

УДК [611-018.46:576.3]:617.58-089.873

## КОСТНОЙ МОЗГ АМПУТИРОВАННОЙ КОНЕЧНОСТИ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИСТОЧНИК СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

<sup>1</sup>Николаева Л.П., <sup>1</sup>Черданцев Д.В., <sup>2</sup>Горбенко А.С., <sup>2</sup>Ольховский И.А.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, e-mail: lpnikolaeva@yandex.ru;

<sup>2</sup>Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр»  
Министерства здравоохранения РФ, Красноярск

В настоящее время мы стоим на пороге активного применения клеточных технологий в клинической практике. В связи с этим очень актуальным является поиск новых доступных источников стволовых клеток, одним из которых является использование ампутированной конечности как источник костного мозга, богатого стволовыми клетками. У больных с критической ишемией нижних конечностей во время вынужденной ампутации удаляется не только конечность, но и около 25 % всех стволовых клеток, что значительно снижает возможности организма к восстановлению. Содержание стволовых клеток в костном мозге бедренной кости соответствует терапевтической дозе и может использоваться для аутологической трансплантации данному больному. Мононуклеарные фракции костного мозга ампутированной конечности, полученные в стерильных условиях операционной, могут в течение 1,5–2 часов быть готовы к применению. Этот источник стволовых клеток позволит быстро создать банк клеток костного мозга.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, клеточная терапия, гемопоэтическая стволовая клетка, аутотрансплантация, клеточная трансплантация

## THE MARROW OF AMPUTATED LIMB AS A SOURCE OF STEM CELLS

<sup>1</sup>Nikolaeva L.P., <sup>1</sup>Cherdancev D.V., <sup>2</sup>Gorbenko A.S., <sup>2</sup>Olchovskiy I.A.

<sup>1</sup>Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk,  
e-mail: lpnikolaeva@yandex.ru;

<sup>2</sup>Krasnoyarsk branch of hematologic scientific center of Russia, Krasnoyarsk

Now we are on the threshold of active application of cellular technologies in clinical practice. In this regard the search for new available sources of stem cells is very rest real One of which is using an amputated lag as a source of bone marrow rich with stem cells. With patients with critical ischemia in the bottom extremities during the mandatory amputation not only a lag is removed, but also about 25 % of all stem cells that considerably reduce the possibility of the body convalescence. The maintenance of stem cells in the marrow of a femur corresponds to a therapeutic dose and can be used for autological transplantation for the patient. Mononuclear fractions of bone marrow from the amputated leg received in sterile operating conditions can be ready with 1,5–2 hours from application. This source of stem cells allows the creation of a bank of bone marrow cells quickly.

**Keywords:** stem cells, cell-based therapy, hematopoietic stem cells, autotransplantation, cellular transplantation

Ампутации нижних конечностей – это вызов современной медицине. В разных странах мира производится эта инвалидирующая операция. Существенную долю среди них составляют больные сахарным диабетом. Смертность при СД уже не обусловлена острыми осложнениями, такими как гипергликемия, а чаще является следствием хронических осложнений этого заболевания, среди которых наиболее частое – синдром диабетической стопы. По данным статистических исследований, каждые 10–15 лет число людей, болеющих диабетом удваивается. Приблизительно 40–60 % всех нетравматических ампутаций нижних конечностей проводится у больных диабетом. У 80 % больных сахарным диабетом спустя 15–20 лет после начала болезни ампутируются одна или обе нижние конечности. В 40 % наблюдений после первой ампутации на уровне бедра или голени больные теряют подвижность и могут

