



К. Ю. Пашенко

*Харківський національний
медичний університет*

© Пашенко К. Ю.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ЗАГОЄННЯ КИШКОВОЇ
РАНИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

Резюме. В статті висвітлено досвід експериментального дослідження дії кріоконсервованих стовбурових клітин (СК) на загоєння кишкової рани. Відзначено високий регенераторний вплив СК на ізольований фрагмент сальника, що використовувався для укріплення лінії кишкових швів. На підставі гістологічних досліджень доведено, що застосування суспензії кріоконсервованих СК, фіксованих в ізольованій сальниковій латці, сприяє підвищенню біологічної герметичності швів кишкової рани у критичні для загоєння терміни за рахунок посилення ангиогенезу та продуктивного запалення. Отримані результати відкривають нові перспективи застосування СК у хірургічній практиці.

Ключові слова: *стовбурові клітини, кишкова рана, біологічна герметичність, експеримент.*

Вступ

Трансплантація стовбурових клітин (СК) може зробити революцію в медицині XXI ст., якщо людство навчиться керувати і правильно використовувати унікальні властивості цих клітин [2, 6]. Перспективи клітинної терапії для безлічі захворювань привертають увагу дослідників і клініцистів у всьому світі. СК відводиться роль інструмента, за допомогою якого можна відновити пошкоджені тканини і скорегувати порушення функцій органів. Застосування технології кріопрезервування, як відомо, дозволяє успішно зберігати клітини протягом тривалого часу [1]. Серед регіональних мультипотентних СК найбільшу увагу привертають стовбурові гемопоетичні, або кровотворні клітини (СКК). Це пов'язано з відносною простотою їх отримання, багаторічним досвідом дослідження і високим терапевтичним потенціалом. В даний час у ряді країн проводяться широкомасштабні клінічні випробування СКК, в ході яких показана їх висока ефективність при лікуванні спадкової та набутої гематологічної, онкологічної та імунної патології, а також в області регенеративної медицини [7]. У модельних експериментах на лабораторних тваринах показано, що максимальну кількість СКК можливо отримати з ембріональної печінки (ЕП), причому, популяційний склад клітин буде відповідати складу СКК кордової крові людини [4, 5]. У зв'язку з цим, ми вважали доцільним для проведення модельних експериментів на лабораторних тваринах джерелом отримання СКК використовувати ЕП щурів. У період ембріонального розвитку печінка містить незрілі попередники всіх кровотворних паростків,

включаючи СКК, що характеризуються високим проліферативним потенціалом [3].

Матеріали та методи досліджень

Суспензію СК отримували в умовах стерильного боксу ферментативно-механічним методом за Zuk P. et al. [8] з деякими модифікаціями. Клітини культивували в 24-лункових планшетах (Corning, США) в середовищі DMEM/F12 (Sigma). В якості кріопротектора використовували 10 % диметилсульфоксид. Відігрів заморожених КП проводили за температури 38–40 °С на водяній бані. Руйнування СК здійснювали шляхом їх триразового швидкого заморожування в рідкому азоті в середовищі без кріопротектора з наступним відігріванням на водяній бані за температури 37 °С. Підрахунок кількості клітин проводили в камері Горяєва згідно стандартної методики за формулою:

$$C = (I / N) \times 100 \%,$$

де С — життєздатність клітин;

N — загальна кількість клітин;

I — кількість непрофарбованих клітин.

Життєздатність СК до і після кріоконсервування оцінювали за трипановим тестом.

Експериментальне дослідження проведено на молодих щурах лінії Wistar масою 280–350 г, що утримувались в умовах віварію Інститута проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, згідно принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Національних норм біоетики. Усіх тварин було розділено на 3 групи по 24 щури в кожній. В першій експериментальній групі проводи-



ли дослідження із кріоконсервованими СК з метою виявлення їх безпосереднього впливу, у другій експериментальній групі – із лізатом СК з метою виявлення дії ко-факторів на загоєння кишкової рани. В групі контролю СК не використовувалися.

Операції проводили під загальною анестезією в умовах асептики. Виконували лапаротомію. В рану виводили сліпу кишку і пасмо великого сальнику. На стінку сліпої кишки наносили рану в поперечному напрямку до 0,5-0,7 см. Після цього проводили закриття рани кишкової стінки шляхом накладання однорядного безперервного шву атравматичною колючою глою vicryl 6/0 (рис. 1).

