

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СЕЛЕЗЕНОЧНОЙ ТКАНИ И СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

*Под редакцией член-корреспондента РАМН,
профессора В.М. Тимербулатова*



Москва
Медицинская книга
2010

УДК 616-089.819.843: 32:616-008.853.3

ББК 52.5

T65

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в любой форме и любыми средствами без письменного разрешения владельцев авторских прав.

Авторы и издательство приложили все усилия, чтобы обеспечить точность приведенных в данной книге показаний, побочных реакций, рекомендуемых доз лекарств. Однако эти сведения могут изменяться.

Внимательно изучайте сопроводительные инструкции изготовителя по применению лекарственных средств.

Рецензенты: Григорьев Е.Г. — профессор, член-корр. РАМН;

Нигматуллин Р.Т. — доктор медицинских наук, профессор.

T65 Трансплантация селезеночной ткани и стволовых клеток в эксперименте и клинической практике / Под редакц. член-корр. РАМН, профессора В.М.Тимербулатова — М. : МЕДпресс-информ, 2010. — 216 с.
ISBN 978-5-86093-413-9

Монография посвящена современным аспектам использования клеточных культур селезеночной ткани и стволовых клеток в лечении ряда заболеваний. В работе рассмотрены общebiологические основы использования стволовых клеток в медицине, различия их источников, путей и методов применения, показания к данному методу терапии.

Экспериментальными исследованиями доказаны возможности и целесообразность трансплантации клеточных культур селезеночной ткани и стволовых клеток при инсулиновой недостаточности, циррозе печени, черепно-мозговой травме и ишемии нижних конечностей. Значительное место уделено трансплантации селезеночной ткани как источника стволовых клеток. Монография рассчитана на врачей различных специальностей и научных работников.

УДК 616-089.819.843: 32:616-008.853.3

ББК 52.5

ISBN 978-5-86093-413-9

© Коллектив авторов, 2010

© Оформление, оригинал-макет.

Мухомов Э.В., 2010

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ

Тимербулатов Виль Мамирович

доктор медицинских наук, член-корр. РАМН, профессор, зав. кафедрой
хирургии с курсом эндоскопии ИПО БГМУ, заслуженный деятель науки РФ,
заслуженный врач РФ

Фаязов Радик Радикович

доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургии с курсом
эндоскопии

Каюмов Фарит Амирьянович

доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, цитологии
и эмбриологии БГМУ

Хасанов Анвар Гиниятович

доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой
хирургических болезней БГМУ, заслуженный деятель науки РФ

Тимербулатов Шамиль Вилевич

кандидат медицинских наук, доцент кафедры хирургии
с курсом эндоскопии ИПО БГМУ

Тимербулатов Махмуд Вилевич

доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой факультетской хирургии
с курсом колопроктологии БГМУ

Рахматуллин Салават Ибрагимович

кандидат медицинских наук, проректор,
старший научный сотрудник ЦНИЛ БГМУ

Мухамедьянов Гайсар Саматович

кандидат медицинских наук, ассистент кафедры хирургических болезней
и новых технологий

Саубанов Марат Назирович

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ЦНИЛ БГМУ

Сибает Вазир Мазгутович

доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургии с курсом
эндоскопии ИПО БГМУ

Уразбахтин Ильдар Мидхатович

доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургии с курсом
эндоскопии ИПО БГМУ

Чанышев Булат Финатович

аспирант кафедры хирургии с курсом эндоскопии

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	8
-------------------	---

Глава 1. Трансплантация тканей и стволовых клеток как общебиологическая проблема	11
1.1. Современные представления о стволовой клетке	13
1.2. Применение специализированных (дифференцированных) клеток из растущих организмов для восстановительного лечения поврежденных органов	25
1.3. Перспективы развития клеточных технологий	32
1.4. Нормативные документы по использованию клеточной терапии в Российской Федерации	33

Глава 2. Трансплантация селезеночной ткани в профилактике и лечении инсулиновой недостаточности (клинико-экспериментальное исследование)	35
2.1. Современные подходы в трансплантационной хирургии поджелудочной железы: состояние вопроса	37
2.1.1. Современные методы трансплантационной хирургической коррекции инсулиновой недостаточности	37
2.1.2. Возможные пути совершенствования методов профилактики и коррекции инсулиновой недостаточности в хирургии поджелудочной железы путем трансплантации клеточных культур селезенки	49
2.2. Изучение возможности профилактики и коррекции экспериментальной инсулиновой недостаточности путем использования клеточных культур селезеночной ткани	54
2.2.1. Моделирование оптимальных вариантов экспериментальной инсулиновой недостаточности и способов ее коррекции	54
2.2.2. Профилактика экспериментальной инсулиновой недостаточности ауто трансплантацией селезеночной ткани	64
2.2.3. Морфологическая структура трансплантата селезеночной ткани, выполненной при экспериментальной инсулиновой недостаточности	67
2.2.4. Клеточная структура трансплантатов селезеночной ткани, использованных для коррекции экспериментальной инсулиновой недостаточности	69
2.2.5. Коррекция экспериментальной аллоксановой инсулиновой недостаточности путем трансплантации культивированных клеточных культур селезеночной ткани	72
2.2.6. Морфологическая структура поджелудочной железы при аллогенной трансплантации клеточных культур селезеночной ткани	74

2.2.7. Микроскопическое исследование культуры клеток селезеночной ткани	78
2.2.8. Морфологическое исследование клеток культуры селезеночной ткани	78
2.2.9. Морфологическое исследование аллогенных трансплантатов зародышевой селезенки	79
2.3. Исследование возможных путей профилактики инсулиновой недостаточности трансплантацией селезеночной ткани в абдоминальной хирургии	80
2.3.1. Спленоз как вариант коррекции нарушенной функции организма	80
2.3.2. Результаты клинического исследования	83
2.3.3. Морфологическое исследование добавочной селезенки	89
2.3.4. Способ профилактики инсулиновой недостаточности в абдоминальной хирургии	91
Глава 3. Клеточная терапия хронических гепатитов и цирроза печени (клинико-экспериментальное исследование)	97
3.1. Клеточная терапия хронических гепатитов и цирроза печени в эксперименте	97
3.1.1. Характеристика основных хирургических методов лечения цирроза и других деструктивных заболеваний печени ...	99
3.1.2. Анализ некоторых направлений в трансплантологии	101
3.1.3. Обзор методов экспериментальной и клинической трансплантации гепатоцитов эмбриона	105
3.2. Моделирование вариантов экспериментального хронического гепатита и цирроза печени и способов их коррекции	112
3.3. Морфологические изменения в печени и других органах после трансплантации	115
3.3.1. Морфологические изменения в здоровой печени после трансплантации эмбриональных гепатоцитов	115
3.3.2. Морфологические изменения в печени с моделью цирроза после трансплантации эмбриональных гепатоцитов	116
3.4. Аутологичная клеточная терапия хронических гепатитов и цирроза печени в клинической практике	123
Глава 4. Экспериментальное обоснование применения трансплантации эмбриональных нервных клеток в лечении тяжелых черепно-мозговых травм ..	129
4.1. Возможности использования стволовых клеток в неврологической и нейрохирургической практике: состояние вопроса	129
4.1.1. Актуальность проблемы лечения тяжелой черепно-мозговой травмы	134
4.1.2. Современные направления применения эмбриональной нервной ткани в лечении патологии центральной нервной системы	137

4.1.3. Представления о механизмах влияния нейротрансплантации на восстановление нарушенных функций центральной нервной системы	139
4.1.4. Применение трансплантации эмбриональной нервной ткани при тяжелой травме центральной нервной системы	144
4.2. Изучение гистоморфологических изменений структуры головного мозга при моделировании тяжелой черепно-мозговой травмы в эксперименте .	147
4.3. Изучение гистоморфологических изменений структуры головного мозга после трансплантации эмбриональной нервной ткани при моделировании тяжелой черепно-мозговой травмы в эксперименте	152
4.4. Трансплантация фрагментов эмбриональной коры головного мозга, подвергшейся глубокому замораживанию, в зону травматической деструкции коры головного мозга взрослых крыс	158
Глава 5. Клеточные технологии в лечении хронических сосудистых заболеваний нижних конечностей	163
5.1. Лечение хронических сосудистых заболеваний нижних конечностей: состояние проблемы	163
5.2. Моделирование вариантов клеточной терапии при ишемии нижних конечностей в эксперименте	166
5.3. Морфологическая характеристика клеточной терапии при экспериментальной ишемии нижних конечностей	168
Заключение	181
Список использованной литературы	190

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСТ — аутотрансплантация селезеночной ткани
ДПК — двенадцатиперстная кишка
ИН — инсулиновая недостаточность
КТ — компьютерная томография
НИИ — научно-исследовательский институт
НСК — нейрональные стволовые клетки
ПЖ — поджелудочная железа
ПОЛ — перекисное окисление липидов
РСК — региональные стволовые клетки
РСГК — региональные стволовые гематогенные клетки
СД I — сахарный диабет I типа
СДГ — сукцинатдегидрогеназа
УЗИ — ультразвуковое исследование
ФПЧ — фетальная печень человека
ФЭГДС — фиброэзофагогастродуоденоскопия
ЦНС — центральная нервная система
ЧМТ — черепно-мозговая травма
ЭСК — эмбриональные стволовые клетки
ЭЭГ — электроэнцефалография
ЭНТ — эмбриональная нервная ткань
NGF — факторы роста гепатоцита

ПРЕДИСЛОВИЕ

Согласно современным представлениям, физиологическая регенерация тканей взрослого организма и их репарация в случае повреждения осуществляются при участии низкодифференцированных клеток-предшественников или стволовых клеток. Основным источником стволовых клеток является костный мозг, способный, в дополнение к своей основной гемопоэтической функции, генерировать клетки-предшественники большого числа тканей организма. Помимо костного мозга, полипотентные резидентные стволовые клетки обнаружены и в других тканях взрослого организма — жировой, мышечной и нервной, а также в периферической крови и крови пуповины / плаценты. Установлено, что в зависимости от микроокружения стволовые клетки способны преодолевать гемопоэтический / мезенхимальный барьер, т. е. обладают высокой пластичностью в плане дифференцировки и трансдифференцировки.

Дальнейшее развитие фундаментальных исследований механизмов клеточной дифференцировки и регенерации тканей, создание, разработка новых биомедицинских технологий клеточной и генной терапии целиком зависят от наличия адекватного клеточного материала, не вызывающего иммунного отторжения трансплантатов. Существенное значение для развития методов заместительной терапии имеет использование в качестве трансплантационного материала стволовых клеток и клеток-предшественников различных систем человеческого организма, выделенных из тканей эмбрионов, плацентарной и пуповинной крови, собственных тканей больного. В настоящее время открываются реальные возможности получения стволовых клеток посредством переноса генетического материала индивидуального пациента в донорскую яйцеклетку, из которой в дальнейшем, в процессе формирования бластоцисты, могут быть выделены и стволовые клетки для трансплантации. В связи с поисками новых путей решения проблемы заместительной терапии с использованием стволовых клеток и клеток-предшественников внимание биологов и клиницистов привлекла способность этих клеток давать начало различным типам специализированных соматических клеток под влиянием ряда индуцирующих ростовых факторов и сохранять эту способность после длительной криоконсервации. Поэтому углубленное изучение в эксперименте на лабораторных животных механизмов пролиферации и дифференцировки гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток пуповинной и периферической крови, условий направленной их дифференцировки в культуре на сегодня является востребованным научным направлением.

Экспериментальные и клинические исследования отечественных и зарубежных ученых показали высокую эффективность терапии ство-

ловыми клетками в случае инфаркта миокарда, инсульта, цирроза печени, сахарного диабета, при травмах опорно-двигательного аппарата и мозга. Поэтому разработка в эксперименте на лабораторных животных моделей патологических состояний и оценка эффективности и безопасности использования стволовых клеток в их лечении позволят обосновать практическую значимость данного научного направления.

В России исследования в такой стратегически важной области науки, как применение клеточной и генной терапии, не получили должного развития. Хотя необходимо отметить, что в нашей стране активно проводятся исследования роли стволовых клеток в заживлении ран и ряде других восстановительных тканевых процессов. Достигнуты определенные успехи в исследовании и клиническом применении стволовых клеток крови, кожи, печени, поджелудочной железы, нервной системы. Так, в частности, детально изучены потенции стволовых клеток при восстановлении кроветворения после радиационных поражений, успешно разрабатываются методы восстановления эпителиальной ткани человека при трансплантации кератиноцитов, выращенных в культуре.

Надо отметить, что уровень отечественных научных разработок в ряде областей использования стволовых клеток для заместительной терапии вполне сопоставим с уровнем зарубежных достижений. В ряде институтов России получены культуры стволовых клеток млекопитающих и человека, ведутся исследования индукторов направленной дифференцировки этих клеток. В некоторых регионах России (Москве, Санкт-Петербурге, Самаре, Казани, Екатеринбурге, Оренбурге, Ижевске, Новосибирске) уделяется большое внимание созданию специализированных учреждений по заготовке, хранению, культивированию и применению стволовых клеток человека для лечения многих заболеваний. Причинами отставания отечественных исследований от современного уровня аналогичных зарубежных разработок в области клеточных технологий служат низкий уровень кооперации специалистов разных профилей, отсутствие целевого финансирования, необходимой национальной инфраструктуры, а также нормативно-правовой и этической базы реализации результатов фундаментальных исследований в клинической практике.

На базе ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Росздрава» в 2003 г. организована Проблемная научно-исследовательская лаборатория трансплантологии, основными задачами которой являются научная и методическая разработка вопросов, связанных с экспериментальным обоснованием использования клеточных технологий в медицине, возможностей применения их в клинической практике, а также организация забора, анализа и хранения стволовых клеток.

При разработке способов и методов выделения стволовых клеток в клинической практике применяются только разрешенные законодательством методики, обеспечивающие использование наиболее доступного материала для выделения клеток. Поэтому углубленное изучение использования аутологичных стволовых клеток костного мозга и пуповинной крови при критических и неизлечимых другими методами состояниях позволит определить эффективность и перспективность применения клеточной терапии стволовыми клетками.

В представленной монографии отражены результаты основных научно-исследовательских работ, проведенных на базе данной лаборатории.

*Член-корреспондент РАМН, профессор
В.М.Тимербулатов*

Глава 1.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ТКАНЕЙ И СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

XX век можно по праву назвать столетием триумфального развития методов восстановительного лечения необратимо поврежденных органов путем трансплантации донорских органов и клеток.

Благодаря клинической эффективности трансплантационные методы восстановительного лечения получили всеобщее признание, однако в последние три-четыре десятилетия продолжали изучаться и совершенствоваться преимущественно методы клеточной трансплантации.

Разработке методов клеточной терапии способствовали повсеместно усиливающийся дефицит донорских органов и высокая себестоимость трансплантации, опасность развития осложнений, сопутствующих большой хирургии, а также чрезвычайно высокий процент инвалидизации и гибели больных от хронических заболеваний жизненно важных органов.

Выяснилось также, что клеточная трансплантация имеет даже ряд преимуществ по сравнению с органными трансплантациями: метод имеет более низкую себестоимость, безопасен, позволяет обеспечить медицинской помощью большее число больных, а также отказаться полностью или использовать слабые иммуносупрессивные препараты.

Изучение кинетики клеточных популяций в быстро обновляющихся тканях, таких как кровь, эпителий кишечника, эпидермис, показало, что в них происходит очень быстрая смена дифференцированных клеток. Так, в процессе гемопоэза у человека ежедневно продуцируется и, следовательно, разрушается 1 млрд эритроцитов и 100 млн лейкоцитов. Такое количество специализированных клеток, естественно, может быть обеспечено только за счет пролиферации некоторого числа самоподдерживающихся клеток, которые стали рассматривать как стволовые.

Существование стволовых клеток (СК) в некоторых тканях сначала было предсказано теоретически. E.B.Wilson (1896) еще в первом издании своей книги «Клетка в развитии и наследственности» предположил существование стволовых клеток, обеспечивающих поддержание сперматогенеза.

Российский гистолог, профессор А.А.Максимов в 1908 г. постулировал существование стволовой кроветворной клетки, обозначив их как «малые лимфоциты». Современная история использования СК началась в 1968 г., когда группой ученых под руководством Роберта Гуда бы-

ла проведена трансплантация СК ребенку с тяжелым врожденным комбинированным иммунодефицитом. В 1969 г. E.D.Thomas произвел первую пересадку костного мозга больному лейкемией. В Советском Союзе в 1960–1970-е гг. ученые И.Л.Чертков и А.Я.Фриденштейн закладывают основы науки о СК костного мозга.

Признанием огромной значимости для человечества развития трансплантационного направления медицины явилось присуждение в 1990 г. единой Нобелевской премии в области медицины двум выдающимся исследователям-врачам: E.D.Thomas за разработку и внедрение трансплантации клеток костного мозга и G.Миттау за разработку и внедрение пересадок почек в клиническую практику.

Настоящий прорыв в этой области произошел в 1998 г., когда американским ученым Джеймсу Томсону и Джону Беккеру удалось выделить человеческие эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и получить первые линии этих клеток. Опубликованные в 1999 г. в журнале Science результаты экспериментов были признаны третьим по важности событием в биологической науке XX века после открытия двойной спирали ДНК и расшифровки генома человека. Присуждение Нобелевской премии в 2007 г. за исследования эмбриональных стволовых клеток у млекопитающих американским ученым Марио Капекки и Оливеру Смитису, а также британцу Мартину Эвансу убедительно подтверждает высокую перспективность данного направления в мировой науке.

Основные элементы концепции СК были разработаны при изучении системы гемопоэза и в дальнейшем распространены на другие быстро обновляющиеся ткани, в частности эпидермис. В последнее время появились сообщения о том, что СК присутствуют и в таких органах, как центральная нервная система, где ранее их существование не предполагали.

Стало очевидным, что с помощью метода клеточной трансплантации появляется возможность возмещения отсутствующих клонов специализированных клеток в поврежденных органах, увеличения пула функционирующих клеток, а также активизации в сохранившихся клетках поврежденного органа собственного резерва регенерации и пролиферации.