передвигаться только в пределах квартиры. С увеличением возраста больных прослеживается тенденция увеличения доли больших ампутаций, так, у лиц возрастной категории 65–74 года ампутации голени и бедра составляют 32 и 18 %, среди лиц старше 75 лет – 34 и 28 % соответственно. Уровень ампутации определяет летальность. Ампутация конечности – операция, травматичная как для самого больного, так и для его семьи. Высокие ампутации приводят к ограничению социальной адаптации пациентов, существенно сокращают продолжительность жизни больных в результате поражения контралатеральной конечности и присоединения различного рода осложнений. Нижняя конечность, удаляемая во время вынужденной ампутации, – это важное депо костного мозга, где в полости бедренной кости находится около 25 % всего костного мозга данного пациента. Важной 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 регионарных стволовых клеток, но и за счет миграции в зону повреждения мезенхимальных стволовых клеток из других органов, и, прежде всего, из костного мозга. Если при операции, например, ампутации конечности на уровне бедра, удаляется до 25 % всего костного мозга, то возможности к репарации и восстановлению снижены из-за уменьшения количества клеток, отвечающих за это. Иммунная система при ампутации конечности сокращена на четверть, и как долго сохранится созданный иммунодефицит – зависит от индивидуальных особенностей пациента. Важно во время проведения вынужденной ампутации конечности снизить потери костного мозга. Применение тканевых и клеточных технологий уже вышло из разряда доклинических исследований. Ближайшая задача биомедицинских исследований в этой области – применение высоких клеточных технологий [1]. Получение стволовых клеток путем культивирования имеет несколько общеизвестных недостатков и, в первую очередь, опасность отторжения. Большинство известных технологий взятия костного мозга у живых лиц с целью последующей трансплантации ткани костного мозга или выделенного концентрата стволовых клеток предполагает использование методик инвазивной трепанобиопсии [5]. Впервые мезенхимальные стволовые клетки были обнаружены именно в костном мозге и долгое время считалось, что основным депо стволовых клеток является именно костный мозг. В последние годы во всем мире началось интенсивное изучение стволовых клеток из различных источников. Было показано, что стволовые клетки присутствуют в любой ткани и органе: в печени, селезенке, жировой ткани и пр. Вместе с тем в практике хирургических стационаров достаточно часто приходится иметь дело с необходимостью проведения ампутаций конечностей. По статистическим данным, в США ампутации нижних конечностей ежегодно проводятся примерно у 150000 человек [2]. Предполагается, что среди прочих равных обстоятельств определенное значение в этом имеет и факт утраты вместе с костно-мозговой тканью, находящейся в ампутированной кости, до 25 % всего количества стволовых клеток пациента [3]. Полученную в резуль-

тате вынужденной операции костно-мозговую ткань следует рассматривать как один из возможных источников стволовых клеток, в том числе и с целью последующей аутотрансплантации. В настоящее время клеточная терапия применяется при многих заболеваниях, которые ранее считались неизлечимыми. Лечение стволовыми клетками возможно при 1 и 2 типе сахарного диабета. Для лечения сахарного диабета применяются стволовые клетки, полученные из костного мозга. Цель лечения диабета – предупреждение его осложнений, снижение уровня вводимого инсулина и нормализация уровня глюкозы крови. При получении стволовых клеток из ампутированной конечности (что часто наблюдается при сахарном диабете) можно использовать их для данного больного с целью улучшения качества его жизни и профилактики осложненной формы диабета.

**Целью исследования** является демонстрация возможности выделения стволовых клеток, полученных из костного мозга бедренной кости ампутированной конечности. Провести сравнительную оценку полученных результатов с традиционной костно-мозговой пункцией. Поставленную задачу решают за счет того, что в операционной непосредственно после ампутации извлекают костный мозг из костно-мозгового канала бедренной кости в стерильную емкость с последующей транспортировкой в лабораторию.

Выделение клеток костного мозга: костно-мозговую массу объемом 3 мл гомогенизировали в 4 мл PBS. Полученную суспензию пропускали через нейлоновый фильтр с порами 40 мкм. Три раза клетки отмывали PBS-центрифугированием 5 мин при 900 g. Клетки разводили PBS до конечной концентрации 600 тыс. в 1 мл. Определение CD34 + клеток: CD34 + определяли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II по стандартной методике. В качестве флуоресцентной метки использовались меченые FITC антитела (BD) к CD34, отрицательный контроль – антитела, меченные FITC к мышинным IgG1 (BD). CD34 + клетки считали от числа всех клеток в суспензии [6].

Как мы видим из таблицы, содержание стволовых клеток в костном мозге, полученном из ампутированной конечности, намного выше, чем количество стволовых клеток, полученных при пункции.

Количество стволовых клеток, полученных при пункции, не превышает 0,1 % [3], а количество стволовых клеток, полученных из ампутированной конечности, больше в несколько раз (от 2 до 38 раз).

## Содержание стволовых клеток в костном мозге ампутированной конечности больных

Больной	Возраст	% стволовых клеток	Источник (костного мозга)
Больной А.	78 лет	0,18%	Бедренная кость
Больной В.	65 лет	0,2%	Бедренная кость
Больной С.	72 года	3,8%	Бедренная кость

**Заключение**

1) большой объем костного мозга (в сравнении с пункцией);

2) техническая простота взятия материала;

3) высокое содержание стволовых клеток в костном мозге ампутированной конечности (возможность клеточной терапии без культивирования);

4) больной не подвергается пункции.