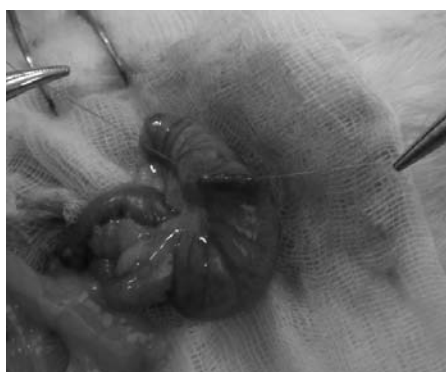


Рис. 1. Нанесення рани на стінку сліпої кишки, ушивання атравматичною глою

З великого сальнику виділяли ізольоване пасмо відповідного розміру, після чого проводили укривання лінії швів шляхом фіксації сальнику до серозно-м'язового шару окремими вузловими швами. У контрольній групі на цьому операцію завершували, проводили пошарове закриття операційної рани. В першій групі в пасмо сальнику ін'єкційно вводили 0,5 мл суспензії кріоконсервованих СК, в другій – лізат СК (рис. 2).

Забір біопсійного матеріалу для макро- та мікроскопічного дослідження проводили на 5, 7, 9, 14 добу після операції по 6 зразків на кожний термін.

Гістологічні препарати виготовлялися з парафінових блоків, на мікротомі МС-1, тов-

щина зрізів 5 мкм. Препарати виготовляли з серійних зрізів, фарбування гематоксилін-еозіном за методом Ван-Гізону. Вивчення препаратів проводилося на оптичному мікроскопі Olympus CX31RBSF, цифрова фотографія – фотокамерою Olympus C-4040 Zoom.



Рис. 2. Введення СК в сальникову латку

Результати дослідження

Оцінку результатів експерименту проводили за наступними критеріями:

1. Макроскопічний стан черевної порожнини: наявність чи відсутність загального перитоніту, вираженість злукового процесу.

2. Макроскопічна оцінка зони сліпої кишки: спроможність швів кишкової рани, наявність чи відсутність обмеженого перитоніту, нашарувань фібрину, вираженість локального злукового процесу, прохідність кишечника.

3. Макроскопічна оцінка сальникової латки: цілісність, колір, наявність фібринозних нашарувань, судинна реакція.

4. Мікроскопічна оцінка зони кишкового шву, сальникової латки: швидкість загоєння кишкової рани, морфологічні зміни рани стінки кишки, сальнику, вираженість перифокального запалення, зони некрозу, васкуляризації, регенерації сальнику.

5. Післяопераційні ускладнення: злукова непрохідність кишечника, перитоніт.

6. Кількість випадків загибелі тварин у післяопераційному періоді.

При розтині черевної порожнини ознак обмеженого локального чи розлитого перитоніту, неспроможності швів кишкової рани під сальниковою латкою, не спостерігалось в жодній групі тварин.

Перший забір гістологічного матеріалу проводився на 5 добу післяопераційного періоду. В черевній порожнині спостерігали помірно виражений злуковий процес з утворенням пухких спайок між петлями клубової та сліпої кишок, які легко роз'єднувались. Прхідність кишечника було збережено. Найбільш виражені макроскопічні зміни спостерігались

з боку сальникової латки. Остання залишалась фіксованою над зоною кишкової рани, цілісною, без нашаровувань фібрину в усіх групах. У контрольній групі та групі із лізатом СК сальник на 5–7 добу гіперемований, набряклий, червоного або рожевого кольору, щільної консистенції. На межі переходу тканини сальника до стінки кишки в зоні фіксації тканини нечітко відмежовувались одна від одної, погано відокремлювались. Після роз'єднання стінка кишки була гіперемованою, цілісною (рис. 3). На відміну від контрольної і другої групи, в першій групі (із застосуванням кріоконсервованих СК) макропрепарат мав низку відмінностей (рис. 4). Сальник мав бліде або рожеве забарвлення з судинними вкрапленнями та поодинокими крововиливами на поверхні. На межі переходу сальнику на стінку кишки тканини чітко відмежовувались, не диспергувались, мало місце міцне зрощення. Після розділення кишка зберігала природний колір, цілісність. Пасмо сальнику м'яко-еластичної консистенції, не подрібнювалось при розчавленні.

