides the opportunity to use them in autologous cell therapy for patient.

Key words: amputation of a limb, bone marrow, autologous cell therapy, stem cells

Введение

По данным статистических исследований, каждые 10–15 лет число заболевающих сахарным диабетом удваивается. Примерно 40–60 % всех нетравматических ампутаций нижних конечностей проводится у больных с осложненным сахарным диабетом [1, 2]. Спустя 15–20 лет после начала болезни у 80 % боль-

ных сахарным диабетом ампутуются одна или обе нижние конечности [3]. В 40 % наблюдений после первой ампутации на уровне бедра или голени больные теряют подвижность и могут передвигаться только в пределах дома. С увеличением возраста больных прослеживается тенденция увеличения доли больших ампутаций: так, у лиц в возрасте от 65 до 74 лет

ампутации голени и бедра составляют 32 и 18 %, у лиц старше 75 лет – 34 и 28 % соответственно [4]. Уровень ампутации определяет летальность. Высокие ампутации приводят к ограничению социальной адаптации пациентов, существенно сокращают продолжительность жизни больных в результате поражения контралатеральной конечности и присоединения различного рода осложнений [5]. Нижняя конечность, удаляемая во время вынужденной ампутации, – важное депо костного мозга: в полости бедренной кости находится около 25 % всего костного мозга. Важной особенностью костного мозга является одновременная принадлежность 2 регуляторным системам организма – системе крови и иммунной системе, клетки которых участвуют в обеспечении адаптивных реакций [6]. В настоящее время доказано, что восстановление поврежденного органа происходит не только за счет активации органных регионарных стволовых клеток, но и за счет миграции мезенхимальных стволовых клеток из других органов, прежде всего из костного мозга, в зону повреждения. При ампутации конечности иммунная система сокращена на четверть, и то, как долго сохранится созданный иммунодефицит, зависит от индивидуальных особенностей пациента [7]. Во время вынужденной ампутации конечности важно снизить потери костного мозга.

Применение тканевых и клеточных технологий уже вышло из разряда доклинических исследований. Ближайшая задача биомедицинских исследований в этой области – применение инновационных клеточных технологий [8]. Большинство известных технологий забора костного мозга у живых лиц для последующей трансплантации ткани костного мозга [9] или выделенного концентрата стволовых клеток предполагает использование методик инвазивной трепанобиопсии [10]. Впервые мезенхимальные стволовые клетки были обнаружены именно в костном мозге [11]. В последние годы во всем мире началось интенсивное изучение стволовых клеток из различных источников. Стволовые клетки можно использовать при многих заболеваниях, в том числе при сахарном диабете. Аутологичные стволовые клетки, полученные из костного мозга, применяются для лечения заболеваний сердца [12]. Цель лечения сахарного диабета – предупреждение его осложнений, снижение уровня вводимого инсулина и нормализация уровня глюкозы в крови [13]. Уже проводятся пилотные исследования по применению аллогенных мезенхимальных стволовых клеток при сахарном диабете [14]. Стволовые клетки, полученные из ампутированной конечности, можно использовать для конкретного больного с целью улучшить качество его жизни и обеспечить профилактику дальнейших осложнений сахарного диабета.

Цель исследования – количественный и качественный анализ мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток в образцах костного мозга ампутированных конечностей у пациентов с осложненным сахарным диабетом.

Материалы и методы

В исследование включено 17 больных диабетом 2-го типа, осложненного синдромом диабетической стопы. Возраст пациентов – 55–65 лет. Исследуемые образцы костного мозга получали сразу же после ампутации нижней конечности. В операционной извлекали костный мозг из бедренной кости в стерильную пробирку, которую транспортировали в лабораторию.

Для анализа проходят следующие этапы:

- гомогенизация и разведение образца;
- очистка клеток костного мозга от конгломератов клеток и жировой ткани;
- анализ образцов для определения количества мезенхимальных стволовых клеток костного мозга;
- анализ образцов для определения количества гемопоэтических стволовых клеток костного мозга.

Для разрушения конгломератов клеток и перевода клеток в суспензионное состояние костный мозг подвергался мягкому гомогенированию с добавлением фосфатного буфера. Удаление конгломератов клеток и жировой ткани проводили посредством отстаивания образца в течение 10 мин, при этом жир костного мозга поднимался в верхний слой. Не затрагивая верхний слой, в новую пробирку отбирали нижнюю фазу, содержащую ядерные клетки костного мозга, и 2 раза отмывали центрифугированием при 400g в течение 5 мин в фосфатном буфере. 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.

Для количественного определения гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга использовали пробирки BD Trucount™ Tubes для подсчета абсолютного количества лейкоцитов.

Для определения количества гемопоэтических стволовых клеток костного мозга анализ образцов проводили согласно рекомендации фирмы-производителя BD Biosciences. Гемопоэтические стволовые клетки должны быть положительными по маркерам CD34, CD90, CD49f. Для составления панели антител были использованы конъюгаты антител, рекомендованные фирмой-производителем BD Biosciences. Анализ выполняли на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (рис. 1).