Первоначально возможности клеточной трансплантации стали изучаться при разработке нетрадиционных методов лечения инсулин-зависимого сахарного диабета и ряда дегенеративных заболеваний центральной нервной системы, прежде всего болезни Паркинсона (Полтавцева Р.А. и др., 2001; Угрюмов М.В., 2001; Шумаков В.И. и др., 1995; Lafferty K.J. et al., 1989).

В дальнейшем клеточные биотехнологии стали использоваться для лечения ишемических и травматических поражений разных органов, хронических воспалительных и некоторых системных заболеваний,

таких как атеросклероз, онкологические заболевания, мышечная дистрофия Дюшенна, болезнь Вильсона и др. Аналитический обзор этих данных содержится в работах ряда отечественных авторов (Берсенева А.В. и др., 2001; Викторов И.В. и др., 2002; Потапов И.В. и др., 2001; Репин В.С. и др., 1998; Шумаков В.И. и др., 2002).

1.1. Современные представления о стволовой клетке

На сегодня общеизвестно, что СК — это клетки, сохраняющие потенциал к развитию в разных направлениях. Из СК могут возникнуть и кожная, и нервная клетки, и клетки крови (Корочкин Л.И., 2003; Сухих Г.Т., Малайцев В.В., 2001; Lovell-Badge R., 2001). Считалось, что во взрослом организме СК отсутствуют, что их существование ограничивается самым ранним периодом эмбрионального развития. Однако в 1970-е гг. А.Я.Фриденштейн с соавторами обнаружили эти клетки в мезенхиме (строме) взрослого костного мозга (Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А., 1980). По принадлежности к строме их в дальнейшем стали называть стромальными СК. В 1970-е гг. были опубликованы работы, демонстрировавшие наличие СК практически во всех органах взрослых животных и человека (Викторов И.В. и др., 2002). В связи с этим принято разделять СК на эмбриональные стволовые клетки — ЭСК (их выделяют из эмбрионов на стадии бластоцисты) и региональные стволовые клетки — РСК (их выделяют из органов взрослых особей или из органов эмбрионов более поздних стадий).

СК являются клоногенными клетками, обладающими способностью к самообновлению и дифференцировке в другие типы клеток. СК характеризуются наличием трех главных свойств: 1) СК асимметрично делятся, т. е. при пролиферации СК вместо образования двух одинаковых дочерних клеток одна становится коммитированной (commit — «поручать», «вверять»), способной стать более специализированной, а другая остается неспециализированной; 2) СК способны к самообновлению, т. е. репопулируют (пролиферируют без дифференцировки) на протяжении неопределенно длительного времени или даже в течение всей жизни организма (long-term subset); 3) СК могут дифференцироваться в специализированные типы клеток (по крайней мере в клетки двух различных фенотипов), проходя стадию прогениторных клеток (progenitor — «предшественник») из так называемого коротко-срочно существующего пула неспециализированных коммитированных СК (short-term subset) (Онищенко Н.А., 2002; Репин В.С., 2002; Румянцев А.Г. с соавт., 2003).

Эмбриональные СК (ЭСК) возникают на ранних стадиях развития зародыша и представляют собой клетки с тотипотентными или плюрипотентными свойствами. Именно эти клетки являются истинно стволовыми клетками в организме. На вторые-четвертые сутки развития

зародыша (стадия морулы) формируются тотипотентные СК, которые в условиях *in situ* способны развиваться до стадии взрослого организма (однорайцевые близнецы) (Репин В.С., 2002; Сухих Г.Т. с соавт., 2001; Корочкин Л.И., 2003).

Оплодотворенную яйцеклетку — зиготу — также относят к тотипотентным СК, поскольку эта клетка воспроизводит все органы эмбриона и необходимые для его развития экстраэмбриональные структуры: хориональную часть плаценты, пуповину и др. Между тем для биоэтически допустимых экспериментов, а также для получения и сохранения в лабораторных банках тотипотентных ЭСК используют не зиготы, а клетки-дублиеры зиготы. Эти клетки получают лабораторным способом в обход процессов полового оплодотворения и беременности путем переноса ядра из какой-либо аллогенной соматической клетки в зрелую донорскую яйцеклетку, из которой предварительно был удален собственный пронуклеус (получение цитогрибидов) (Репин В.С., 2002; Cibelli J. et al., 1998; Kato V. et al., 1999).

Обычно же ЭСК выделяют из эмбриобласта на пятые-седьмые сутки развития человеческого зародыша (стадия бластоцисты). Эти клетки плюрипотентны и представляют собой группу зародышевых клеток (около 80–100 клеток), являющихся зачатком всех будущих высокоспециализированных клеток. Клетки эмбриобласта способны дифференцироваться во все типы клеток, производные всех трех эмбриональных зародышевых листков, образовывать любые ткани организма, но не целый организм, поскольку эти клетки не участвуют в образовании экстраэмбриональных структур (плаценты, пуповины и др.) (Репин В.С., 2002; Корочкин Л.И., 2003; Онищенко Н.А., 2002).

ЭСК характеризуются высоким уровнем экспрессии теломеразы (Малайцев В.В. и др., 2002), а также выработкой специфического транскрипционного фактора Oct-4, который необходим для поддержания фенотипа ЭСК и играет ведущую роль в детерминировании ранних этапов эмбриогенеза и дифференцировки.

В более позднюю фазу развития эмбриона (на 5–12-й неделе внутриутробного развития), вплоть до рождения, из него выделяют более зрелый тип ЭСК, которые называют СК поздних эмбрионов (5–8 недель гестации) или СК плодов (при сроках более восьми недель гестации). Поскольку поздние зародышевые (фетальные) СК выделяют на стадиях образования зачатков различных органов, возможности этих клеток к дифференцировке в различные типы специализированных клеток уже ограничены эмбриональным лепестком их происхождения, а также степенью зрелости (дифференцировки). Именно поэтому поздние зародышевые (фетальные) СК относят уже не к плюрипотентным, а к мульти- и даже унипотентным клеткам, т. е. к клеткам, способным создавать при культивировании лишь ограниченное число клеточных фенотипов. Мульти- или унипотентность СК поздних эм-

брионов (фетальных клеток), присущие им свойства хоуминга и клеточного химеризма, а также отсутствие опасности образования из них эмбриотератом при трансплантации во взрослый организм (в отличие от истинных ЭСК, полученных на самых ранних сроках гестации) позволяют рассматривать СК поздних эмбрионов (плодов) как разновидность региональных СК или СК взрослых организмов (Репин В.С., 2002; Малайцев В.В. и др., 2002).

ЭСК официально пока не используются в клинической медицине из-за морально-этических и правовых проблем, связанных с прекращением развития человеческих зародышей, а также опасности перерождения отдельных популяций этих клеток в злокачественные тератокарциномные опухоли после трансплантации во взрослый организм (25–30% наблюдений по Odorico Y.S. et al., 2001). Однако, несмотря на это, в ведущих медицинских центрах мира уже более пяти лет не прекращаются интенсивные научные исследования условий выращивания бессмертных линий ЭСК и их направленной дифференцировки в различные типы соматических клеток, так как технологическая возможность осуществления ген-индуцированной селекции этих клеток делает ЭСК уникальным потенциальным источником сырья для получения промышленных объемов высокоэффективных очищенных стандартизированных клеточных препаратов. Другими словами, ЭСК представляют собой новый мощный биоресурс медицины.

Для получения лабораторных линий дифференцированных соматических клеток обычно используют три природных источника ЭСК: бластоцисты человека (4–6 дней гестации), половой зачаток фетусов (4–5 недель развития), а также клетки зародыша на стадии гастрюляции (8–12 дней гестации), которые еще поддаются репрограммированию в линии ЭСК.

Однако основным источником сырья для получения клонов ЭСК остаются бластоцисты человека после искусственного оплодотворения яйцеклетки в условиях *in vitro*. Принято считать, что зародыш на стадии бластоцисты представляет собой «стволовую нишу», в которой четко разделены эмбриобласт и поддерживающие его клетки трофобласта, выполняющие роль своеобразного фидера. Клетки трофобласта вырабатывают кофакторы выживания и защиты, которые необходимы для сохранения и пролиферации плюрипотентных клеток внутреннего зародышевого слоя. Одновременно эти клетки блокируют неконтролируемую пролиферацию эмбриобласта (позже эпибласта) *in situ*. Только малая доля клеток эмбриобласта на этапе бластоцисты сохраняет тотипотентность, так как всего 1–2% клеток удастся переводить в бессмертную самопроизводящуюся линию ЭСК (Репин В.С. и др., 2002).

Репрограммирование эмбриобласта в линию ЭСК начинают с механического отделения эмбриобласта от трофобласта. Затем фрагменты

эмбриобласта помещают на фидер из фетальных фибробластов без факторов, ограничивающих пролиферацию тотипотентных клеток.

J.A.Thomson и др. (1998) предложили для выращивания ЭСК использовать среду Дульбекко над облученным фидером (ингибирована пролиферация фетальных фибробластов) с одновременным добавлением в среду культивирования трех ростовых цитокинов: LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-6, SCF (Stem Cell Factor). Для более активной пролиферации ЭСК рекомендуется дополнительно использовать FGF-base, EGF, TGF- β .

В последние годы были разработаны методы длительного пассирования ЭСК, в течение одного-двух и более лет, без изменения их генофенотипа, причем культуры ЭСК могли пройти за этот срок более 450 циклов самоудвоения без анеуплоидии и малигнизации. Необходимо подчеркнуть, что рост ЭСК в культуре идет клонами с образованием клеточных агрегатов (эмбриоидных тел). Образование эмбриоидных тел начинается с агрегации однородных СК, которые пролиферируют и по мере нарастания клеточной массы (клеточности) изменяют состав внутренней локальной микросреды с формированием концентрационных градиентов веществ, которые приводят к изменению экспрессии генов и развитию процессов дифференцировки клеток внутри эмбриоидного тельца. Когда клеточные агрегаты достигают размеров 50–80 клеток, наступает равновесие между пролиферацией и апоптозом. Спонтанную дифференцировку и гибель клеток обычно предотвращают повторным диспергированием агрегатов. Дифференцировка ЭСК наступает после смены среды, удаления фидера и LIF, а также добавления сыворотки, что ведет к прикреплению клеток к подложке, образованию монослоя и формированию их цитоскелета. Для прикрепления клеток к подложке добавляют не только сыворотку, но и индукторы цитодифференцировки в строго определенных концентрациях, преимущественно белки, которые участвуют в ранних стадиях формирования различных клеточных типов. Для этих целей используют активин А, который индуцирует преимущественно мезодермальную дифференцировку и главным образом образование мышечных клеток (скелетных, кардиомиоцитов); эпидермальный фактор роста, который индуцирует образование мезодермальных и эктодермальных клонов (специфичен для образования клеток кожи); нейрогенный фактор роста, который способствует образованию клонов клеток мезодермы, эктодермы и эндодермы (специфичен для образования клеток печени и эндокринной части поджелудочной железы). При обработке ЭСК нейрогенным фактором роста и ретиноевой кислотой формируется клеточная популяция, содержащая около 50% клеток, несущих маркеры нервных клеток (окраска антителами к нестину, виментину, polysyalated — NCAM, MAP-2, NeuN, betaIII-tubulin) (Репин В.С. и др., 2002).

Показано, что дифференцировка ЭСК в нейроны, кардиомиоциты и клетки других фенотипов (хондроциты) идет *in vitro* в среднем 10–15 дней, тогда как аналогичный процесс в зародыше занимает 5–7 дней. Очевидно, это связано с тем, что наработка соматических клеток из ЭСК идет в обход эмбриогенеза, когда отсутствуют условия для организованного взаимодействия мезенхимы и провизорных клонов клеток всех трех зародышевых листков. В результате только часть событий клеточного и органного морфогенеза хаотически воспроизводится в культуре эмбрионидных агрегатов (Онищенко Н.А., 2002; Репин В.С. и др., 2002).

Важно отметить также, что при создании условий дифференцировки клеток в определенном направлении только незначительная часть клеток начинает проявлять свойства заданного фенотипа (не более 1/3). Именно поэтому получение клеток определенного фенотипа пока представляет собой непростую задачу, решение которой осуществляется путем этапных воздействий определенными химическими сигналами на спонтанно формирующиеся эмбрионидные агрегаты ЭСК (обычно мыши и/или человека) с расшифровкой экспрессирующихся при этом генов, а также путем ген-индуцированной стимуляции дифференцировки в предварительно трансфицированных ЭСК (Репин В.С. и др., 2002).

Так как клетки, образующиеся в процессе дифференцировки ЭСК, приобретают способность стабильно и длительно сохранять свой фенотип в лабораторных условиях (в отличие от РСК), это свойство искусственно полученных соматических клеток открывает перспективу наработки и хранения терапевтически эффективных доз дифференцированных клеток, а также применения их с лечебными целями. Например, в опытах на животных уже показано (Doevendans P.A. и др., 2000; Kehat I. и др., 2001), что кардиомиоциты, выращенные *in vitro* из плюрипотентной зародышевой ткани, активно встраиваются в миокард развивающихся зародышей (тканевой химеризм), а также в ишемически поврежденную ткань. Предшественники олигодендроцитов, лабораторно полученные из ЭСК, при трансплантации стимулируют ремиелинизацию в поврежденном мозге животных (Brustle O. et al., 1999; Liu S. et al., 2000). Лабораторно полученные бета-клетки снимают гипергликемию у животных с экспериментальным диабетом (Sofia B. et al., 2000).

Ярко выраженные потенции ЭСК к репопулированию и дифференцировке в различные типы соматических клеток *in vitro* и отчетливо выявившаяся возможность осуществления ген-индуцированной селекции ЭСК являются важнейшими предпосылками для реализации промышленного получения высококачественных стандартизированных линий клеток заданного направления дифференцировки (получение клеточных препаратов); возможность проведения ген-индуци-

медицинский университет МЗ РФ»

БИБЛИОТЕКА

ванной селекции позволяет также устранить условия для появления в культуре недифференцирующихся (онкогенных) клонов клеток, создающих опасность перерождения их в тератокарциномные опухоли при трансплантации. Технологические достижения последних лет обусловили тот факт, что ЭСК стали наиболее привлекательным и многообещающим объектом исследований в современной клеточной биологии и медицине (Репин В.С. и др., 2002; Boyle R.J. et al., 2001; Geiger H. et al., 1998).

Между тем отсутствие удовлетворительного законодательного решения проблем терапевтического клонирования ЭСК человека как в России, так и других странах мира тормозит изучение клинической эффективности применения предифференцированных ЭСК, а также препятствует оценке предложенных способов защиты реципиентов от переноса им при трансплантации онкогенных клонов клеток. В результате ЭСК пока по-прежнему остаются только уникальным объектом лабораторных и экспериментальных исследований.

Региональные или взрослые СК являются наиболее зрелым типом СК, которые обнаруживаются в виде редких включений во многих тканях и органах сформировавшегося плода и взрослого организма. Происхождение региональных СК (РСК), а также свойства этих клеток остаются пока недостаточно исследованными, и поэтому представления о них не всегда точны и несколько различаются у разных авторов. Морфологически РСК трудно идентифицировать, однако эти клетки экспрессируют некоторые уникальные маркеры, которые позволяют выявлять их в тканях. Так, антиген CD34 представлен на большинстве гемопоэтических СК; Stro-1, CD117, CD133 — на мезенхимальных (стромальных) СК; белок промежуточных филаментов нестин — в цитоплазме нейтральных СК и т. д.

Как и ЭСК, РСК относят к числу недифференцированных клеток, которые, однако, репопулируют циклично в течение длительного времени, продолжительность которого определяется сроками сохранности процессов самообновления клеток в органах и тканях.

Принято считать, что при дифференцировке *in vivo* РСК проявляют лишь унипотентные свойства, за счет которых восполняется пул специализированных клеток и поддерживается стабильность процесса самообновления ткани (физиологическая регенерация). В то же время некоторые авторы (Slack J.M. et al., 2000) полагают, что при повреждении ткани РСК могут приобретать свойства мультипотентных СК и дифференцироваться в другие типы клеток, имеющие общность эмбрионального лепестка происхождения. Между тем отчетливо мультипотентные свойства РСК в настоящее время показаны лишь при культивировании в условиях *in vitro* и не для всех типов РСК.

По мере старения организма количество РСК в органах прогрессивно уменьшается. Так, если в зародыше млекопитающих на стадии

органогенеза половина всех клеток приходится на провизорные не-коммитированные клоны СК, то уже в фетальной печени одна стволовая гемопоэтическая клетка приходится на 100 тыс. гемопоэтических клеток. В кроветворной ткани взрослого человека одна стволовая клетка приходится на 2–10 млн коммитированных гемопоэтических клеток (т. е. клеток разной степени дифференцировки) (Репин В.С. и др., 2002). С возрастом в костном мозге уменьшается не только общее количество гемопоэтических СК, но особенно количество мезенхимальных (стромальных) СК. Так, если сразу после рождения в костном мозге на 10 тыс. гемопоэтических СК приходится одна стромальная СК, то у подростков этих клеток уже в 10 раз меньше; к 50 годам на 500 тыс. кроветворных СК приходится одна стромальная СК, а в 70 лет одна стромальная СК приходится на 1 млн гемопоэтических СК. Возрастное снижение пула СК в органах может быть обусловлено тем, что более продвинутые в дифференцировке клетки не только конкурируют со стволовыми / прогениторными клетками за лимитирующие факторы питания, но также секретируют в среду факторы, блокирующие мультипотентность генома незрелых клеток (Репин В.С. и др., 2002).

Возрастное снижение пула РСК в органах, их сниженная теломерная активность, унипотентность и проявление мультипотентных свойств лишь в специально созданных условиях микроокружения, а также трудности выявления четких различий между РСК и клетками-предшественниками, которые, как известно, являются частично дифференцированными клетками, заставляют предполагать, что РСК в органах являются не истинными СК, а коммитированными клетками-предшественниками.