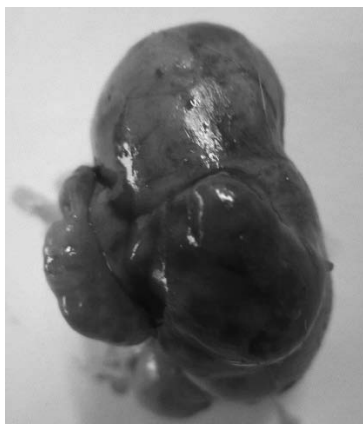


Рис. 3. Фото макропрепарату контрольної групи на 5-7 добу після операції

Схожа картина спостерігалася при заборі макропрепаратів на 7 добу після операції. У контрольній групі зберігалася виражена запальна реакція з боку ізольованого сальнику. Він залишався гіперемованим, набряклим,

відмічено відсутність чіткого відмежування між тканинами в зоні переходу на стінку кишки та міцне сполучення з нею.



Рис. 4. Фото макропрепарату основної групи на 5-7 добу після операції

В контрольній і другій дослідній групі на протязі від 7 до 14 доби відмічено послідовне ущільнення сальникової латки, незначне зменшення її в об'ємі (особливо до 14 доби). До 14 доби макроскопічні характеристики препаратів в усіх групах не мали суттєвих відмінностей.

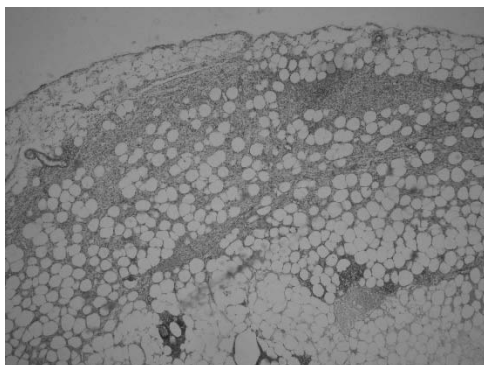
В ході експерименту загинуло дві тварини в контрольній і другій експериментальній групі на 9 та 10 добу післяопераційного періоду відповідно. Причиною смерті була obturatory ileocecal obstruction, що розвинулась на фоні злукової деформації петель термінального відділу клубової кишки.

Таким чином, при заборі препаратів в першій експериментальній групі з використанням кріоконсервованих СК відмічено значне посилення судинної реакції з боку фіксованого на стінці сліпої кишки сальника у порівнянні з контрольною та другою експериментальною групою. Максимальна виражена судинна реакція спостерігалася з 5 до 7 доби післяопераційного періоду. Також відзначено підвищення міцності з'єднання сальника з кишковою стінкою в периферійній зоні, що свідчить про підвищення герметичності кишкової рани.

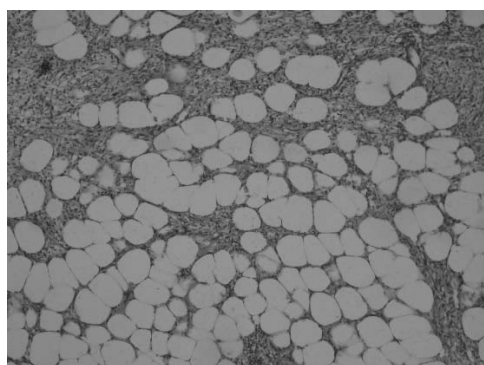


Аналізуючи результати гістологічних досліджень, у контрольній серії дослідів в зоні оперативного втручання на кишці з 5-ї по 14-у добу відбувалися послідовні морфологічні зміни в стані рани кишкової стінки та фіксованого сальника. Зона некрозу стінки кишки з перифокальним ексудативним запаленням поширювалась на тканину останнього, була більш вираженою до 7-ї доби і носила поширений характер. Запальні зміни зменшувались до 9-ї доби, а на 14-у добу відбувалося практично повне резидуальне загоєння рани стінки кишки.