Ни один из существующих на данный момент источников СК человека или методов их получения не может полностью обеспечить потребности исследователей и требования клиницистов. Получение взрослых СК ассоциировано с применением инвазивных, травмирующих, болезненных для донора (не без риска осложнений) и, что немаловажно, дорогостоящих процедур. Все это, безусловно, ограничивает экспериментальные исследования СК человека и тормозит внедрение клеточных технологий в клиническую практику [1]. Ампутированную конечность, полученную в результате вынужденной операции, можно рассматривать как один из наиболее доступных источников стволовых клеток, в том числе и мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Способность к дифференцировке в различные клеточные типы делает МСК перспективными с точки зрения возможного использования для клеточной терапии целого ряда приобретенных и наследственных заболеваний. При введении в системный кровоток МСК способны целенаправленно мигрировать в участок поражения [8].

Можно неинвазивным методом получить большое количество материала для выращивания стволовых клеток, а также быстро создать банк стволовых клеток костного мозга и подбирать в будущем гистосовместимых доноров. Применение аутотрансплантации МСК кажется наиболее перспективным на данном этапе развития клинической науки, так как оно позволяет избежать этических и иммунных проблем, связанных с трансплантацией от донора к реципиенту. Кроветворные стволовые клетки уже на протяжении трех десятилетий используются для восстановления кровотока у пациентов с онкологическими и гематологическими заболеваниями. Активно разрабатываются подходы к применению трансплантации стволовых клеток при лечении заболеваний, которые до последнего времени считались неизлечимыми с помощью традиционных подходов [8].

Внедрение клеточных технологий в клиническую практику является актуальной задачей современной медицины.

**Список литературы**

1. Пальцев М.А. Медицина XXI века в свете клеточной биологии // Вести. РАМН. – 2004. – № 9. – С. 3–11.
2. Питерс-Хармел Э., Матур Р. Сахарный диабет: диагностика и лечение. – М.: ИД «Практика», 2008. 2. Руководство по лабораторной гематологии: пер. с англ. Б. Сисла; под общ. ред. А.И. Воробьева. – М.: Практическая медицина, 2011. – 352 с.
3. Руководство по лабораторной гематологии: пер. с англ. Б. Сисла; под общ. ред. А.И. Воробьева. – М.: Практическая медицина, 2011. – 352 с.
4. 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. – Vol. 56. – P. 283–294.
5. Jamshidi K., Swaim W.R. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: A new biopsy device // J. Lab. Clin. Med. – 1971. – № 77. – P. 335.
6. Krause J. Bone marrow overview. In: Rodak B, ed. Hematology: Clinical Procedures and Applications. – 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia // WB Saunders. – 2002. – P. 188–195.
7. 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. – Vol. 73. – P. 1919–1956.
8. Weaver C.V., Garry D.G. Regenerative biology: a historical perspective and modern applications // Regenerative Medicine. – 2008. – Vol. 3, № 1. – P. 63–82.

**References**

1. Pal'cev M.A. Medicina XXI veka v svete kletocnoy biologii // Vesti. RAMN. 2004. no. 9. pp. 3–11.
2. Piters-Xarmel E', Matur R. Saxarnyj diabet: diagnostika i lechenie. M.: ID «Praktika», 2008. 2. Rukovodstvo po laboratornoj gematologii / B. Sisl; per. s angl. pod obshh. red. A.I. Vorob'eva M.: Prakticheskaya medicina, 2011. 352 p.
3. Rukovodstvo po laboratornoj gematologii / B. Sisl; per. s angl. pod obshh. red. A.I. Vorob'eva M.: Prakticheskaya medicina, 2011. 352 p.
4. 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. Vol. 56. pp. 283–294.
5. Jamshidi K., Swaim W.R. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: A new biopsy device. J. Lab. Clin. Med. 77:335, 1971.
6. Krause J. Bone marrow overview. In: Rodak B, ed. Hematology: Clinical Procedures and Applications, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002; 188–195.
7. 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. Vol. 73. pp. 1919–1956.
8. Weaver C.V., Garry D.G. Regenerative biology: a historical perspective and modern applications // Regenerative Medicine. 2008. Vol. 3, no. 1. pp. 63–82.

**Рецензенты:**

Сухоруков А.М., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск;

Никифоров С.Б., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник института «Хирургия», г. Иркутск.

Работа поступила в редакцию 01.07.2013.