Региональные СК, в частности аутологичные СК костного мозга, в отличие от ЭСК, уже используются в клинике для восстановительного лечения нарушенных функций сердца, печени, а также для устранения дефектов костей (Шумаков В.И. и др., 2003; Assmus B. et al., 2002; Orlic D. et al., 2001; Perin E.C. et al., 2003; Stauer B.E. et al., 2003; Yau T.M. et al., 2003) и заживления ожоговых ран (Расулов М.Ф., 2004). Активное использование РСК для целей регенерационной медицины оказалось возможным благодаря отсутствию правовых ограничений на их применение, доступности получения, онкологической безопасности и иммунологической совместимости этих клеток, т. к. донорами РСК обычно являются сами реципиенты (больные).

В отличие от плюрипотентных ЭСК, РСК уни-, ди- и мультипотентны. Они имеют сниженную популяционную активность (низкая активность теломеразы) и ограниченный потенциал дифференцировки. Именно поэтому для РСК в условиях *in vitro* и *in vivo* особенно важны сигналы культурального и тканевого микроокружения, под влиянием которых РСК дифференцируются в соответствующие зрелые

специализированные клетки, поддерживая стабильность процессов самообновления органов и тканей (физиологическая регенерация). Для некоторых типов РСК (СК костного мозга) доказана их способность к миграции в зону поражения.

Проблемы, возникающие при использовании РСК для клеточной терапии, связаны с тем, что еще недостаточно изучены факторы их дифференцировки *in vivo* и *in vitro*: отсутствуют окончательные ответы на вопросы, можно ли повысить пролиферативную активность РСК *in vitro* для получения достаточных количеств донорского материала и какие сигналы *in vivo* регулируют процессы пролиферации и дифференцировки этих клеток; кроме того, отсутствуют стандартизированные и не слишком дорогостоящие технологии получения очищенных РСК и не изучены возможности устранения возрастного снижения количеств РСК в органах и их терапевтической эффективности. Остаются неизученными механизмы реализации терапевтических эффектов РСК в организме, связь биологической активности собственных РСК с тяжестью состояния больного, возможность восстановления нарушенных функций необратимо поврежденного органа с помощью тех аутологичных РСК, которые длительное время находились в организме в условиях ингибирующего воздействия на них факторов развивающегося иммунодефицита, и т. д.

Основным источником получения РСК для клеточной терапии служат собственные ткани взрослого человека. Перечень тканей, содержащих СК, постоянно расширяется, и в настоящее время включает костный мозг, периферическую и пуповинную кровь (Румянцев А.Г. и др., 2003; Исаев А.А. с соавт., 2008; Yau T.M. et al., 2003), головной мозг (зубчатое ядро гиппокампа, обонятельная луковица и субэпиндимальная зона латеральных желудочков) и спинной мозг (Temple S. et al., 1999; Gage F. et al., 2000), дентальную пульпу, кровеносные сосуды (Keller G., 2001; Poole T.Y. et al., 2001), скелетные мышцы (сателлитные клетки) (Kuznetsov S.A. et al., 2001), эпителий кожи (Slack J.M., 2000) и пищеварительного тракта (Potten C. et al., 1998; Slack J.M., 2000), роговицу, ретину, печень (Alison M.R. et al., 1998; Theise N.D. et al., 1999) и поджелудочную железу (Gmyr V. et al., 2000; Zulewski H. et al., 2001).

Практически наиболее удобными источниками получения РСК из органов взрослого человека являются костный мозг, периферическая и пуповинная кровь (Румянцев А.Г. и др., 2003; Cairo M.S. et al., 1997; To L.B. et al., 1997), а также биопсийный материал (глубокие слои носоглоточного эпителия, имеющие нейрональное происхождение, клетки печени, эпителий кишечника и др.). Поскольку свойства СК поздних эмбрионов и плодов близки к свойствам РСК взрослых организмов (они отличаются более высокой популяционной активностью), абортивный материал также может служить источником получения РСК начиная с 5–8–12-й недели гестации.

Перед трансплантацией РСК культивируют — освобождают от тканевого балласта и создают условия для клонирования и дифференцировки, так как известно, что выход СК в дифференцировку и направление дифференцировки регулируются сигналами микроокружения и их специфичностью (Малайцев В.В. и др., 2002).

При культивировании РСК, как и при культивировании ЭСК, является общая закономерность выживания клеток в культуре. Она состоит в том, что при создании условий направленной дифференцировки только часть клеток обнаруживает свойства дифференцировки в заданном направлении (это подтверждается особенностями морфологической структуры, гистохимическим или иммуно-гистохимическим выявлением маркерных белков). Остальные клетки (до 2/3 клеточной популяции), образуя структуры кластеров с дифференцированными клетками, относятся к клеткам иного направления развития. Эти клетки имеют общность эмбрионального происхождения с дифференцированными клетками и, очевидно, в культуре выполняют функции фидерного слоя. Так, нейроны в культуре окружены клетками глии, также имеющими эктодермальное происхождение (Полтавцева Р.А. и др., 2001; Ревин А.В. и др., 2001), миоцито- и кардиомиоцитоподобные клетки окружены фибробластами — клетками мезодермального происхождения (Шумаков В.И. и др., 2002).

Невозможность выклонировать чистую культуру дифференцированных клеток подтверждает участие РСК в формировании структурной целостности ткани и в создании ее апуд-системы, обеспечивающей адекватное функционирование в ней специализированных клеток. Неудивительно поэтому, что в условиях *in vitro* либо при повреждении тканей РСК проявляют свои уни-, ди- или мультипотентные свойства, дифференцируясь в клетки тех тканей, из которых они происходят.

Так, из фракции гемопоэтических СК костного мозга могут быть получены клетки крови и иммунной системы; из фракции стромальных СК костного мозга — другие клетки мезенхимального происхождения: остеобласты, хондроциты, фибробласты, тендоциты, миоциты, кардиомиоциты, адипоциты и др. (Jaiswal R.K. et al., 2000; Liechty K.W. et al., 2000; Pittenger M.F. et al., 1999); из нейрональных СК могут быть получены различные нейроны (холинэргические, пептидэргические, дофаминэргические, GABA-эргические и др.), а также глиальные клетки (астроциты, олигодендроциты, шванновские — миелинпродуцирующие клетки, клетки микроглии) и клетки наружного (кожного) эпителия (Morrison S.J. et al., 1999; Vescovi A.J. et al., 1999); из СК печени (овальные клетки) могут быть получены гепатоциты и эпителий желчных протоков (Germain J. et al., 1988; Lazaro C.A. et al., 1998; Thorgeirsson S.S., 1993); из СК кишечного эпителия — α -, β - и γ -клетки поджелудочной железы, а также эпителий кишечника (Bonnet-

Weir S., 2000); из прогениторных эпителиальных клеток поджелудочной железы — гепатоциты (Dabeva M. et al., 1997) и т. д.

В последние годы РСК стали объектом особенно пристальных исследований. Появились работы, указывающие на способность РСК дифференцироваться *in vivo* не только в клетки того органа или той системы организма, к которой они принадлежат, но и в клетки других органов и тканей, происходящих даже из другого зародышевого листка. Это свойство РСК, названное пластичностью (Brazelton T.R. et al., 2000; Krause D.S. et al., 2001) или трансдифференцировкой (Anderson D.F. et al., 2001; Lagasse E. et al., 2000), возбудило надежды на возможность регенерации практически любого поврежденного органа и явилось причиной, теперь уже, правда, стихающего, бума вокруг уникальности терапевтических свойств этих клеток (источники получения «запчастей» организма). Так, в ряде работ утверждалось, что СК нервной ткани могут превратиться в миоциты и гемопоэтические клетки (Galli R. et al., 2000; Vescovi A.J. et al., 1999), СК печеночной ткани — в миоциты (Malouf N.N. et al., 2001); появились утверждения, что гемопоэтические СК костного мозга также могут трансдифференцироваться в скелетные мышцы (Ferrari G. et al., 1998; Gussoni E. et al., 1999), гепатоциты (Lagasse E. et al., 2000), эпителиальные клетки (Krause D.S. et al., 2001), нейроглию (Eglitis M.A. et al., 1997), нейроны (Brazelton T.R. et al., 2000; Mezey E. et al., 2000), эндотелиальные клетки и кардиомиоциты (Jackson K. et al., 2001; Orlic D. et al., 2001) после трансплантации их в соответствующие поврежденные ткани организма. Для доказательства трансдифференцировки гемопоэтических СК использовали клетки костного мозга, которые предварительно маркировали GFP (зеленый флуоресцирующий протеин). После пересадки таких клеток, например, в поврежденный миокард часть кардиомиоцитов становилась меченной этим красителем, и это дало авторам основание утверждать, что произошло превращение клеток костного мозга в клетки сердечной мышцы (Orlic D. et al., 2001).

Аналогичные сведения приводят K.Jackson et al. (2001), которые, вводя облученным грызунам в зону инфаркта фракцию стромальных клеток костного мозга, обнаруживали затем в этих клетках кардиоспецифический белок — тропонин. Во все увеличивающемся числе работ признается, что при повреждении миокарда, печени, мозга и других органов костный мозг служит поставщиком клеток-предшественников для этих органов, поскольку клетки регенерирующих органов после трансплантации костного мозга приобретают черты донорского фенотипа. Однако остается неясным, какие клетки костного мозга поступают в поврежденные органы и каким путем они участвуют в процессах регенерации — путем трансдифференцировки или путем клеточного слияния (*fusion*), т. е. химеризации (гибридизации) клеток.

В подавляющем большинстве работ последних двух лет с помощью молекулярно-генетического метода RT PCR, позволяющего по специфичности ДНК выявлять индивидуальные (клеточноспецифические) поверхностные маркерные белки, метода FACS (Fluorescence-Activated Cells Sorter), цитогенетического метода FISH (Fluorescence in Situ Hybridisation), исключительно точного при наличии различий между кариотипом донора и реципиента, было установлено, что гемопоэтические СК костного мозга участвуют в процессах регенерации не за счет их трансдифференцировки, а преимущественно путем их слияния (химеризации) с клетками поврежденного органа (Alvarez-Dolado M. et al., 2003; Murry C.H. et al., 2004; Nygren J. et al., 2004; Wang X. et al., 2003).

Следует заметить, что слияние клеток является, по-видимому, одним из распространенных механизмов клеточного выживания в организме. Склонность к слиянию имеют моноциты, макрофаги (образование гигантских клеток с несколькими ядрами вокруг инородного тела, слияние В-лимфоцитов с дендритными клетками), а также эритроциты. Возникновение «гибридных эритроцитов», имеющих антигенные маркеры и донора, и реципиента, рассматривается даже как непременный атрибут HLA-идентичных трансплантаций костного мозга (Зотиков Е.А., 2003). Гибридные многоядерные клетки (со свойствами и донора, и реципиента) после трансплантации костного мозга обнаруживают также в гепатоцитах регенерирующей печени, в клетках миокарда, в эпителии почки, органах желудочно-кишечного тракта и в эпителии тимуса, что может приводить к толерантности по отношению к донорским клеткам (Alison M.R. et al., 1998; Alvarez-Dolado M. et al., 2003; Blau H.M. et al., 2001; Korbiling M. et al., 2002; Okamoto R. et al., 2002; Poulson R. et al., 2001).

Известно, что для реализации процесса гибридизации соматических клеток необходимо слияние мембран контактирующих клеток, для чего они должны быть обратимо повреждены, а также наличие у контактирующих клеток высокого пролиферативного потенциала. В результате в момент деления таких клеток, когда их ядерные оболочки исчезают, создаются реальные условия для слияния хромосом и образования гибридной клетки (Бабаева А.Г. и др., 2003). Неудивительно поэтому, что большинство авторов подчеркивает необходимость для гибридизации высокого пролиферативного уровня контактирующих клеток. Именно такие условия возникают при терапии СК костного мозга, которые сами обладают высокой популяционной активностью и при введении в ткань пораженного органа вступают в контакт с его регенерирующими клетками.

Особого внимания заслуживает еще одно обстоятельство. Показано, что усиленный синтез ДНК клетками регенерирующих органов сопровождается явлением реутилизации ДНК из клеток другого гистоти-

па, в частности из введенных лимфоидных клеток. Из этих наблюдений можно заключить, что костный мозг, будучи лимфоидным органом, становится донором клеток-предшественников моноклеарного ряда, ядерный материал которых может принять участие в процессах слияния (химеризации) клеток. Работы последних лет не исключают возможность существования таких механизмов (Alvarez-Dolado M. et al. 2003; Ziegelhoeffer T. et al., 2004), так как было показано, что при введении свежeweделенных клеток костного мозга они сливались с соматическими клетками печени, головного мозга и сердца без признаков их трансдифференцировки, но при этом в значительной части трансплантированных клеток (выявлялись по GFP) экспрессировались клетки с антигенами CD45⁺ (лейкоциты) и в меньшей степени — с антигенами CD3⁺ (Т-лимфоциты); остальные клетки идентифицировались как фибробласты. В работе J. Balsam et al. (2004) было также подтверждено, что фракция долгоживущих гемопоэтических СК (c-kit^{enz}, Lin-c-kit⁺ и c-kit⁺Thy1.1^{lo} Lin-Sca-1⁺), введенная в ишемизированный миокард мышей и выявляемая по GFP, не экспрессирует кардиоспецифические белки, а также маркеры гладкомышечных или эндотелиальных клеток (α -актинин, коннексин, гладкомышечный актин). В то же время эти клетки дифференцируются исключительно в традиционные гемопоэтические клетки, генерируя образование миелоидных (CD45, Gr-1), реже — В-лимфоидных (B220) и еще реже — Т-лимфоидных (CD3) типов клеток, одно из назначений которых, как известно, — участвовать в иммунной регуляции местных восстановительных процессов.

Если все-таки признать существование механизма трансдифференцировки РСК (прежде всего гемопоэтических СК костного мозга) в клетки иного гистотипа, то возникает ряд вопросов, которые требуют специальных ответов.

Один из них состоит в том, почему СК, например, нервной ткани, печени, гемопоэтической ткани «охотно» превращаются в клетки другой ткани и весьма пассивно участвуют в регенерации собственной ткани. Второй вопрос касается способности СК вызывать процесс дедифференцировки и сделать его полным перед трансдифференцировкой. Между тем с помощью современных методов исследований не удается подтвердить существование механизмов дедифференцировки в клетках регенерирующих органов. Был подтвержден лишь возврат при этом к более ранним стадиям зрелости клеток, без утраты ими своего исходного гистотипа, причем глубина этого процесса при регенерации разных тканей была неодинаковой (Зотиков Е.А. и др., 2003).

Из клеток же костного мозга только лимфоциты способны превращаться в менее зрелые формы — лимфобласты и приобретать утраченную способность к делению. Гемопоэтическая СК по своим морфологическим признакам имеет сходство с малым лимфоцитом, и поэтому

возможность превращения ее в клетки других тканей требует строгих доказательств, получение которых, по-видимому, следует ожидать в опытах с культурами клеток.

Имея некоторый опыт работы с СК костного мозга, в том числе с клетками гемопоэтического ряда, Н.А.Онищенко, В.И.Шумаков и др. (2003) подтверждают их чрезвычайно активную роль в ускорении восстановительных процессов в поврежденных органах и тканях. Они полагают, что эту важную роль СК костного мозга реализуют не за счет заместительных, а за счет своих индуктивных и информационных свойств, высокий уровень которых поддерживается в этих клетках их популяционной (генной) активностью и адекватным микроокружением. Использование СК от пожилых доноров и трансплантация их в зоны с глубоким нарушением трофики (развитие фиброза) должно «очевидно» вести к ослаблению их регуляторной роли.

1.2. Применение специализированных (дифференцированных) клеток из растущих организмов для восстановительного лечения поврежденных органов

Терапия специализированными донорскими клетками, выделенными из растущих организмов, по сути представляет собой дальнейший этап развития метода тканевой терапии, учитывающий достижения современной клеточной биологии и трансплантационной иммунологии.

Метод провозглашает отказ от медикаментозной коррекции биохимического беспорядка в пораженных клетках и нацелен на возмещение в органах отсутствующих клонов специализированных клеток, а также участие трансплантированных клеток в восстановлении гомеостатических функций сохранившихся клеток пораженного органа.

В практике применения клеточных технологий можно четко выделить два подхода, которые различаются научно-методологическими принципами, положенными в их основу. Первый подход — более ранний — связан с применением специализированных (дифференцированных) клеток растущих организмов (человека и животных). Второй подход начал развиваться в последние годы и связан с разработкой технологий применения недифференцированных (стволовых) клеток человека.

Технически эти методы клеточной терапии в клинике стали выполнять двумя способами: путем непосредственной трансплантации донорских клеток в строго заданные участки тканей поврежденных органов (например, доставка нейрональных клеток с помощью стереотаксической техники) или доставки клеток в соответствующие органы то-

ком крови (например, при интрапортальном введении клеток островковой ткани поджелудочной железы), а также путем дистанционного управления процессами регенерации и пролиферации в поврежденных органах за счет временного размещения донорских клеток в экстракорпоральном контуре перфузионных систем, осуществляющих инкубацию донорских клеток в потоке крови или плазмы больного (например, клеток печени, селезенки) (Онищенко Н.А. и др., 1999; Шумаков В.И. и др., 1998; Demetriou A.A., 1995).

Изучение корректирующих возможностей этих двух технически различающихся методов клеточной терапии позволило установить ряд общих закономерностей реализации их воздействия на организм. Было констатирувано, что стабильность, выраженность и длительность лечебного эффекта при использовании клеточных технологий находятся в прямой зависимости от количества паренхимы, сохранившейся в пораженном органе и способной отвечать на регуляторные сигналы, а также от суммарной массы биологической активности используемого материала. Кроме того, определяющее значение для выраженности и длительности функционирования пересаженных клеток имеет степень биологической (биохимической) адекватности микроокружения, так как именно физиологически активные вещества микроокружения, или, как их называют, сигнальные молекулы, определяют реализацию генетической программы пересаженных клеток. Наиболее выраженный клинический эффект отмечался при пересадках клеток в органы с аналогичным фенотипом клеток.