Разом з тим, у сальниковій латці, відповідно з часом, також відбувалися послідовні морфологічні зміни. У прилеглий до стінки кишки жировій тканині утворилась велика зона некрозу з перифокальною запальною ексудативною клітинною інфільтрацією. По периферії цієї зони на 5-у добу з'являлися нерегулярні вогнищеві прошарки аваскуляризованої ніжно-волокнисто-клітинної сполучної тканини набряклі, нерівномірної товщини (рис. 5).



а



б

Рис. 5. Фото препарату контрольної групи (5 доба).
Забарвлення за Ван-Гізоном: а — збільшення $\times 120$,
б — $\times 200$

На 7-у добу відзначалась значна протяжність зони некрозу жирової тканини. Мав місце перифокальний продуктивний запальний процес, формування переривистих аваскуляризованих грубо-волокнисто-клітинних фіброзних прошарків. На 9-у добу ці прошарки мали більш поширений характер, дифузно проникаючи в постнекротично змінену жирову тка-

нину. До 14-ї доби з боку сальникової латки жирова тканина мала ознаки неповної регенерації та наявності багатоосередкових постліполітичних просторів. У тканині були присутні прошарки нерівномірної товщини з ніжно-волокнистою сполучною тканиною з залишками мононуклеарного запального інфільтрату.

У дослідній серії з введенням кріоконсервованих СК терміни загоєння самої рани стінки кишки помітно не відрізнялися від термінів загоєння в контрольній серії. Разом з тим відзначалась інша морфологічна динаміка змін у сальнику. На 5-у добу в зоні некрозу жирової тканини запальна реактивна клітинна інфільтрація була значно зменшеною, переважала судинна реакція з гіперемією судин, периваскулярними крововиливами. На відміну від контрольної серії, намічався більш організований по відношенню до некрозу перифокальний продуктивно-запальний процес за типом відмежування (осумкування) (рис. 6).

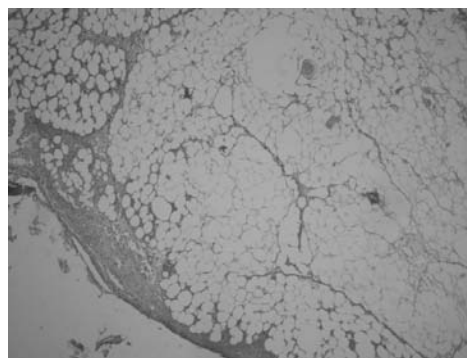


Рис. 6. Фото препарату експериментальної групи (кріоконсервовані СК), 5 доба. $\times 120$

На 7-у добу зона некрозу була оточена чітко сформованою ніжно-волокнисто-клітинною сполучнотканинною капсулою з вираженим переважанням судинного компонента в прошарках (порівняно з контрольною серією дослідів). Відзначалось вrostання прошарків сполучної тканини в постнекротичну зону до рівня стінки кишки. На 14-у добу в сальнику спостерігалось майже повне резидуальне відновлення жирової тканини (на відміну від контрольної групи). По зовнішній поверхні зона сальника була рясно васкуляризованою (рис. 7).

У досліді з введенням лізату СК характер морфологічних змін займав проміжне положення між контролем і дослідом. Відзначалась більш виражена ексудативна клітинна інфільтрація в зоні некрозу, на 14-у добу структура жирової тканини така ж, як у контролі.

В ході досліді з введенням СК в ізолюваний сальник для захисту кишкового анастомозу відзначено раннє відмежування зони некрозу сальника в області кишкової рани з вираженим переважанням продуктивного запалення

і зменшенням ексудативної стадії запального процесу. У ході відмежування відзначається більш виражений ангіогенез в сполучнотканинних прошарках, проростання залишків некротизованої жирової тканини до рівня кишкової стінки. У кінцевій стадії відбувалось практично повне резидуальне відновлення тканини сальника.

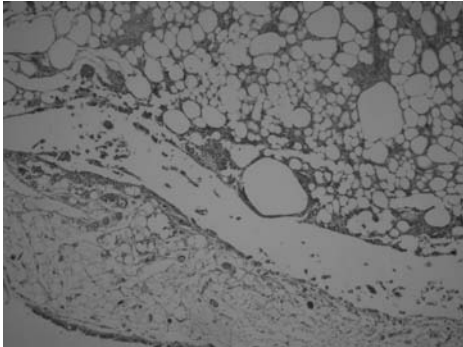


Рис. 7. Фото препарату експериментальної групи (криоконсервовані СК), 14 доба. $\times 200$

Питання про динаміку морфологічних змін у випадках з введенням лізату СК, можливо, потребує подальшого дослідження.