Проведено гейтирование мезенхимальных стволовых клеток по положительной экспрессии CD90, CD105, CD73 и отрицательной – CD34, CD11b,

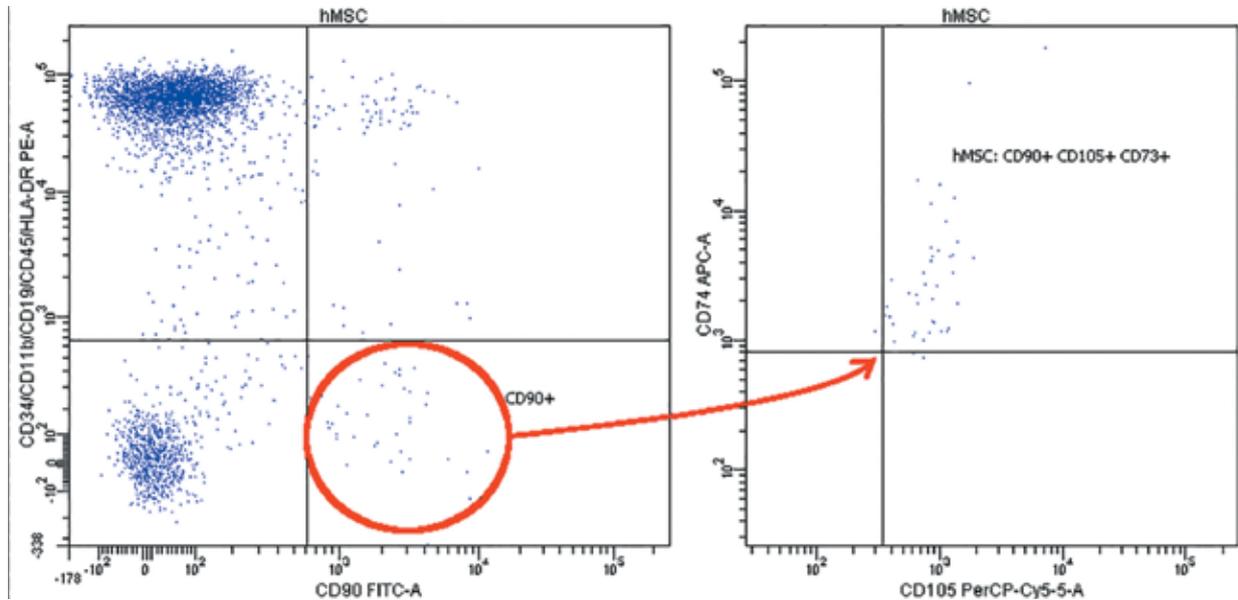


Рис. 1. Определение мезенхимальных стволовых клеток

CD19, CD45 и HLA-DR. Клетки были анализированы на проточном цитофлуориметре с использованием набора Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences).

Согласно рекомендациям Международного общества клеточной терапии, мезенхимальные клетки костного мозга должны быть положительными по маркерам CD73, CD90, CD105 и отрицательными по CD34, CD45, CD14 или CD11b, CD19 или CD796, и HLA-DR. Для определения количества мезенхимальных клеток костного мозга использовали набор Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences). Набор содержит конъюгированные антитела к маркерам мезенхимальных стволовых клеток (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).

Результаты

Исследовано 15 образцов костного мозга пациентов, перенесших ампутацию нижней конечности по поводу осложненного течения сахарного диабета. Количество полученного костного мозга зависит от уровня ампутации, который определялся индивидуально [9]. Наибольшее количество костного мозга (до 200–250 мл) получали при ампутации конечности на уровне верхней трети бедра. Количество клеток в костном мозге зависит от количества костного мозга и составляло примерно от 0,5 до 75,0 млн клеток. Содержание мезенхимальных стволовых клеток костного мозга составляло от 0,3 до 0,9 %, гемопоэтических стволовых клеток костного мозга – от 0,01 до 0,8 %. В среднем содержание мезенхимальных и гемопоэтических клеток в костном мозге ампутированной конечности одинаково, незначительно

преобладают мезенхимальные клетки. Стоит отметить, что содержание стволовых клеток в костном мозге бедренной кости не зависит от возраста. Сравнение количества стволовых клеток в костном мозге у больных пожилого возраста и молодых пациентов, когда ампутация конечности проводилась вследствие травматического повреждения конечности и невозможности ее сохранить, показало отсутствие большого отличия.

Имуногистохимическая характеристика костного мозга

При проведении иммуногистохимического анализа костного мозга трубчатых костей было установлено, что клеточность костного мозга составляет в среднем от 50 до 80 % в различных участках. В участках клеточного строения костного мозга определяются клетки реактивного окружения, представленные расположенными вблизи капилляров гистиоцитами, эозинофилами, плазматическими клетками, единичными тучными клетками. Иммуногистоархитектоника костного мозга сохранена.