Между тем оказалось, что даже при пересадке дофаминэргических нейронов от поздних эмбрионов (6–9 недель гестации) в ткань мозга, которая, как известно, окружена гематоэнцефалическим барьером, положительная динамика у пациентов с болезнью Паркинсона обычно нарастала только в течение первых 3–6 месяцев после операции (период развития пересаженных нейронов и установления их связей с мозгом больного) и затем шла на убыль за счет постепенной дегенерации и гибели трансплантированных нейронов. Было высказано предположение, что гибель трансплантированных нейронов при этом может быть связана с отсутствием в мозге взрослого реципиента микросреды, обеспечивающей их выживание и развитие: отсутствует выработка определенного спектра ростовых нейротрофических факторов эмбрионального или плацентарного происхождения. Не исключено также, что эмбриональные нейроны, будучи аллотрансплантатами, отторгаются реципиентом, поскольку нервные клетки поздних зародышей человека уже синтезируют антигены гистосовместимости, а стереотаксические манипуляции временно нарушают гематоэнцефалический барьер. В результате трансплантированные клетки становятся доступными не только для антител, но и для активированных лимфоцитов, ответственных за их отторжение и гибель. Возможно также, что

постепенная гибель трансплантированных клеток (даже аутоотрансплантированных) и появление активных лимфоцитов могут быть обусловлены отсутствием полной интеграции этих клеток тканями реципиента из-за их предварительной изоляции, которая в последующем ослабляет чувствительность цитоплазматических мембран к сигналам межклеточных взаимодействий. К тому же не устраняется первопричина заболевания, и сохраняющиеся патологические воздействия могут способствовать гибели трансплантированных донорских клеток. Имеет значение степень, стадия уже произошедших патологических изменений как следствия основного заболевания, иногда необратимых процессов (Онищенко Н.А. с соавт., 2002; Берсенев А.В. с соавт., 2001).

Очевидно, действием всего спектра аналогичных факторов следует объяснять ограниченность сроков клинического эффекта клеточной терапии (не более 6–12 месяцев) и при лечении гипотиреоза, диабета, болезни Вильсона, а также хронических заболеваний печени и других органов (Онищенко Н.А. и др., 1999; Шумаков В.И. и др., 1998).

В процессе изучения терапевтических возможностей метода клеточной трансплантации стало очевидным, что главным препятствием на пути внедрения клеточных технологий в широкую клиническую практику служат ограничения в получении достаточных количеств биоматериала — специализированных (дифференцированных) клеток с высокой биологической активностью, которой, как известно, обладают клетки из тканей молодых развивающихся организмов.

Для целей терапии использовались клетки из тканей поздних эмбрионов человека со сроками развития 5–8 недель гестации, когда заканчивается закладка эмбриональных зачатков тканей и органов; клетки фетальных тканей человека со сроком развития плода свыше 8–12 недель гестации, а также клетки из тканей органов новорожденных или неполовозрелых животных (при необходимости получения больших объемов клеточной массы). Клеткам из тканей развивающихся организмов отдается особое предпочтение, так как эти специализированные клетки имеют очевидное биологическое преимущество перед специализированными клетками взрослых доноров. Во-первых, большинство фетальных клеток имеет слабо экспрессированные комплексы главных антигенов гистосовместимости (МНС-1 и МНС-2). Во-вторых, фетальные органы содержат наряду с уже дифференцированными клетками бластные и региональные стволовые клетки, наделенные мощным потенциалом пролиферации. В-третьих, фетальные клетки за счет стволовых и бластных популяций секретируют в организме реципиента уникальный комплекс цитокинов и ростовых тканеспецифических факторов, которые стимулируют регенерацию поврежденных тканей человека.

Чтобы уйти от проблем острого дефицита аллогенного донорского материала и от проблем биоэтики, возникающих при использовании человеческого абортивного материала, в 1980-х гг. для клеточной терапии клиницисты стали широко использовать ксеногенный биоматериал. Так, для лечения инсулинзависимого сахарного диабета была разработана технология получения островковых клеток из поджелудочной железы плодов свиней и коров, а затем из поджелудочной железы новорожденных кроликов. Для лечения острой и хронической печеночной недостаточности различного генеза в экстракорпоральных контурах систем «Вспомогательной печени» стали использовать гепатоциты свиней препубертатного возраста (до двух месяцев развития), так как эти клетки обладают не только высоким регенерационным потенциалом, но и способностью к выполнению органоспецифических детоксикационных функций. Еще в начале 1990-х гг. для усиления биорегуляторной активности гепатоцитов их инкубацию в экстракорпоральных контурах перфузионных систем стали проводить совместно с фрагментами селезенки тех же животных (Онищенко Н.А. и др., 1999).

Использование селезенки в комплексном лечении заболеваний печени обосновывалось тем, что, будучи важным органом иммуногенеза, селезенка, подобно плодным тканям и клеткам костного мозга, даже во взрослом организме, содержит стволовые клетки и сохраняет достаточно высокий уровень обновления своего клеточного состава. Именно поэтому селезенка является мощным источником цитокинов и ростовых факторов — индукторов восстановительных процессов в клетках паренхиматозных органов. Кроме того, было показано, что Т-лимфоциты, которые служат в организме переносчиком регенерационной информации паренхиматозным клеткам нелимфоидных органов, завершают свое превращение в иммунокомпетентную клетку в селезенке, становясь способными к кооперативному взаимодействию с В-лимфоцитами при клеточно-опосредованном гуморальном иммунном ответе (Бордуновский В.М., 1992; Онищенко Н.А. с соавт., 2001; Тимербулатов В.М. с соавт., 2005; Шапкин Ю.Г. с соавт., 2010). Это обстоятельство и предопределило тот факт, что на протяжении последних 20 лет спленотерапия животными тканями стала интегральной частью комплексного лечения острой и хронической недостаточности функций жизненно важных органов, формирование которых всегда развивалось на фоне выраженного иммунодефицита.

Между тем сохраняющийся дефицит донорского материала для лечения больных методами клеточных трансплантаций, призыв к ограничению использования ксеногенных источников из-за их более высокой антигенности, опасности заражения прионами и другими инфекциями, а также необходимость стандартизации используемых клеток и приготовления из них клеточных препаратов обусловили в по-

следние три-пять лет пробуждение необычайного интереса исследователей всего мира к проблеме стволовых клеток и к их так называемому «терапевтическому клонированию».

Плюри- и мультипотентность СК делает их идеальным материалом для использования в трансплантационных методах клеточной и генной терапии (Александрова М.А. и др., 2003; Викторов И.В. и др., 2002; Сухих Г.Т. и др., 2001). При этом следует учитывать то, что наряду с СК, которые при повреждении тканей соответствующего органа мигрируют к зоне повреждения, делятся и дифференцируются, образуя в этом месте новую ткань, существует и центральный склад запчастей — РСК костного мозга. Эти клетки универсальны, они, по-видимому (полученные многочисленные данные такого рода все же требуют дополнительной проверки), способны поступать с кровотоком в поврежденный орган или ткань и на месте под влиянием различных сигнальных веществ дают начало нужным специализированным клеткам, которые замещают погибшие. В частности, установлено, что введение РСК костного мозга в зону повреждения сердечной мышцы (зону инфаркта) устраняет явления постинфарктной сердечной недостаточности у экспериментальных животных. Так, РСК, введенные свиньям с экспериментальным инфарктом, уже через восемь недель полностью перерождаются в клетки сердечной мышцы, восстанавливая ее функциональные свойства. По данным Американского кардиологического общества за 2000 г., у крыс с искусственно вызванным инфарктом 90% РСК костного мозга, введенных в область сердца, трансформируется в клетки сердечной мышцы (Корочкин Л.И., 2002).

Японские биологи (Tomooka Y., Kitani H. et al., 2003) получили в лабораторных условиях из РСК костного мозга мышей клетки сердечной мышцы. В культуру РСК добавляли 5-азоцитидин, и они начинали дифференцироваться в клетки сердечной мышцы. Такая клеточная терапия весьма перспективна для восстановления сердечной мышцы после инфаркта, поскольку для нее используются собственные РСК. Они не отторгаются, кроме того, при введении взрослых СК исключена вероятность их злокачественного перерождения. Будучи мультипотентными, РСК составляют существенный восстановительный резерв в организме и способствуют замещению дефектов, возникающих в силу тех или иных обстоятельств (Лосева Е.В. и др., 2001; Hofstetter C. et al., 2002).

Особое удивление биологов вызвало наличие РСК в центральной нервной системе. Они отвечают на различные поражения нервной ткани размножением (сами нервные клетки, как известно, утрачивают способность к размножению уже на стадии нейробласта) и дифференцировкой в нервные и глиальные клетки (Корочкин Л.И., 2001; Gage F. et al., 1995). Полагают, что изолированные нейральные РСК способны превращаться и в другие производные (Gage F. et al., 1995).

Большое значение придают РСК (в частности, стромальным) при лечении различных нейродегенеративных и неврологических заболеваний паркинсонизма, болезни Альцгеймера (старческое слабоумие), хореи Гентингтона, мозжечковых атаксий, рассеянного склероза и др. Группа неврологов из Американского национального института неврологических заболеваний и Стэнфордского университета обнаружила, что РСК костного мозга могут дифференцироваться в нейральном направлении. Следовательно, костный мозг человека может быть использован в качестве источника СК для восстановления поврежденных тканей в головном мозге. Возможна также трансформация этих клеток в печеночные, почечные, в клетки, синтезирующие инсулин, что может быть использовано для лечения диабета. Следовательно, пациент может стать собственным донором, что предотвратит реакцию иммунологической несовместимости тканей (Корочкин Л.И. с соавт., 2002).

Группа ученых под руководством Евы Мизей (Mezey E., Chandross K.J., Hazta G. et al., 2000) полагает, что РСК, куда бы они ни имплантировались, могут достигать поврежденного места, в частности мозга, и обеспечивать там восстановительные процессы. Так, после внутривенного введения взрослым мышам РСК различные нейральные производные были обнаружены во многих областях мозга, включая неокортекс, гиппокамп, таламус, ствол мозга и мозжечок.

Предпринимаются успешные попытки разработать методы клинического использования СК пуповины и плаценты (Romanov Yu. и др., 2003; Берсенов А.В. с соавт., 2004). В связи с этим отпадает необходимости так называемого терапевтического клонирования, с этической точки зрения весьма сомнительного. Кроме того, появились многочисленные работы, в которых показано, что в трансплантированных ядрах соматических клеток функции не менее 4% генов существенно нарушены. Выяснилось также, что по крайней мере в настоящее время не удастся добиться полного репрограммирования ядер соматических клеток (необходимого для нормального индивидуального развития) при помещении их в другую цитоплазму. Не удастся стереть метилирование ряда генов. В результате необходимая для нормального развития зародышей нормальная их функция не восстанавливается. Следовательно, такие ядра не способны обеспечить развитие физически полноценных зародышей. Особенно существенно то, что в трансплантированных ядрах соматических клеток не удастся полностью реактивировать гены, родственные Oct-4, одному из главных маркеров ЭСК, которые, собственно, и планируется использовать в качестве материала для аутотрансплантации (Dean W. et al., 2001). Надлежит, очевидно, искать способы преодолеть эти трудности на экспериментальных моделях.

Важной является также проблема сохранения жизнеспособности РСК при их трансплантации. Она может быть повышена путем введения в геном трансплантируемых нейронов генов ростовых нейротрофических факторов, что является защитой от апоптоза. Такого рода попытки предпринимаются в различных лабораториях США и Европы (Берсенев А.В., 2004).

В работах Института биологии гена РАН, Института биологии развития РАН, Института акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН выделены региональные нейральные СК, дана их подробная иммуногистохимическая характеристика, в том числе на проточном флюориметре, что было сделано в таких масштабах впервые. В опытах с трансплантацией нейральных СК человека в мозг крыс была показана их приживляемость, миграция на достаточно большие расстояния (несколько миллиметров) и способность к дифференцировке. Последняя в значительной степени определяется микроокружением, в которое попадает трансплантат. Так, при трансплантации нейральных СК человека в ту область мозжечка крысы, где расположены клетки Пуркинье, они дифференцируются в направлении именно этого типа клеток, о чем свидетельствует синтез в них белка калбиндина, специфического продукта клеток Пуркинье (Александрова М.А. и др., 2003; Корочкин Л.И., 2001; Полтавцева Р.А. и др., 2003).

Российскими и украинскими биологами (Институт биологии гена РАН, Харьковский институт криобиологии) впервые разработана оригинальная методика индукции в культуре РСК дифференцировки в направлении клеток, подобных клеткам островков Лангерганса, синтезирующим инсулин. Синтез этого белка был продемонстрирован с помощью современных методов молекулярной биологии и цитологии. Интересно, что эти клетки формируют в культуре структуры, напоминающие островки Лангерганса. Они могут быть использованы для лечения диабета (Щегельская Е.А. и др., 2003).

Изучено, что ЭСК с высоким потенциалом к развитию сохраняются и во взрослом организме. Более того, они составляют важнейшее звено в цепи репаративных процессов, о чем ранее не подозревали. В 1970-е гг. были описаны эмбриональные клетки в печени взрослой мыши (Корочкин Л.И. с соавт., 1977). Однако, опираясь на существующие тогда взгляды, автор не предполагал, что они обладают столь высоким потенциалом к развитию и принимают активное участие в репаративном процессе.

В ходе клеточного деления СК и камбиальных клеток возникают материнская и дочерняя клетки. Материнские клетки используются для самоподдержания популяции, а дочерние в случае стволовых выходят либо в СК, либо непосредственно в дифференцировку, а в случае камбиальных — непосредственно в дифференцировку. На стадии камбиальной клетки сохраняются свойства ранних эмбриональных клеток

развиваться в разных направлениях, на стадии камбиальной клетки эта способность утрачивается, они производят лишь региональные структуры (Корочкин Л.И., 2003; Kaushel D. et al., 2003; Rehen S. et al., 2001).

1.3. Перспективы развития клеточных технологий

Можно утверждать, что современная медицина уже приступила к использованию клеточных технологий для лечения различных заболеваний, которые по сути представляют собой аномальное поведение отдельных клеточных популяций в организме и которые могут быть скорректированы клеточными факторами молодых здоровых клеток.

Главным препятствием на пути внедрения этих технологий в широкую клиническую практику служат два обстоятельства: сохраняющийся дефицит ауто- и аллогенного донорского материала с выраженной популяционной активностью (мог бы в значительной мере быть нивелирован использованием ЭСК и РСК) и отсутствие пока убедительных доказательств получения выраженных и пролонгированных клинических эффектов у больных с хроническими системными и аутоиммунными заболеваниями, нуждающихся в таких результатах.

Для решения проблемы нехватки клеточного биоматериала особые надежды возлагаются на расширенное использование ЭСК после того, как в отдельных странах и мировом сообществе в целом будут отработаны и согласованы различные эτικο-правовые аспекты терапевтического клонирования этих клеток, а также утверждены консенсусные документы. Технологическая возможность осуществления длительного (многолетнего) пассирования ЭСК без анеуплоидии и малигнизации, возможность осуществления ген-индуцированной дифференцировки и безопасной селекции этих клеток превратят ЭСК в уникальный и неисчерпаемый источник сырья для получения промышленных объемов стандартизированных клеточных препаратов. Переход к использованию предифференцированных клеток из ЭСК, по сути, позволит полностью решить проблему нехватки высокоэффективных клеточных препаратов в медицине.

Однако даже при решении этических, правовых и технологических проблем останется необходимость построения рациональной системы применения СК у больных при разных патологических состояниях, с определением показаний и противопоказаний к их применению. Ясно, что такая система должна учитывать новейшую информацию о биологии СК и основываться на четких представлениях о механизмах регуляции и дисрегуляции восстановительных процессов в поврежденных органах больного организма. Эта система должна строиться с учетом понимания причин угнетения активности собственных РСК и торможения механизмов их естественной дислокации (в частности, СК костного мозга) в кровотоке и очаги повреждения, а также

с учетом понимания механизмов цито- и гистогенеза в поврежденных тканях на уровне межклеточных взаимодействий: донорских СК со здоровыми и поврежденными клетками реципиента. Такие исследования необходимо развивать, особенно интенсивно на этапе доклинического изучения возможностей клеточной терапии предифференцированными РСК и ЭСК.

1.4. Нормативные документы по использованию клеточной терапии в Российской Федерации

В отношении исследований и клинической работы с клеточным материалом, в том числе со стволовыми клетками человека, за последние годы Минздравом РФ приняты следующие нормативные документы:

1. Закон РФ «О трансплантации органов и (или) тканей человека» (1992).
2. Закон РФ «О временном запрете на клонирование человека» (от 20.05.2002 г. №54-ФЗ; принят ГД ФС РФ 19 апреля 2002 г.).
3. Федеральный закон «О внесении изменения в статью 1 ФЗ “О временном запрете на клонирование человека”» (от 29.03.2010 г. №30-ФЗ; принят ГД ФС РФ 10.03.2010 г.).
4. Кодекс врачебной этики (1997).
5. Этический кодекс российского врача (1994).
6. Приказ МЗ РФ №301 от 28 декабря 1993 г., разрешающий практику искусственной фертилизации.
7. Государственный реестр новых медицинских технологий.
8. Приказ МЗ РФ от 29.08.2001 г. №345 «О создании экспертного совета по рассмотрению научных исследований в области развития клеточных технологий и внедрению их в практическое здравоохранение».
9. Указание МЗ РФ «О признании утратившими силу документов о клеточных препаратах» (06.03.2002 г.).
10. Проект Временной инструкции о порядке использования клеточных технологий в учреждениях здравоохранения РФ. Эта инструкция подготовлена 18.04.2002 г. экспертным советом при МЗ (Приказ МЗ РФ №345 от 29.08.2001 г.).
11. Временная инструкция о порядке исследований в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения (18.04.2002 г.).
12. Программа РАМН «Новые клеточные технологии — медицине» (2005).
13. Приказ МЗ РФ от 25 июля 2003 г. №325 «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации», где утверждены Положе-

ние о Банке стволовых клеток пуповинной / плацентарной крови; Инструкция по заготовке и хранению стволовых клеток.