Висновки

1. В ході експерименту встановлено, що використання локально введених СК в ізолюване пасмо сальника поверх лінії кишкових швів безпосередньо не впливає на терміни загоєння кишкової рани, але дозволяє суттєво покращити біологічну герметичність анастомозу в критичні терміни загоювання (5–7 доба).

2. Підвищення герметичності досягалось в результаті впливу СК на процеси ангіогенезу і продуктивного запалення. Посилення ангіогенезу є наглядним доказовим фактором, адже для укріплення лінії кишкових швів використовували ізолюваний клапот сальнику з відсутністю живлячих судин.

3. Застосування клітинних технологій може використовуватися для підвищення герметичності кишкових анастомозів в хірургічній практиці, особливо в умовах ішемії кишечника, при повторних втручаннях, обширних резекціях для запобігання синдрому короткої кишки, при перитоніті, злуковому процесі, що супроводжуються порушенням цілісності кишкової стінки, десерозаціями.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека; эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование: монография / В. И. Грищенко, Г. С. Лобынцева, И. А. Вотякова, С. И. Шерешков. — К. : Наукова думка, 1988. — 190 с.

2. Петренко А. Ю. Трансплантация стволовых клеток — терапия XXI века. Характеристика и свойства стволовых клеток / А. Ю. Петренко, В. И. Грищенко // Проблемы криобиологии — 2001. — № 2. — С. 3–12.

3. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk, M. Zhu, A. Ashjian [et al.] // Molecular Biology of the Cell. — 2002. — Vol. 13, Issue. 12. — P. 4279–4295.

4. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis / Y. Wu, L. Chen, G. P. Scott, E. Tredget // Stem Cells. — 2007. — Vol. 26. — P. 2648–2659.

5. Paku S. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver / S. Paku, J. Schnur, P. Nagy // Am. J. of Pathol. — 2001. — Vol. 158. — P. 1313–1323.

6. Shafritz D. Rat liver stem cells: prospects for the future / D. Shafritz // Ibid. — 2000. — Vol. 32, Issue 6. — P. 1399–1400.

7. Strain A. J. Hepatic stem cell / A. J. Strain, H. N. Crosby // Gut. — 2000. — Vol. 46. — P. 743–745.

8. Weissman I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities / I. L. Weissman // Science. — 2000. — Vol. 287. — P. 1442–1446.



ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ
КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА
ЗАЖИВЛЕНИЕ КИШЕЧНОЙ
РАНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

К. Ю. Пащенко

Резюме. В статье представлен опыт экспериментального исследования воздействия стволовых клеток (СК) на заживление кишечной раны. Отмечено высокое регенераторное влияние СК на изолированный фрагмент сальника, который использовался для укрытия линии швов. На основании гистологических исследований доказано, что применение суспензии криоконсервированных СК, фиксированных в изолированной пряди сальника, способствует повышению биологической герметичности швов кишечной раны в критические для заживления сроки за счет усиления ангиогенеза и продуктивного воспаления. Полученные результаты открывают новые перспективы применения СК в хирургической практике.

Ключевые слова: *стволовые клетки, кишечная рана, биологическая герметичность, эксперимент.*

THE EXPERIMENTAL STUDY
OF CRYOPRESERVED STEM
CELLS EFFECT ON HEALING
OF INTESTINAL WOUND

К. Yu. Pashchenko

Summary. The article presents the experience of experimental studies of stem cells (SC) influence on healing of intestinal wound. The high regenerative effect of SC on isolated caul patch, which was used to cover the suture line, was noted. It was proved by histological studies, that using the cryopreserved SC suspension, fixed in isolated caul patch, promotes the biological integrity of intestinal wound in the critical healing period by increasing the angiogenesis and productive inflammation. These results open up new prospects for using SC in surgical practice.

Key words: *stem cells, intestinal wound, biological integrity, experiment.*