Определяются многочисленные клетки гранулопоэза различной степени зрелости со смещением в сторону незрелых промежуточных форм. Клетки эритропоэза представлены небольшими скоплениями эритробластов, формирующих эритропоэтические островки, состоящие из различных клеточных форм; в составе части скоплений определяются клетки макрофагального ряда. Мегакариоциты имеют морфологию зрелых клеток, распределены в центральных отделах костномозговых ячеек, часто вблизи сосудов синусоидного типа, без формирования кластеров. Лимфоидные элементы распределены диффузно,

не формируют скоплений и агрегатов, имеют морфологию типа малого лимфоцита. Сосуды синусоидного типа содержат дифференцированные клеточные формы. При иммуногистохимическом исследовании в образцах определяются экспрессирующие CD34 клетки с мононуклеарной морфологией, распределенные дискретно, без кластерообразования. При 400-кратном увеличении в костном мозге бедренной кости число CD34⁺ клеток составляет в среднем 6–8 клеток в поле зрения (рис. 2), в костном мозге подвздошной кости – в среднем 3–4 клетки в поле зрения.

Заключение

Полученные данные показывают биологическую ценность костного мозга, удаляемого при ампутации нижней конечности у пациента с осложненным сахарным диабетом. Благодаря простоте получения костного мозга доступно в хирургической практике. Гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки можно использовать в аутологичной клеточной терапии пациента. Клеточные технологии развиваются стремительно и возможности применения стволовых клеток костного мозга при различных заболеваниях, в том числе для аллогенной клеточной терапии,

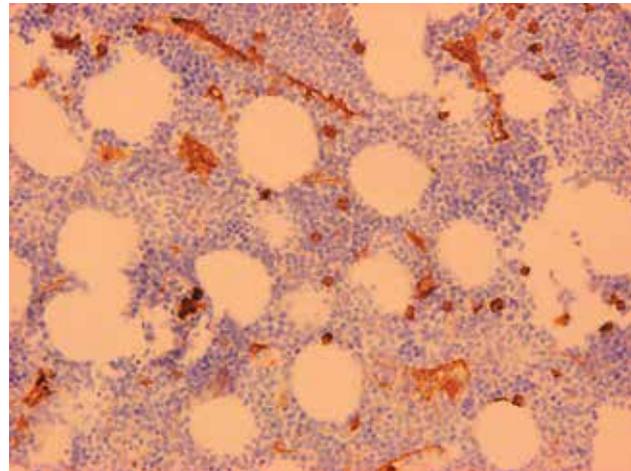


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование костного мозга бедренной кости с антителами к CD34 с окрашиванием гематоксилином, $\times 400$

расширяются очень быстро. В хирургической практике клеточная терапия становится реальной.

Данная работа выполнена при содействии Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Николаева Л. П., Черданцев Д. В., Степаненко А. В., Дятлов В. Ю. Изменение состояния антиоксидантной системы у больных с синдромом диабетической стопы. *Фундаментальные исследования* 2010;11:95–7.
2. Питерс-Хармел Э., Матур Р. Сахарный диабет: диагностика и лечение. М.: ИД «Практика», 2008. 496 с.
3. Barc P., Skora J., Pupka A. Bone-marrow cells in therapy of critical limb ischaemia of lower extremities – own experience. *Acta Angiolog* 2006;12(4):155–66.
4. Пальцев М. А. Медицина XXI века в свете клеточной биологии. *Вестн. РАМН* 2004;9:3–11.
5. Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A. et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007;45 (suppl S): S5–67. DOI: 10.1016/j.jvs. 2006.12.037. PMID: 17223489.
6. 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;56:283–94. DOI: 10.1002/jcb.240560303. PMID: 7876320.
7. Gu Y.Q., Zhang J., Guo L.R. et al. Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells for patients with lower limb ischemia. *Chin Med J* 2008;121(11):963–7. PMID: 18706241.
8. Weaver C.V., Garry D.G. Regenerative biology: a historical perspective and modern applications. *Regen Med* 2008;3:63–82. DOI: 10.2217/17460751.3.1.63. PMID: 18154463.
9. Krause J. Bone marrow overview. In: Rodak B., ed. *Hematology: Clinical Procedures and Applications*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002. P. 188–195.
10. Сисла Б. Руководство по лабораторной гематологии. Пер. с англ. Под общ. ред. А. И. Воробьева. М.: Практическая медицина, 2011. 352 с.
11. Jamshidi K., Swaim W.R. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: A new biopsy device. *J Lab Clin Med* 1971;77:335. PMID: 5540776.
12. Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A. et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919–56. PMID: 12078791.
13. Lu D., Chen B., Liang Z. et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;92(1):26–36. DOI: 10.1016/j.diabres. 2010.12.010. PMID: 21216483.
14. Packham D.K., Fraser I.R., Kerr P.G., Segal K.R. Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells (MPC) in Diabetic Nephropathy: A Randomized, Placebo-controlled, Dose Escalation Study. *EBioMedicine* 2016;9:1–7. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.09.011. PMID: 27743903. PMID: PMC5078602.