14. Приказ МЗ РФ от 31.12.2004 г. «Об организации выдачи разрешений на применение медицинских технологий».
15. Приказ МЗ РФ №255 от 04.04.2005 г. «О создании экспертного совета по применению средств, изделий и методов в медицинской практике при Министерстве здравоохранения и социального развития РФ».

Глава 2.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СЕЛЕЗЕНОЧНОЙ ТКАНИ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ИНСУЛИНОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

(клинико-экспериментальное исследование)

Проблема профилактики и коррекции инсулиновой недостаточности (ИН) в абдоминальной хирургии, в частности при тяжелых сочетанных повреждениях двенадцатиперстной кишки (ДПК) и поджелудочной железы (ПЖ), а также в тяжелых случаях хронического диффузного панкреатита, что предполагает тотальное удаление данных органов в комплексе с селезенкой, все еще не решена. Предложенные способы ауто-трансплантации микрофрагментов эндокринной ткани ПЖ (Прокопьев М.В., 2001) из-за отсутствия ощутимого эффекта широкого клинического применения не нашли. Используемые в настоящее время методы коррекции ИН путем алло- и ксенотрансплантации культур островковых клеток (Скалецкий Н.Н. с соавт., 1994; Шумаков В.И. с соавт., 1995) и введения больших доз инсулина не приводят к желаемым результатам, т. е. не позволяют достичь строгой компенсации углеводного обмена и тем самым замедлить или остановить прогрессирование поздних сосудистых осложнений сахарного диабета (СД). Выход из создавшейся ситуации видится в обнадеживающих исследованиях применения стволовых клеток при лечении СД, а также подтверждении факта наличия пролиферации β -клеток у взрослого человека (Kendall D.M. et al., 1997).

В свою очередь вынужденная спленэктомия при тотальной дуоденопанкреатэктомии приводит к выраженному постспленэктомическому иммунодефициту (Бордуновский В.Н., 1997; Тимербулатов М.В. с соавт., 2004). Широко применяемый при повреждениях селезенки способ аутотрансплантации селезеночной ткани (АСТ) в данных ситуациях не используется, хотя в большинстве случаев не имеет противопоказаний. С позиции современных исследований в области клеточных технологий в медицине АСТ и изученные ее результаты можно рассматривать как вариант восстановительной терапии стромальными стволовыми клетками селезенки (De Vos P. et al., 1997; Литтман И., 1985). Подтверждением этому являются появившиеся в печати сообщения ряда исследователей о том, что для регуляции восстановительных процессов в поврежденных органах и тканях различного фенотипа возможно использование селезеночной ткани, которой присуща не только иммуногенетическая, но и морфогенетическая функция (Онищенко Н.А. с соавт., 1997; Тимербулатов М.В. с соавт., 2004).

На сегодня стало очевидным то, что замещение постспленэктомического иммунодефицита происходит за счет участия в регенерации

стволовых клеток селезеночной ткани под воздействием биохимических сигнальных веществ, т. е. белковых молекул, способствующих хоумингу — способности клеток к миграции в «нужное место»: «родной» орган и ткань (в свою стволовую нишу) или в область повреждения. Безусловно, миграционная способность клеток обусловлена биохимическими сигналами, исходящими из «нужной» области, системой рецепции клетки и способностью к хемотаксису. К настоящему времени наиболее изучен хоуминг гемопоэтических стволовых клеток. Самым изученным фактором хоуминга для стволовых клеток является белок — stromal-derived factor-1 (SDF-1). Совсем недавно появилось исследование об insulin-like growth factor-1 (IGF-1) — зависимом хоуминге (Hayward I. et al., 1992; Korsgren O. et al., 1988). Следовательно, с большой вероятностью можно утверждать о существовании взаимосвязи между АСТ и возможностью дифференцировки стволовых клеток имплантата в необходимые организму клеточные структуры.

Внимания заслуживает недавнее сообщение группы ученых из Massachusetts General Hospital (Бостон, США), обнаруживших, что селезенка может быть источником взрослых стволовых клеток, которые способны восстанавливать инсулинпродуцирующие участки ПЖ (Fritschy W.M. et al., 1991). Вслед за этим открытием сообщается, что взрослые стволовые клетки продуцируют протеин Hox11, который, как предполагалось ранее, присутствует у млекопитающих лишь в период эмбрионального развития (Deutsch J.C. et al., 1999). Оба сообщения подтверждают наличие в селезенке стромальных стволовых клеток, которые, по предположениям ученых, способны развиваться в большее число разновидностей тканей, чем другие взрослые клетки, и в экстремальной ситуации трансплантация клеток селезеночной ткани может позволить осуществить регенерацию селезеночных и β -клеток с их помощью.

Учитывая данные сообщения, можно предположить, что в профилактике и коррекции нарушенных функций организма, в том числе постпанкреатэктомической ИН, определенную роль, помимо АСТ, могут сыграть другие варианты трансплантации селезеночной ткани. Как известно, врожденные добавочные селезенки обнаруживаются у 14–30% больных и выявляются в воротах и связках селезенки, а также в большом сальнике (Григорьев Е.Г. с соавт., 2001; Попов М.В. с соавт., 2001; Arzoumanian A. et al., 1995). Эктопичная селезеночная ткань обнаруживается в гистологических препаратах, взятых у больных из различных отделов слизистой желудочно-кишечного тракта во время кровотечения или при резекции, а также в составе тканей различных органов и систем (Kodama S. et al., 2004; Hardin V.M. et al., 1994; Heneine W. et al., 1998). Эктопичная селезеночная ткань, получившая развитие после спленэктомии, которая в литературе обозначается как спленоз, представляет собой очаги регенерации селезеночной ткани, диссеминированной во время травмы и кровотечения в брюшную по-

лость, или остаток фрагмента ткани на своем месте как неудаленный участок (Апарцин К.А., 2000; 2001; De Backer A.I. et al., 2000). С позиции современных клеточных технологий перспективным направлением может явиться спленоз, вызванный трансплантацией культивированных клеток селезеночной ткани в различных вариантах. Но работ, посвященных изучению роли и значимости спленоза в коррекции нарушенных функций организма, в том числе ИН, нет.

Наличие актуальной проблемы в абдоминальной хирургии и возможность решения некоторых ее задач с позиции современных клеточных технологий явилось основанием для проведения экспериментально-клинического исследования.

2.1. Современные подходы в трансплантационной хирургии поджелудочной железы: состояние вопроса

2.1.1. Современные методы трансплантационной хирургической коррекции инсулиновой недостаточности

СД типа I (СД I) является следствием аутоиммунной деструкции островков поджелудочной железы (ПЖ) с последующим развитием абсолютной инсулиновой недостаточности (ИН), сопровождается выраженной инсулинопенией, а иногда и полным отсутствием секреции инсулина. Несмотря на внедрение современных технологий в практику терапии СД I (генноинженерный инсулин человека и его аналоги, шприц-ручки и инсулиновые помпы, глюкометры, в том числе неинвазивные, и др.), вопросы строгой компенсации углеводного обмена и предупреждение развития сосудистых осложнений СД остаются актуальными (Тимербулатов В.М. с соавт., 2006; Прохоров А.В., 2005; Bosi E. et al., 2001; Stevens R.B. et al., 2001).

СД поражает 6–9% населения мира и занимает первое место среди эндокринологических заболеваний. По частоте встречаемости в США данная патология занимает третье место среди всех заболеваний и четвертое — по причине смерти. Из 16 млн больных диабетом в США приблизительно 4 млн нуждаются в инсулинотерапии (Abbas A.K. et al., 1996). Синдром инсулинзависимого СД включает не только нарушенный метаболизм глюкозы, но и определенные хронические осложнения, такие как ретинопатия, нефропатия и нейропатия (Al-Ahmadi M. et al., 1998). В последние десятилетия стало все более и более очевидно, что капиллярные осложнения СД являются следствием гипергликемии. Постоянный контроль глюкозы крови при этом более важен, чем сама диагностика диабета и его осложнений.

Открытие инсулина в 1922 г. изменило течение СД, переводя его из острой, фатальной формы в хроническую, неуклонно прогрессирующую болезнь. Возможной альтернативой существующей методике инсулинотерапии является трансплантация ПЖ (Robertson R.P. et al., 1994). В то же время доказано, что при сохранении 25% островковых клеток ПЖ манифестация диабета не наступает (Баранов В.Г. с соавт., 1983). Ввиду того что масса островковых клеток составляет 1–2% общей массы железы, свободная трансплантация островков представляется более целесообразной и рациональной альтернативой традиционной трансплантации ПЖ на сосудистых связях. Учитывая технические, экономические и этические аспекты трансплантации ПЖ, достаточно высокий процент послеоперационных осложнений, дефицит донорского материала, необходимость пожизненной иммуносупрессивной терапии, ограниченный срок функционирования трансплантата, в настоящее время пересадка поджелудочной железы ограничена реципиентами с уремией и производится одновременно с трансплантацией почки. По происхождению клеточного материала для трансплантации можно выделить три группы методов: аутоотрансплантацию, аллотрансплантацию и ксенотрансплантацию.

Аллотрансплантация островковых клеток многими авторами считается более приоритетным методом в связи с идентичностью клеточного материала донора и реципиента. При этом происходит синтез человеческого инсулина, что обеспечивает максимальную компенсацию СД и минимизирует риск развития осложнений СД (Шумаков В.И., 1995; Shapiro J., 2002). Источником островковых клеток при аллотрансплантации может служить ПЖ взрослых доноров или фетальная и неонатальная ткань. Однако применение данного метода имеет ряд ограничений, основным из которых является дефицит аллогенного материала. Для создания культуры островковых клеток для одной трансплантации требуется в среднем четыре ПЖ (Shapiro J., 2002). При этом разработанные методики свободной островковой трансплантации аллогенной культуры требуют повторной пересадки клеток в течение года у 56% пациентов. Это связано с высокой иммуногенностью ткани ПЖ, что требует проведения высокой иммуносупрессивной терапии (Weiss R.A., 1998). В моделях на животных показана роль неспецифического воспаления в деструкции и гибели трансплантата (Kaufman D.B. et al., 1990; Stevens R.B. et al., 1994). Полученные данные свидетельствуют, что до 50% пересаженных островковых клеток погибают в течение трех суток в результате некроза и апоптоза (Morohoshi I. et al., 1991). Доказан также и цитокиновый путь гибели. Провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин 1,6, токсичны по отношению к островковым клеткам (Bobzien B. et al., 1983). Также фактор некроза опухолей и интерферон γ нарушают функцию островковых клеток или отдельно, или вместе с интерлейкином (Dunn J. et al., 1943; Mandrup-Poulsen T. et

al., 1987). Как и при любой аллотрансплантации, пересаженные островки подвергаются реакции отторжения (Appel J.Z. et al., 2000; De Backer A.I. et al., 2000; Liu Eric H. et al., 2000). Единственным средством, применяемым в практике для предотвращения отторжения, является использование иммуносупрессивных препаратов. Однако современные иммуносупрессивные протоколы далеки от совершенства, основаны на использовании кортикостероидов, циклоспорина и такролима и обладают выраженным диабетогенным эффектом (Todo S. et al., 1990; Shapiro J. et al., 1995). Возможно, появление новых иммуносупрессоров откроет более широкие возможности клеточной трансплантации.

Важным препятствием на пути успешной трансплантации у человека является также отсутствие надежного маркера для диагностики реакции отторжения. Существующие методы, направленные на определение уровней глюкозы крови и сывороточного С-пептида, нечувствительны, так как перед повышением глюкозы крови и снижением уровня С-пептида большинство клеток погибает. В отдельных исследованиях успешно применялась тактика одновременной трансплантации почки и аллогенных островков от одного донора (Шумаков В.И., 1995; Soon S.P. et al., 1994). Некоторыми исследованиями показана возможность определения метаболитов (NO) как маркеров отторжения (Cotterell A.H. et al., 1995).

Также существует ряд проблем социального, медицинского и религиозного характера. Серьезной проблемой, с которой столкнулись трансплантологи в последнее время, является несовершенство закона о трансплантации органов и тканей. При аллогенной трансплантации для исключения трансплантационной передачи инфекционных заболеваний, прежде всего ВИЧ и гепатита В, С, требуется достаточно трудоемкий и дорогостоящий протокол обследования (Шумаков В.И., 1995; Weiss R.A., 1998).

Пересадка ПЖ или β -клеток необходима в первую очередь для больных СД I, количество которых хотя и значительно меньше по сравнению с количеством больных СД II, но имеет тенденцию к увеличению во всех странах мира (Прохоров А.В., 2005; Тимербулатов В.М. с соавт., 2006; Шумаков В.И. с соавт., 2001; Liu Eric H. et al., 2000; Ramia V.K. et al., 2000; Shapiro J., 2002; Stevens R.B. et al., 2001).

Первая пересадка ПЖ для лечения диабетической нефропатии и СД была выполнена W.D. Kelly и соавт. (1967). Однако выживаемость больных и функция пересаженного органа оставались крайне низкими, что определялось отсутствием средств и методов, позволяющих успешно воздействовать на процессы отторжения и функцию пересаженного органа. Внедрение современных иммуносупрессивных средств (метилпреднизолон, азатиоприн, циклоспорин А, антисыворотки к субпопуляциям Т-лимфоцитов) способствовало предупреждению отторжения пересаженной ПЖ, которая, как правило, проводится одновременно с трансплантацией почки при сохранении в течение длительно-

го времени их функции. Такую органную трансплантацию ПЖ проводят больным, находящимся в терминальной стадии диабетической нефропатии. К 1998 г., по данным A.Graessner и D.E.R.Sutherland (Hardin V.M. et al., 1994), в мире было проведено свыше 10 тыс. подобных операций, причем наибольшее их количество приходилось на 1991–1997 гг. В большинстве случаев такие операции проводятся у больных СД и уремией, и для проведения подобных трансплантаций используются трупная ПЖ или ее часть и почки. По данным Международного регистра по пересадке ПЖ, к августу 2000 г. количество проведенных трансплантаций ПЖ увеличилось до 16 тыс. В настоящее время в мире ежегодно проводится около 1500 пересадок ПЖ, причем более 90% — в США (Шумаков В.И. с соавт., 2001; Kovarik J. et al., 1999; Koulmanda M. et al., 2003; Robertson R.P. et al., 1994).

Несмотря на увеличение количества одновременных трансплантаций почки и ПЖ больным СД I в сочетании с уремией, преимущества такой терапии (качество жизни больных и стоимость лечения) по сравнению с трансплантацией почки и последующей интенсивной инсулиновой терапией остаются под сомнением. В этой связи расширяются показания для проведения трансплантации почка–ПЖ на более ранней стадии почечной недостаточности. Пересмотру показаний к подобной трансплантации способствовало широкое использование современных иммуносупрессоров (такролима и микофенолата) и кишечного дренажа внешнесекреторной функции ПЖ. Моделирование «стоимость–эффективность» показало, что расходы в течение трех лет на 100 условных реципиентов при проведении им пересадки почек составляют 10,7 млн долларов, а при трансплантации почки и ПЖ — 16,11 млн долларов (Robertson R.P. et al., 1994; Shapiro J. et al., 1995).

Пересадка островков ПЖ с целью освобождения больных от инсулинозависимости проводится также на протяжении многих десятилетий. Первые попытки пересадки островков (фрагментов) ПЖ были проведены в 1930-х гг., но они оказались неэффективными. В 1960-е гг. были разработаны методы очистки островков ПЖ от соединительной и внешнесекреторной ткани с помощью коллагеназы (Скалецкий Н.Н., 1999; Шумаков В.И. с соавт., 2001; Appel J.Z. et al., 2000; Bosi E. et al., 2001). В последующие годы были проведены экспериментальные и клинические исследования, при которых трансплантация (суспензия) островковых клеток проводилась различными путями и в различные ткани: инъекция в портальную вену, т. е. в печень; инъекция в селезеночную вену и селезенку; инъекция в пульпу селезенки; инъекция и имплантация в брюшную полость; пересадка (трансплантация или инъекция) под капсулу почки; инъекция в прямую мышцу живота; имплантация в подкожную жировую клетчатку передней стенки живота; имплантация культуры островковых клеток, предварительно инкапсулированных (макро- и микроинкапсулирование) (Скалец-

кий Н.Н., 1999; Шумаков В.И. с соавт., 2001; Appel J.Z. et al., 2000; Bosi E. et al., 2001; Koulmanda M. et al., 2003; Liu Eric H. et al., 2000).

Надежды на возможность пересадки островков ПЖ как взрослого человека, так и плодов человека не оправдались. Уже в первой работе, выполненной J.S.Najarian и соавт. (1977), было показано, что из семи больных СД I, получивших интраперитонеальную и интрапортальную трансплантацию суспензированной ПЖ взрослого человека и ребенка, ни у одного не было достигнуто инсулинонезависимости и лишь у четырех больных, получивших интрапортальную трансплантацию, отмечалось временное снижение потребности в инсулине (Скалецкий Н.Н., 1999; Тимербулатов В.М. с соавт., 2006; Шумаков В.И. с соавт., 2001).

Первая отечественная аллотрансплантация культур плодных островковых клеток была проведена В.И.Шумаковым в 1979 г. С 1981 по 1984 г. в Научно-исследовательском институте трансплантологии и искусственных органов (Москва) осуществлена аллотрансплантация у 65 больных (Шумаков В.И. с соавт., 1984), из которых 42 наблюдались в течение года. У 18 больных доза вводимого инсулина оставалась сниженной на 18–67%, а у семи больных потребность в инсулине вернулась к уровню до трансплантации. Из 20 больных с лабильным до трансплантации течением СД у 15 оно оставалось стабильным и лишь у трех возобновилось лабильное течение заболевания. К сожалению, авторы не осуществляли мониторинг показателей функции пересаженных островковых клеток, функционального состояния иммунной системы в разные сроки после трансплантации и особенно в отдаленные сроки, что наиболее важно для оценки эффективности предложенной терапии. Следует отметить, что после проведенных операций не наблюдалось случаев полной инсулинонезависимости, т. е. отмены инсулинотерапии. В различные периоды после проведенных аллотрансплантаций отмечалось улучшение в основном субъективных показателей состояния больных СД (общего самочувствия, интенсивности болей в конечностях, зрения и др.), тогда как динамика некоторых объективных показателей была чаще всего временной. Так, базальная секреция С-пептида (показатель секреции и высвобождения инсулина) повышалась до 0,3–0,49 мг/мл через один месяц после пересадки, а затем снижалась до уровня, наблюдаемого до трансплантации, — 0,1–0,2 мг/мл (Скалецкий Н.Н., 1999; Шумаков В.И. с соавт., 2001; Юрченко Н.Д. с соавт., 2000).

Более эффективной является аутотрансплантация островков ПЖ в портальную систему, например, у больных, которым по тем или иным причинам была выполнена панкреатэктомия. Первая такая операция была выполнена J.Dobroschke и соавт. (1978), а к 1995 г., по данным Международного регистра по пересадке островков, в 20 центрах было осуществлено уже 140 аутотрансплантаций. В нашей стране Л.В.Поташов и соавт. также осуществили аутотрансплантацию микрофрагментов эндокринной ткани ПЖ больному, страдавшему хрониче-

ским панкреатитом, которому была проведена субтотальная ее резекция. Однако даже при таких аутотрансплантациях у больных, не страдающих СД, в последующем возникает необходимость проведения заместительной инсулинотерапии (Скалецкий Н.Н. с соавт., 1994; Тимербулатов В.М. с соавт., 2006; Юрченко Н.Д. с соавт., 2000).

Экспериментальным обоснованием возможности выполнения эффективной ксеногенной трансплантации в клинике явились успешные опыты по ксенотрансплантации культур островковых клеток животным с индуцированным СД. Было показано, что при использовании предварительно культивированных островковых клеток длительная ремиссия диабетического статуса может быть достигнута и без иммуносупрессии (Скалецкий Н.Н., 1999). Рядом исследований продемонстрировано, что ксеногенные островковые клетки не подвергаются аутоиммунному повреждению, что характерно для аллотрансплантации (De Vos P. et al., 1993).

Н.Н.Скалецкий и соавт. (1994) разработали способ получения культур из неонатальной ПЖ кролика без использования ферментной обработки, фильтрации, центрифугирования и других технических приемов выделения островков. Как отмечают В.И.Шумаков и соавт. (1985), использование в качестве источника островковых клеток ПЖ кроликов позволило значительно увеличить количество клинических трансплантаций. К 1994 г. было выполнено более 800 алло- и ксенотрансплантаций культур островковых клеток (в том числе культур плодных островковых клеток человека, культур островковых клеток плодов крупного рогатого скота, свиньи и культур, полученных из ПЖ новорожденных кроликов). Кроме того, за пределами НИИ трансплантологии и искусственных органов сотрудниками этого учреждения было осуществлено еще около 200 пересадок (все — ксенотрансплантации культур островковых клеток ПЖ новорожденных кроликов). Подавляющее большинство пересадок было выполнено внутримышечным способом, инъектированием материала в прямую мышцу живота (Скалецкий Н.Н. с соавт., 1994; Юрченко Н.Д. с соавт., 2000).

Первые клинические ксенотрансплантации культур островковых клеток были осуществлены в 1981–1982 гг. в НИИ эндокринологии и обмена веществ (Киев, Украина) и в НИИ трансплантологии и искусственных органов (НИИТиО — Москва, Россия) в 1980–1982 гг. (Шумаков В.И. с соавт., 1985). В качестве источника культур использовали ПЖ плодов свиньи, новорожденных поросят, плодов крупного рогатого скота. К концу 1993 г. в России и республиках бывшего СССР было осуществлено более 2500 ксеногенных пересадок. Как показали многолетние наблюдения, по своему антидиабетическому эффекту ксенотрансплантация весьма близка к аллотрансплантации и мало отличается от трансплантации фетальной островковой культуры клеток человека, позволяя добиться адекватного эндокринного эффекта (Shapiro A.M. et al., 2000; Shapiro A.V. et al., 1998; Shapiro J., 2000; Weiss R.A., 1998).

С 1991 г. в НИИТиИО стал использоваться новый источник культур островковых клеток — фетальная или неонатальная ПЖ кроликов (Скалецкий Н.Н. с соавт., 1994; Шумаков В.И., 1995; Шумаков В.И. с соавт., 1985). Разработанные новые подходы к получению высокоактивных культур островковых клеток, обладающих сниженной иммуногенностью, позволили существенно увеличить количество выполняемых трансплантаций и повысить их эффективность до 90%. Как правило, продолжительность клинического эффекта как при алло-, так и при ксенотрансплантации составляет в среднем 6–10 месяцев. Возможность значительного снижения иммуногенности островковой ткани при культивировании позволяет значительно уменьшить ответную иммунную реакцию реципиента, что создало возможность проведения повторных алло- и ксенотрансплантаций и их чередование (Shapiro A.M. et al., 2000; Shapiro A.V. et al., 1998; Shapiro J., 2000).

Трансплантация ксеногенной культуры островковых клеток оказалась достаточно эффективной при лабильном течении СД I (Weiss R.A., 1998). Как и при аллотрансплантации, снижалась потребность в экзогенной инсулинотерапии на фоне стойкой компенсации углеводного обмена, о чем свидетельствовало значительное уменьшение уровня гликолизированного гемоглобина (Шумаков В.И. с соавт., 1984). Ксенотрансплантация приводила и к нормализации показателей липидного обмена, что может быть использовано в качестве критерия эффективности трансплантации островковых клеток (Лейникс А.А., 1989; Шумаков В.И. с соавт., 1984). Показано также отчетливое положительное влияние ксенотрансплантации на течение диабетической полинейропатии и нефропатии (Лейникс А.А., 1989; Скалецкий Н.Н. с соавт., 1994).

Однако, несмотря на тщательную предтрансплантационную подготовку материала, основным препятствием для длительного сохранения пересаженной ткани в организме реципиента остается реакция отторжения трансплантата. В случае ксенотрансплантации органа на сосудистых связях развивается гиперострое отторжение, которое начинается немедленно при реперфузии трансплантата и уничтожает его в пределах от нескольких минут до нескольких часов (Weiss R.A., 1998). Гистологически гиперострое отторжение характеризуется интерстициальными кровоизлияниями и тромбозом, состоящим главным образом из тромбоцитов (De Vos P. et al., 1996).

Преодолев гиперострое отторжение, ксенотрансплантат в дальнейшем подвержен острому сосудистому отторжению подобно аллотрансплантату. Острое сосудистое отторжение, иногда называемое отсроченным отторжением ксенотрансплантата, может начинаться в течение 24 часов после включения трансплантата в кровоток и ведет к разрушению трансплантата в течение нескольких дней или недель (McPaul J.J. et al., 1981). Хотя патогенетические механизмы острого сосудистого от-

торжения полностью не раскрыты, имеются доказательства, что пусковым моментом этого процесса является связывание ксенореактивных антител с антигенами трансплантата (McPaul J.J. et al., 1981; Power L. et al., 1964). Также было установлено, что процесс отторжения клеток инициируется специальными антигенпредставляющими клетками, лейкоцитами-пассажирами, включая дендритные клетки донора или реципиента (MacKenzie D.A. et al., 1999). Лейкоциты-пассажиры мигрируют к региональным лимфатическим узлам реципиента и активируют Т-лимфоциты, которые возвращаются к трансплантату-мишени и уничтожают его (Diem P. et al., 1990). При этом ключевая роль в клеточно-опосредованной деструкции отводится лимфоцитам CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, CD95, CD154 (Appel J.Z. et al., 2000; De Backer A.I. et al., 2000; Kovarik J. et al., 1999). Для преодоления данной реакции клетки подвергали замораживанию (Lacy P. et al., 1967), облучению ультрафиолетовым и гамма-излучением (Diem P. et al., 1990; Lau H. et al., 1984), применялись *in vitro* (Gupta V. et al., 1997), проводилось предтрансплантационное введение островковых клеток, одновременное введение спленоцитов и островковых клеток (Lakshmi K.G. et al., 2002). Однако на сегодня данная проблема решена лишь частично.

Все вышеперечисленное наиболее актуально в случае включения пересаживаемого органа в кровообращение реципиента. Свободная пересадка островковых клеток исключает контакт эндотелия донора с кровью реципиента, что значительно снижает опасность гиперострого отторжения. Но в то же время ряд исследований показал, что прямой контакт островковых клеток с форменными элементами реципиента вызывает гиперкоагуляцию и гибель трансплантата, по-видимому, за счет цитокинов форменных элементов, в первую очередь тромбоцитов (Baue A.B. et al., 1968).

Перспективным направлением, позволяющим защитить пересаженные островки от отторжения, является иммуноизоляция островков. В основе метода лежит принцип предотвращения контакта пересаженных островковых клеток с иммунокомпетентными клетками реципиента. Островки, помещенные в полупроницаемую мембрану, сохраняют свою жизнеспособность в результате осмоса кислорода и трофогенов из крови и обратной диффузии продуктов метаболизма. Обладая способностью двухсторонней диффузии, в ток крови поступает и инсулин, вырабатываемый островковыми клетками (De Vos P. et al., 2002; Siebers U. et al., 1990). В настоящее время иммуноизоляция представлена двумя вариантами: микро- и макрокапсуляцией (Шумаков В.И. с соавт., 2001; Appel J.Z. et al., 2000; Bosi E. et al., 2001; Koulmanda M. et al., 2003; Liu Eric H. et al., 2000).

Одной из концепций ограниченного функционирования пересаженных трансплантатов клеток является недостаточная васкуляриза-

ция пересаженных островков. Очевидно, что для полноценного метаболического обмена между клетками и кровью «местообитание» пересаженных островков должно находиться в близком контакте с кровеносными сосудами. Сообщения о зонах трансплантации, таких как печень, селезенка, подкапсульное пространство почки, не отвечают этим требованиям, потому что эти зоны никогда не смогут обеспечить адекватный метаболический обмен необходимого объема микроинкапсулированных панкреатических островков (Expert J.J. et al., 2001). Выживание пересаженной культуры клеток только вначале обеспечивается свободной диффузией. В дальнейшем адекватное функционирование островков и их выживание будут зависеть от хорошей васкуляризации зоны трансплантации (De Vos P. et al., 1997). К сожалению, пока нет убедительных данных о полной иммунопротективной способности микрокапсул. Мембрана, пропускающая островковый инсулин, не может предотвратить аналогичный выход пептидов из трансплантата. Поэтому сенсибилизация иммунной системы представленными антигенами не может быть полностью предотвращена.

Для защиты трансплантата от иммунной агрессии возможно использование для пересадки так называемых иммунопривилегированных органов или зон, к которым относятся передняя камера глаза, головной мозг и тестикул (Апарцин К.А., 2001; Давыдова Т.В. с соавт., 2000).

Трансплантация ксеногенных островковых клеток в ретробульбарную клетчатку глаза, по данным НИИТиЮ, позволяет сохранять антидиабетический эффект в сроки до трех лет (Бордуновский В.Н., 1992). Иммунопривилегированность семенника обусловлена прежде всего наличием местных иммуносупрессорных факторов, вырабатываемых клетками Сертоли. Ю.И. Кистнер и соавт. (Анненков В.В. с соавт., 1995) в экспериментальных исследованиях продемонстрировали возможность длительного сохранения аллотрансплантата островковых клеток при паравазальной субкапсулярной трансплантации в семенник крыс.

Работами А.В. Ваие (Данилова Л.А. с соавт., 1978) было показано, что живые аллогенные трансплантаты клапанов сердца после их трансплантации длительное время сохраняли свою структуру и функцию, не подвергаясь реакции отторжения. На основании этих наблюдений возникло предположение, что среда крови является еще одной из иммунологически выгодных зон для сохранения жизнеспособности чужеродных тканей. Исследуя возможность долгосрочного сохранения различных тканей (в том числе различной видовой принадлежности) в просвете сердца и аорты, А.В. Шотт и соавт. (Бородин Ю.И. с соавт., 1999; Бочаров А.В. с соавт., 1990), С.И. Третьяк (Борисов А.Е. с соавт., 1989) установили, что ткани с диффузионным и капиллярным типом питания могут длительное время сохраняться в токе крови. При этом не срабатывал ни клеточный, ни гуморальный компоненты иммунитета.

Экспериментальные исследования А.И.Романовского (Барсуков А.Н. с соавт., 1990) продемонстрировали долговременное функционирование макроинкапсулированной фетальной человеческой островковой ткани поджелудочной железы при ее внутриаортальной трансплантации. При этом выживаемость островковых клеток в течение двух лет составляла до 60%.

Клиническое применение внутриартериальной и артериовенозной ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы продемонстрировало выраженный антидиабетический эффект пересадки, что позволило добиться снижения прогрессирования осложнений диабета, стабилизации течения диабета, снижения инсулинопотребности на 60–75%, улучшения качества жизни (Боровиков В.П. с соавт., 1997).

В последние годы определенный прогресс достигнут в исследованиях стволовых и панкреатических протоковых клеток (Онищенко Н.А. с соавт., 1997). V.K.Ramiya et al. (Потапов И.В., 2003) продемонстрировали, что панкреатические протоковые эпителиоциты, выделенные от взрослых мышей, можно культивировать и вызвать их дифференцировку в функционирующие островки Лангерганса. Эти генерированные *in vitro* островки были способны к нормализации глюкозы у мышей с диабетом в течение трех месяцев.

Определенным прорывом в трансплантации островков ПЖ оказалась разработка методов автоматической ферментации, фильтрации и сепарации островков из ПЖ взрослых трупных доноров, позволяющих получать из одной железы до 800 тыс. островков, доводя чистоту конечного материала до 90%. С этого времени стало возможным получать и трансплантировать больным СД такое количество островков ПЖ, которое необходимо для восстановления нарушенного углеводного обмена при полном отказе от экзогенного введения инсулина. Одновременно было показано, что островки человека, трансплантированные в печень, способны к выживанию в течение нескольких лет при отсутствии признаков отторжения и рецидива аутоиммунитета, что было подтверждено гистологическими исследованиями (Берсенев А.В., 2005). В некоторых случаях трансплантированные больным СД I островки человека функционировали в течение нескольких лет, способствуя нормализации углеводного обмена и уровня HbA_{1c} при отсутствии гипогликемии.

ПЖ взрослого человека весит около 70 г и содержит от 400 тыс. до 1,5 млн островков, диаметр каждого составляет около 150 мкм, что соответствует 0,5–4% объема ПЖ. Функция пересаженной островковой ткани может быть эффективной в случае, если количество трансплантируемых островков составляет 6 тыс. или более на 1 кг массы больного, при условии введения указанного количества островков в портальную систему (Shapiro A.M. et al., 2000; Shapiro J., 2002). Трансплантируемые островки ПЖ должны быть свободны от бактерий и грибов, а доноры тестированы на содержание антител к вирусу ге-

патита А, В и С, ВИЧ 1 и 2 типа, цитомегаловирусу. Подготовленные для трансплантации островки ПЖ должны быть тестированы на способность секреции инсулина в инкубационной среде с высоким содержанием глюкозы — 16,7 ммоль/л. За несколько лет, по данным ряда авторов (Groth C.G. et al., 1994), было проведено более 300 трансплантаций островков ПЖ человека, но успех таких пересадок был ниже 10%.

Сенсационным прозвучало сообщение группы ученых из Эдмонта (Канада), которые во главе с профессором A.Shapiro в 2000 г. доложили на заседании 60-й конференции Американской диабетической ассоциации о результатах успешной трансплантации островков ПЖ пяти больным СД I с полной отменой инсулинотерапии в послеоперационном лечении. Высокая эффективность описанного метода трансплантации островков ПЖ человека обусловлена несколькими факторами (Shapiro A.M. et al., 2000; Shapiro J., 2002; Shapiro A.V. et al., 1998). Каждый больной получил достаточное количество очищенных островков, которое составляло в среднем 11 392 островка на 1 кг массы тела больного. Такое количество островков ПЖ для каждого больного было получено из 2–3 донорских трупных желез. С момента смерти и взятия ПЖ у донора до получения суспензии островков и введения их в портальную систему печени проходило не более 3–4 часов, т. е. был ликвидирован этап приготовления культуры островков ПЖ. Кроме того, для профилактики отторжения была использована иммуносупрессивная терапия, не содержащая глюкокортикоидов. Основу такой терапии составили антитела к CD25 (зенапакс) и очень низкие дозы такролимуса (FK506) и сиролимуса (рапамицина). После трансплантации островков ПЖ экзогенный инсулин был отменен, и у всех пяти больных гликемия оставалась в течение 7,2 месяца в пределах нормы. Через несколько месяцев было опубликовано более расширенное сообщение уже о семи больных СД, которым была проведена указанная операция. В качестве иммуносупрессии использовали рапамицин (сиролимус) и FK506 (такролимус) с антителами к рецепторам ИЛ-2 (даклизумаб). Клиническая эффективность и качество жизни больных после проведенной трансплантации островковых клеток была представлена в последующей публикации, в которой рассмотрены результаты лечения ранее прооперированных 12 больных (4 женщин и 8 мужчин), страдающих СД, которым трансплантация островковых клеток была проведена в соответствии с Эдмонтонским протоколом. Период наблюдения после операции составил в среднем 10,2 месяца. Содержание глюкозы в дооперационный период натощак и после приема пищи составлял $12,5 \pm 1,9$ и $20,0 \pm 2,7$ ммоль/л соответственно, а после трансплантации уровень глюкозы достоверно снизился до $6,3 \pm 0,3$ и $7,5 \pm 0,6$ ммоль/л. Концентрация HbA_{1c} в крови также достоверно снизилась с $8,3 \pm 0,5\%$ до $5,8 \pm 0,1\%$. Содержание С-пептида натощак составляло $0,66 \pm 0,06$ ммоль/л, а через полтора часа после при-

ема пищи — $1,29 \pm 0,25$ ммоль/л. На момент обследования у четырех больных сохранялся нормальный глюкозотолерантный тест, у пяти — нарушенная толерантность к глюкозе и у трех выявлялся посттрансплантационный диабет (двое больных принимали пероральные сахароснижающие препараты и один больной — менее 10 ЕД инсулина в сутки). У 11 из 12 больных инсулиновая независимость была достигнута лишь после трансплантации 9 тыс. островков на 1 кг массы тела (Shapiro A.M. et al., 2000; Shapiro J., 2002; Shapiro A.V. et al., 1998).

Наибольшая эффективность функции пересаженных островков сохраняется при проведении трансплантации в портальную вену, но при этом возможны такие осложнения, как кровотечение или тромбоз портальной вены (Brunetti P. et al., 1991; Hayward I. et al., 1992). Отрицательные последствия внутрипортальной пересадки островков заключаются также в том, что в портальном кровообращении наблюдается наиболее высокая концентрация иммуносупрессивных препаратов, принятых внутрь (через рот), по сравнению с их содержанием в системном кровообращении, что проявляется прямым токсическим влиянием на трансплантированные островковые клетки или их выживание даже при применении нестероидных иммуносупрессивных препаратов.

В настоящее время имеется реальная возможность излечения СД с помощью аллотрансплантации островковых клеток ПЖ человека при условии выполнения всех требований Эдмонтонского протокола. Однако остается ограниченность биологического материала (ПЖ человека), необходимого для лечения миллиона больных, страдающих диабетом, что диктует необходимость разработки альтернативных методов лечения, направленных на достижение инсулинонезависимости у больных СД I.

К сожалению, попытки отечественных и зарубежных ученых применения свободной трансплантации как культуры островковых клеток плодов человека, так и ксенотрансплантации (плодов крупного рогатого скота, плодов и новорожденных поросят или кроликов) не могут привести к желаемым результатам по нескольким причинам. Отсутствует возможность выделения и почти 100% очистки островков ПЖ от акинозной и соединительной тканей, антигены которых являются инициаторами иммунного отторжения и аутоиммунной деструкции пересаженных тканей. Для единовременной пересадки требуется не менее 1 млн островков, получение которых сопряжено с отсутствием аппаратуры для автоматической сепарации и подсчета островков, которые должны быть получены в течение ограниченного времени и пересажены больному.

По мнению некоторых исследователей (Берсенов А.В., 2005; Бородин Ю.И. с соавт., 1998; Онищенко Н.А. с соавт., 1997), широкое применение (которое проводится до настоящего времени) отечественны-

ми учеными трансплантации культур островковых клеток, полученных из ПЖ поросят или кроликов, должно быть запрещено по нескольким причинам: во-первых, это ксенотрансплантация, которая вызывает последовательную активацию различных механизмов иммунной системы и тем самым приводит к отторжению пересаженных клеток; во-вторых, отсутствие иммуносупрессивной терапии приводит к гибели трансплантируемого материала и, возможно, активизации аутоиммунных механизмов, готовность к которым у больных СД I достаточно выражена; в-третьих, этические моменты (трансплантации культур островковых клеток новорожденных поросят или кроликов проводятся больным на платной основе); в-четвертых, у больных создается иллюзия возможности излечения от СД, что приводит к отсутствию у них мотивации к проведению интенсивной инсулинотерапии, которая позволяет достичь строгой компенсации СД и тем самым замедлить или остановить прогрессирование поздних сосудистых осложнений диабета.

Таким образом, в настоящее время свободная трансплантация панкреатических островковых клеток составляет альтернативу трансплантации ПЖ на сосудистых связях. Достижение долговременного антидиабетического эффекта пересадки островков при использовании методов иммунопротекции и иммунологически выгодных зон позволяет отказаться от иммуносупрессивной терапии и рассматривать методику трансплантации островковых клеток как важное звено в комплексном лечении инсулинзависимого СД.

2.1.2. Возможные пути совершенствования методов профилактики и коррекции инсулиновой недостаточности в хирургии поджелудочной железы путем трансплантации клеточных культур селезенки

Известно, что вынужденная спленэктомия при тотальной дуоденопанкреатэктомии приводит к выраженному постспленэктомическому иммунодефициту (Азизова А.А. с соавт., 2000; Апарцин К.А., 2001; Григорьев Е.Г. с соавт., 2001; Ионкин Д.А. с соавт., 2000; Прокопьев М.В., 2001; Тимербулатов В.М. с соавт., 2005; Усейнов Э.Б. с соавт., 2006; Цыпин А.Б. с соавт., 2000; Чуклин С.Н., 2000; Шапкин Ю.Г. с соавт., 2000). Широко применяемый при повреждениях селезенки способ АСТ в данных ситуациях не используется, хотя в большинстве случаев не имеет противопоказаний (Тимербулатов В.М. с соавт., 2006). С позиции современных исследований в области клеточных технологий в медицине аутотрансплантацию селезеночной ткани и изученные ее результаты можно рассматривать как вариант восстановительной терапии стромальными стволовыми клетками селезенки (Азатян К.Д., 2004; Берсенева А.В., 2003; Оганесян Т., 2002; Репин В.С. с соавт., 2002;

Шевченко Ю.Л., 2006; Тимербулатов В.М. с соавт., 2006; Ianus A., 2003; Komada S. et al., 2005; Wong R.Y.L. et al., 2003). Подтверждением этому являются сообщения исследователей о том, что для регуляции восстановительных процессов в поврежденных органах и тканях различного фенотипа возможно использование селезеночной ткани, которой присуща не только иммуногенетическая, но и морфогенетическая функция (Апарцин К.А., 2001; Берсенов А.В., 2003; Давыдова Т.В. с соавт., 2000; Домрачев С.А. с соавт., 2000; Гешелин С.А. с соавт., 2000; Оганесян Т., 2002; Репин В.С. с соавт., 2002; Попов М.В. с соавт., 2001; Сергеев В.С., 2005; Серов В.В., 2001; Тимербулатов М.В. с соавт., 2004; Усейнов Э.Б. с соавт., 2006; Шевченко Ю.Л., 2006; Чикаев В.Ф. с соавт., 2000). Становится понятным, что замещение постспленэктомического иммунодефицита происходит за счет участия в регенерации стволовых клеток селезеночной ткани под воздействием биохимических сигнальных веществ, т. е. белковых молекул, способствующих хоумингу — способности клеток к миграции в «нужное место» — «родной» орган и ткань (в свою стволовую нишу) или в область повреждения. Безусловно, миграционная способность клеток обусловлена биохимическими сигналами, исходящими из «нужной» области, системой рецепции клетки и способностью к хемотаксису. К настоящему времени наиболее изучен хоуминг гемопоэтических стволовых клеток. Самым изученным фактором хоуминга для стволовых клеток является белок — stromal-derived factor-1 (SDF-1). Совсем недавно появилось исследование об insulin-like growth factor-1 (IGF-1) — зависимом хоуминге (Torella et al., 2004). Следовательно, с большой вероятностью можно утверждать о существовании взаимосвязи между АСТ и возможностью дифференцировки стволовых клеток имплантата и костного мозга в необходимые организму клеточные структуры (Берсенов А.В., 2003; Репин В.С. с соавт., 2002; Тимербулатов М.В. с соавт., 2004; Тимербулатов В.М. с соавт., 2006; Шевченко Ю.Л., 2006; Юрченко Н.Д. с соавт., 2000; Markmann J.F. et al., 2003).

Изучено, что селезенка очень близка по своей структуре к костному мозгу, где содержится большинство стромальных стволовых клеток, и в экстремальной ситуации АСТ может позволить осуществить регенерацию селезеночных и β -клеток с помощью собственных стволовых клеток.

Для лечения острой и хронической печеночной недостаточности различного генеза в экстракорпоральных контурах систем «Вспомогательной печени» стали использовать гепатоциты свиней препубертатного возраста (до двух месяцев развития), так как эти клетки обладают не только высоким регенерационным потенциалом, но и способностью к выполнению органоспецифических функций (Онищенко Н.А. с соавт., 1997). Еще в начале 1990-х гг. для усиления биорегуляторной активности гепатоцитов их инкубацию в экстракорпоральных контурах перфузионных

систем стали проводить совместно с фрагментами селезенки тех же животных (Давыдова Т.В. с соавт., 2000; Оганесян Т., 2002; Прокопьев М.В., 2001; Сергеев В.С., 2005; Цыпин А.Б. с соавт., 2000; Чикаев В.Ф. с соавт., 2000; Чулкин С.Н., 2000).

Ряд ученых предполагает, что замещение постспленэктомического иммунодефицита и постпанкреатэктомической ИН происходит за счет участия в регенерации стволовых клеток селезеночной ткани под воздействием биохимических сигнальных веществ, т. е. белковых молекул, способствующих хоумингу — способности клеток к миграции в «нужное место» — «родной» орган и ткань (в свою стволовую нишу) или в область повреждения (Берсенева А.В., 2005; Репин В.С. с соавт., 2002; Тимербулатов В.М. с соавт., 2006; Шевченко Ю.Л., 2006). Данное исследование подтверждает возможность имплантации фетальных и стромальных стволовых клеток вне зависимости от зоны пораженного органа. Безусловно, миграционная способность клеток обусловлена биохимическими сигналами, исходящими из «нужной» области, системой рецепции клетки и способностью к хемотаксису (Берсенева А.В., 2005; Сергеев В.С., 2005; Lee V.M. et al., 2003; Shchegel'skaia E.A. et al., 2003). Стволовые клетки изначально обладают «свободной специализацией», т. е. являются исходными при образовании специализированных дифференциальных клеток, но до тех пор, пока они не получают генетический сигнал, их деятельность в организме ограничивается только многократным дуплицированием (удвоением) какого-либо участка хромосомы (Раевская М.В., 1995). Отсутствие инсулина в обменных процессах является исходным для посылки генетического сигнала для всех остальных тканей, в т. ч. для имплантируемой селезеночной ткани. Вполне допустимо, что под воздействием генетического сигнала происходит нужная дифференциация стволовых клеток селезеночной ткани в β -клетки, которые вырабатывают инсулин. Способность стволовых клеток длительное время воспроизводить себе подобных также является уникальной: в отличие от нормальных стволовых клетки могут быть практически неограниченным источником первичного клеточного «сырья» (Оганесян Т., 2002). При их делении часть дочерних клеток остается стволовыми, а другая начинает процесс дифференцировки. Особой разницы в степени универсализма между обычными и эмбриональными клетками нет. Экспериментальное доказательство этого факта впервые представили широкой общественности американские ученые из Института стволовых клеток Университета Миннесоты (США) (Komada S. et al., 2005; Musaro A. et al., 2004).

Следовательно, с большой вероятностью можно утверждать о существовании причинно-следственной связи между АСТ и возможностью дифференцировки стволовых клеток имплантата в необходимые организму клеточные структуры, т. е., в нашем исследовании, в инсулинопродуцирующие клетки в условиях *in vivo*. Существует эффективная

методика имплантации костного мозга в лечении СД (Jonsson J. et al., 1979), а селезенка, также являясь одним из органов кроветворения, скорее всего, богата стволовыми клетками. Не исключается, что в селезенке находится неизвестный ранее источник стволовых клеток, играющий важную роль в лечении некоторых типов повреждений и травм.

В настоящее время в научной литературе бурно обсуждается возможный механизм действия стромальных клеток — их прямая трансдифференцировка в β -клетки в условиях отсутствия ПЖ, т. е. после тотальной панкреатэктомии.

Первая глобальная работа была опубликована группой Andrea Ianus (2003), где была показана возможная дифференцировка клеток костного мозга мыши в β -клетки *in vivo* (при их введении) без признаков слияния клеток. Клетки костного мозга модифицировали генетически так, что при начале синтеза инсулина они начинали продуцировать и зеленый флуоресцентный белок (т. е. «светиться зеленым» при флюоресцентной микроскопии). Через 4–6 недель после трансплантации около 2–3% клеток донорского костного мозга «светились» при 70–90% эффективности интеграции (engraftment). Эти клетки были отсортированы и экспрессировали типичные для β -клеток маркеры, синтезировали инсулин и отвечали на стимуляцию глюкозой. В комментарии к этой статье приведены возможные причины и объяснения такого поведения клеток костного мозга. В частности, указываются некие онтогенетические пути, объединяющие эти ткани, и экспрессия общих поверхностных рецепторов (например, Kit — CD117) (Lee V.M. et al., 2003).

Появились работы, указывающие на возможность синтеза инсулина стромальными клетками в условиях *in vitro*. Австралийская группа ученых (Wong R.Y.L. et al., 2003) «заставила» человеческие стволовые клетки костного мозга вырабатывать инсулин путем трансфекции ретровирусной ген-конструкцией, содержащей проинсулиновую к-ДНК человека. Причем как гемопоэтические клетки (две линии, полученные из АССС), так и первичные мезенхимальные.

Работа отечественных ученых, опубликованная в журнале «Онтогенез», показывает возможность получения инсулинпродуцирующих клеток из стромальных стволовых клеток костного мозга *in vitro* (Shchegel'skaia E.A. et al., 2003).

Из приведенных выше источников можно объяснить факт дифференцировки стволовых клеток трансплантированной селезеночной ткани в инсулинпродуцирующие клетки (учитывая то обстоятельство, что взрослые стволовые клетки костного мозга и селезенки, возможно, имеют общее начало) под влиянием определенных сигналов (пусковым механизмом является отсутствие инсулина в крови + гипергликемия + мобилизация стволовых клеток селезеночной ткани) и, как объясняют некоторые исследователи, вследствие наличия общих путей развития в эмбриональном периоде селезенки, печени и ПЖ (Берсе-

нев А.В., 2005; Репин В.С. с соавт., 2002; Тимербулатов В.М. с соавт., 2006; Шевченко Ю.Л. с соавт., 1991).

Учитывая данные сообщения, можно предположить, что в профилактике и коррекции нарушенных функций организма, в том числе постпанкреатэктомической ИН, определенную роль, помимо АСТ, могут сыграть другие варианты трансплантации селезеночной ткани, т.е. наличие спленоза. Частота развития спленоза при травмах селезенки колеблется от 67% (Kiroff G.K. et al., 1983) в случаях обычной спленэктомии до 80% (Deutsch J.C. et al., 1999; Kumar R.J. et al., 2001) в случаях лапароскопической спленэктомии. К этому типу можно отнести спленоз, который достигается путем целенаправленной АСТ в различных ее вариантах, используемый в хирургической практике с целью профилактики постспленэктомического синдрома (Гешелин С.А. с соавт., 2000; Григорьев Е.Г. с соавт., 2001; Грубник В.В. с соавт., 2000; Тимербулатов В.М. с соавт., 2005; Тимербулатов М.В. с соавт., 2004; Усейнов Э.Б. с соавт., 2006; Чулкин С.Н., 2000; Шапкин Ю.Г. с соавт., 2006; De Backer A.I. et al., 2000; Expert J.J. et al., 2001).

Современные представления большинства исследователей о возможностях восстановления иммунологических показателей после спленэктомии с последующей АСТ как в эксперименте, так и в клинике (Усейнов Э.Б. с соавт., 2006; Шапкин Ю.Г. с соавт., 2006) подвергаются сомнению исследованиями ряда ученых, не выявивших существенных различий в результатах иммунологических и лабораторных показателей у больных после спленэктомии и органосохраняющих операций как в раннем, так и в отдаленном послеоперационном периоде (Смоляр А.Н., 2001). Данную противоречивость в иммунологических показателях после операции в разные сроки некоторые исследователи объясняют несколькими факторами: наличием невыявленной интраоперационно добавочной селезенки и развитием спонтанного и резидуального постспленэктомического спленоза (Katz D.S. et al., 1998; Vento J.A. et al., 1999).

Наличие добавочной селезенки и спленоза, возможно, в ряде случаев приводит к гнойно-септическим осложнениям в виде некроза и абсцедирования, кровотечениям при их травматических повреждениях. По всей видимости, нередки ситуации, когда возникает необходимость проведения дифференциации их от образований брюшной полости высокотехнологичными методами исследования.

С позиции современных клеточных технологий перспективным направлением может явиться спленоз, вызванный трансплантацией культивированных клеток селезеночной ткани в различных вариантах.

Таким образом, перспективным направлением в коррекции ИН могут служить выделение, культивирование и трансплантация стволовых клеток, как фетальных, так и соматических. Использование в хирургической панкреатологии метода АСТ является одним из вариантов клеточной терапии.

2.2. Изучение возможности профилактики и коррекции экспериментальной инсулиновой недостаточности путем использования клеточных культур селезеночной ткани

2.2.1. Моделирование оптимальных вариантов экспериментальной инсулиновой недостаточности и способов ее коррекции

В понимании патогенеза СД, а также его осложнений, особенностей клиники, лечения и профилактики имеются значительные достижения. Вместе с тем ряд важных вопросов остается недостаточно изученным. В решении их большое значение принадлежит экспериментам на животных. Если проследить историю развития диабетологии от момента появления первых фундаментальных работ по патогенезу СД до настоящего времени, можно установить тесную координацию клинических и экспериментальных исследований. Еще в далеком 1889 г. Ж.Меринг и О.Минковский (Mering J. et al., 1889) получили типичную картину СД, удалив у собаки ПЖ. В 1900–1902 гг. Л.В.Соболев (Соболев Л.В., 1900) провел блестящие эксперименты, предопределившие открытие инсулина. В 1921 г. Бантинг и Бест получили экстракт ПЖ, обладающий противодиабетическим действием. Открытие инсулина стало одним из крупных научных достижений XX века и ознаменовало собой бурное развитие диабетологии. Успехи в указанных исследованиях в значительной мере были достигнуты благодаря экспериментам на животных (Баранов В.Г. с соавт., 1983).

На современном этапе развития экспериментальной хирургии удаление ПЖ остается основным способом получения экспериментального диабета. Панкреатэктомический СД получен в настоящее время у всех животных, у которых регуляция углеводного обмена осуществляется с помощью инсулина. Млекопитающие, в первую очередь собаки, являются классическим объектом для получения СД путем экстирпации ПЖ. Только у крыс панкреатэктомия не всегда вызывала диабет, что обусловлено, возможно, анатомическими особенностями их железы, рассеянной по всей брыжейке. Но, как показывает ряд ученых (Баранов В.Г. с соавт., 1983; Чуракаев В.Д., 1964), при тщательном удалении ПЖ возникает тяжелый СД с развитием диабетической комы и смертью через 48 часов. Через 19 часов у крыс выявились уже все метаболические нарушения, характерные для ИН (Migliorini R. et al., 1962).

Большое значение для развития диабетических нарушений имеет количество сохраненной ткани ПЖ. Для получения длительно существующего хронического диабета с минимальными изменениями внешней секреции часто прибегают к субтотальной панкреатэктомии. Вопрос о за-

висимости между величиной удаленной части железы и тяжестью развивающихся нарушений подробно исследован В. Фоглиа. При тотальном удалении ПЖ у крыс диабет развивается через несколько часов. При удалении же 95% железы (оставляли сегмент между желчным протоком и ДПК) нарушения углеводного обмена проявлялись в течение 3–5 месяцев. Основной причиной развития диабета после тотальной и субтотальной панкреатэктомии является дефицит инсулина, т. е. абсолютная ИН. Однако инсулин исчезает из крови оперированных животных после панкреатэктомии не сразу и определяется в крови еще в течение 2–3 дней после операции (Prevost P. et al., 1997). Нарушения обмена веществ после тотальной панкреатэктомии изучены преимущественно на собаках, но, как отмечается, они протекают аналогично и у других экспериментальных животных (Баранов В.Г. с соавт., 1983). Кормление собак (крыс) сырой ПЖ и введение наряду с этим инсулина продлевает жизнь животных до нескольких лет (Лейтес С.М. с соавт., 1967).

В течение 50 лет диабет, вызываемый удалением ПЖ, служил единственной моделью экспериментального СД. При использовании данной модели были выяснены основные механизмы действия инсулина, изменение обмена веществ при его дефиците, патогенез многих нарушений при СД. После появления современных моделей СД (в основном аллоксанового) значение панкреатэктомической ИН резко понизилось. Вместе с тем модель СД, вызываемого путем оперативного удаления ПЖ, сохраняет свое значение в экспериментальной хирургии ПЖ.

В 1943 г. появились сообщения Ж. Дана и его сотрудников о получении у кроликов в результате однократного введения аллоксана избирательного некроза островков ПЖ с последующим развитием классических симптомов СД. Аллоксан является уреидом мезоксалево́й кислоты и представляет собой белое кристаллическое вещество (Баранов В.Г. с соавт., 1983). Аллоксан вводился в дозе 300 мг/кг веса, что приводило к гибели животных. При выяснении причин смерти исследователи обнаружили помимо изменений в почках некроз панкреатических островков. После уменьшения дозы до 150–200 мг/кг веса у части лабораторных животных авторам удалось получить классические симптомы СД. Данные работы с введением аллоксана, вызывающего избирательный некроз β -клеток, окончательно доказали роль этого типа клеток в секреции инсулина.

Аллоксановый диабет характеризуется первичной абсолютной недостаточностью инсулина, и у животных отмечаются соответствующие специфические изменения метаболизма. Дефицит инсулина оказывает как непосредственное, так и косвенное влияние на ряд сторон обмена веществ, находящихся под контролем инсулина. Введение животным с аллоксановым диабетом инсулина, вместе с трансплантацией ПЖ, уменьшает проявления диабета. Как отмечает большинство авторов, при аллоксановом диабете во внутренних органах выявляется ряд изменений, сход-

ных с наблюдающимися, с одной стороны, при экспериментальном панкреатэктомическом диабете, а с другой — при СД человека. Это обстоятельство дает основание считать, что изменения в органах, наблюдающиеся при экспериментальном аллоксановом диабете, являются результатом обменных нарушений, обусловленных инсулярной недостаточностью, а не результатом непосредственного действия аллоксана. Все сказанное подчеркивает большое значение аллоксанового диабета как модели для изучения различных сторон патогенеза и патоморфологии СД.

В литературе также описаны такие модели экспериментального СД, как стрептозотоциновый диабет, «цинковые» формы диабета, дегидроаскорбиновый диабет, диабет, вызванный введением гормонов-антагонистов инсулина, и др. модели (Баранов В.Г. с соавт., 1983). Но данные модели широкого экспериментального применения не получили из-за того, что они по своей научной значимости уступают исследованиям с применением аллоксанового диабета.

Таким образом, диабет, вызываемый удалением ПЖ и введением препарата аллоксан, несмотря на появление новых моделей, остается удобным в техническом отношении и более адекватным СД человека и продолжает сохранять значение в научных исследованиях по настоящее время.

Экспериментальное исследование выполнено в специально оборудованной операционной (виварий БГМУ) на 263 белых половозрелых крысах линии Wistar с достижением панкреатэктомической и аллоксановой ИН и на восьми кроликах обоих полов породы шиншилла весом от 2,8 до 4,5 кг. Операции на животных производились под эфирным наркозом при строгом соблюдении правил асептики и антисептики, с использованием методов эвтаназии в соответствии с Правилами проведения работ с экспериментальными животными.

Экспериментальное исследование носило поэтапный характер, и на каждом этапе решались определенные задачи, поэтому материал исследования был подразделен на восемь групп (табл. 2.1).

На начальном этапе, учитывая опыт исследователей в области экспериментальной диабетологии (Баранов В.Г. с соавт., 1983), возникла необходимость модифицировать модель экспериментального панкреатэктомического СД.

Изучено, что ПЖ крыс состоит из двух долек (правой и левой), расположенных по обе стороны ДПК. Если удаление левой доли не сопряжено с техническими трудностями, удаление правой доли приводит к повреждению общего желчного протока. Выполнение субтотальной панкреатэктомии, т. е. оставление правой доли, не приводит к развитию СД. Поэтому для получения абсолютной ИН необходимо выполнить тотальную панкреатэктомию.

У 10 крыс (*1-я группа*) выполнение тотальной дуоденопанкреатэктомии с наложением гастроюноанастомоза и цистеюноанас-

Таблица 2.1

Объем оперативных вмешательств и изучаемый результат в эксперименте

Группы	Объем операции	Изучаемый результат
1 группа, n=10	Дуоденопанкреатэктомия	Моделирование метода с определением выживаемости
2А группа, крысы, n=25	Панкреатэктомия с АСТ	Возможность профилактики ИН
2В, крысы, n=25	Панкреатэктомия без АСТ	Контрольная группа
3 группа, беременные крысы, n=38	Лапаротомия, извлечение плодов, забор эмбриональной селезеночной ткани	Возможность получения клеточных культур в условиях лаборатории трансплантологии
4 группа, n=10	Подкожное введение 5% водного раствора аллоксана из расчета 150 мг/кг массы тела животного	Моделирование метода с определением выживаемости
5А группа, крысы, n=75	Подкожное введение 5% водного раствора аллоксана из расчета 125 мг/кг массы тела животного + на 7-е сутки имплантация аллогенного клеточного материала, культивированного из фетальной селезеночной ткани	Возможность коррекции ИН
5В группа, крысы, n=75	Подкожное введение 5% водного раствора аллоксана из расчета 125 мг/кг массы тела животного + на 7-е сутки имплантация аллогенной клеточной культуры из соматической селезенки	Возможность коррекции ИН
6 группа, кролики, n=8	Аллогенная трансплантация эмбриональной селезенки в дерму уха кролика, перенесшего спленэктомию	Возможность аллогенной трансплантации селезенки и коррекции при этом пост-спленэктомического синдрома

томоза привело к летальному исходу в раннем послеоперационном периоде. Высокая травматичность оперативного вмешательства оказалась для лабораторных животных не совместимым с жизнью пособием.

Учитывая данные результаты, нами был модифицирован метод экспериментальной тотальной панкреатэктомии, суть которого заключалась в удалении правой доли ПЖ с селезенкой, а левая доля удалялась с использованием радиохирургического аппарата Surgitron (США). Использование радиоскальпеля позволило выделить ткань ПЖ из интимно сращенных с двенадцатиперстной кишкой зон, избежать при этом коагуляционного некроза стенки кишки и общего желчного протока. Также в области сегмента между желчным протоком и ДПК радиоскальпель позволял точно деструктировать нерезектабельные ткани ПЖ. Данная методика привела к ИН во всех 50 случаях эксперимента на животных.

Уровень сахара крови определяли два раза в сутки глюкометром One Touch Ultra (США), в моче — в лабораторных условиях. Пол животных не учитывался.

Для достижения хронического опыта коррекция ИН проводилась однократным введением в сутки препарата «Хумулин», подкожно, в расчете 0,5 ЕД/кг массы тела животного (предварительно разбавленного 100 мл физиологического раствора).

Панкреатэктомическую ИН у 50 крыс (2-я группа) вызывали путем тотального удаления ПЖ и селезенки с использованием радиохирургического скальпеля, под эфирным наркозом.

Для изучения эффективности клеток селезеночной ткани в профилактике и лечении ИН в разные сроки после операции экспериментальные животные 2-й группы были разделены на две подгруппы. Подгруппу 2А составили 25 крыс, которым панкреатэктомия производилась с использованием АСТ. В целях изучения возможности профилактики ИН выполняли аутотрансплантацию 1/2 части селезенки в виде фрагментов размерами 0,3 x 0,3 x 0,3 см с имплантацией их в большой сальник (рис. 2.1, см. цв. вклейку).

Оставшаяся часть селезеночной ткани обрабатывалась в среде №199 с добавлением антибиотиков и с соблюдением правил асептики направлялась в лабораторию для выделения и последующего культивирования жизнеспособных клеток селезенки по общепринятой методике (Азатян К.Д., 2004; Берсенев А.В., 2003; Шевченко Ю.Л., 2006). С целью извлечения аутотрансплантатов для исследования их клеточной структуры и морфологической картины на 7-е сутки пять крыс подверглись острому опыту. Подгруппу 2В составили 25 крыс, которым АСТ не производилась, и у данной категории животных была изучена эффективность культивированных клеток соматической селезенки в послеоперационном периоде.

В ходе эксперимента по мере необходимости производилась подсадка самок к самцам с целью оплодотворения. В общей сложности у 38 самок получена беременность, которые составили 3-ю группу. На 12–14-е сутки беременности под эфирным наркозом крысам производилась лапаротомия, извлечение плодов из матки, далее плодам (в среднем 8–10 плодов) выполнялась лапаротомия и производился забор селезенки. При заборе селезенки ориентировались относительно ПЖ и желудка. Во всех случаях в области предполагаемого расположения селезенки плода удавалось выявить овальное образование размерами до 2–3 мм, желто-красной окраски. Микроскопическое исследование позволило уточнить, что оно является фетальной селезенкой. С соблюдением правил асептики селезеночная ткань эмбрионов направлялась в лабораторию для культивирования.

Культивирование клеток селезеночной ткани производилось в проблемной научно-исследовательской лаборатории трансплантологии ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет». После механического диспергирования селезеночную ткань помещали в колбу с раствором трипсина с последующей трипсинизацией в магнитной мешалке при нагревании до 37°C в течение трех минут. Затем проводили отмывание селезеночных клеток с помощью центрифугирования (10 минут при 1500 об./мин.). Отмытые клетки селезенки культивировали в течение семи суток в среде ДМЕМ с добавлением 5% р-ра эмбриональной сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург) в термальной комнате. Ежедневный мониторинг за культурой клеток осуществлялся при помощи инвертированного микроскопа с программным обеспечением фирмы DMIL «Leica» (Германия) (рис. 2.2, см. цв. вклейку).

Культивирование клеток проводилось по следующей схеме: объектами исследования были селезенки взрослых крыс, находящихся в эксперименте, и 16-дневных эмбрионов крыс линии Wistar. Ткани селезенки получали в условиях бокса с соблюдением всех правил асептики и антисептики по общепринятым методикам (Лепехова С.А., 1999).

Изолированные клетки селезенки взрослых крыс и эмбрионов получали по модифицированному методу Сеглена.

Сразу же после извлечения органы помещали в стерильную чашку Петри. Далее ткани измельчали ножницами на кусочки размерами примерно 1 мм³ и четыре раза промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (раствор Дюльбекко). Затем отмытые кусочки трижды диссоциировали на магнитной мешалке по 10 минут при температуре 37°C в растворе Дюльбекко и ДМЕМ (1:1), содержащем для селезенки взрослой крысы 0,1% коллагеназы и 0,1% трипсина, для эмбриональной селезенки — 0,05% коллагеназы и 0,12% трипсина (Difco, США).

Клеточные взвеси переливали в стерильные флаконы через ба-
тистовый фильтр. Далее клетки отмывали от ферментов в питательной
среде ДМЕМ («Биолот», Санкт-Петербург) методом центрифугирова-
ния в течение 10 минут при 1500 об./мин. Надосадок сбрасывали,
а осадок нежно ресуспендировали путем пипетирования. С каждого
объема осуществляли выемку диссоциированных клеток селезенки
для подсчета методом окрашивания 0,1% раствором трипанового си-
него. Наносилась одна капля красителя, окрашивание проводилось
в термостате при температуре 37°C в течение 10 минут. Степень окра-
шивания контролировалась под микроскопом. Подсчет числа живых
клеток производился в камере Горяева под световым микроскопом.
Гибнущие клетки с поврежденной мембраной имели синюю окраску
цитоплазмы. Результаты исследований регистрировались и сравнива-
лись между собой. Под микроскопом подсчитывалось общее коли-
чество клеток, в том числе окрашенных клеток в 25 больших квадратах
камеры Горяева. Дальнейший подсчет клеток проводился по формуле:

$$X = N \times S \times 1000, \text{ где}$$

X — количество клеток в 1 куб. см суспензии, N — количество кле-
ток в 25 больших квадратах, S — кратность разведения суспензии кра-
сителем.

Процентное содержание живых клеток (K) подсчитывалось по фор-
муле:

$$K = \frac{(\text{общее количество клеток} - \text{количество мертвых клеток})}{(\text{общее количество клеток})} \times 100\%$$

При использовании предложенной нами методики мы получили
84% живых клеток.

Отмытые клетки селезенки помещали в стерильные пластиковые
флаконы для культивирования объемами 40, 50 и 100 мл (Orange
Scientific, Бельгия) с плотностью 1,5 млн клеток в 1 мл. Для клеток се-
лезенки взрослых крыс культуральная питательная среда состояла из
90% среды ДМЕМ, 10% сыворотки эмбрионов коров («Биолот»,
Санкт-Петербург) и 40 мг/мл гентамицина, а для клеток эмбрио-
нальной селезенки — 85% среды ДМЕМ, 15% сыворотки эмбрионов
коров, 30 мг/мл гентамицина. Для клеток эмбриональной селезенки
однократно добавляли набор заменимых аминокислот. На дно некото-
рых культуральных флаконов устанавливали стерильные обезжирен-
ные покровные стекла для дальнейших исследований на иммерсион-
ном микроскопе.

Все клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе (Jouan, Франция) в условиях CO_2 — 5% при 37°C в течение семи суток. Через двое суток помещения клеток в культуру среду заменяли на новую. В дальнейшем среду меняли на 4-е и 6-е сутки культивирования.

Ежедневно проводили динамическое наблюдение за первичными культурами клеток на инвертированном микроскопе с программным обеспечением (Leica, Германия) с регистрацией морфологических признаков.

Морфологически культуру клеток селезеночной ткани определяли на 20–30-е сутки после посева. Клетки фиксировали 100% метанолом и окрашивали азур-эозином.

При разработке метода экспериментальной аллоксановой ИН возникли сложности, связанные с определением и уточнением дозы препарата, необходимой для получения хронического течения заболевания. У 10 крыс (4-я группа) при подкожном введении 5% водного раствора аллоксана в дозировке более 150 мг/кг веса получили токсическую реакцию (диабетико-уремический синдром), что привело к гибели лабораторных животных на 3-и сутки. Гибель животных объясняется не только ИН, но и поражением печени, почек и, возможно, других органов. Снижение дозировки препарата до 125 мг/кг веса у 10 крыс позволило получить острую форму диабета, которая характеризовалась быстрым развитием симптомов заболевания, но введение инсулина во всех случаях позволило улучшить состояние животных и получить хроническое течение заболевания.

Учитывая данные результаты, экспериментальную аллоксановую ИН у 150 крыс (5-я группа) вызывали путем однократного подкожного введения 5% водного раствора аллоксана из расчета 125 мг/кг массы тела животного на фоне 24–48-часового голодания (Баранов В.Г. с соавт., 1983) (рис. 2.3, см. цв. вклейку). Данной группе животных на 7-е сутки после начала эксперимента вводили аллогенный клеточный материал в двух вариантах. Группу 5А составили 75 крыс, которым вводился аллогенный клеточный материал, культивированный из селезеночной ткани 14-суточного эмбриона. Группу 5В составили 75 крыс, которым вводился аллогенный клеточный материал, культивированный из части удаленной селезеночной ткани взрослой крысы. Клеточный материал в количестве 1 мл, что соответствует 1 млн клеток, вводился с помощью инъекции в хвостовую часть лабораторного животного. Проведенное исследование в данной группе предполагало получить ответ на возможность коррекции экспериментальной ИН путем использования клеточных культур селезеночной ткани. Необходимо отметить, что во 2-й группе заместительная коррекция ИН проводилась до введения клеточной культуры, а в 1-й группе — в послеоперационном периоде (две недели), после чего отменялась.

Для выяснения возможности выживания и фенотипических особенностей аутогенных спленоцитов, реимплантированных в брюшную полость у пяти крыс 1-й группы, на 7-е сутки проводили релапаротомию, извлекали фрагменты, измельчали их в стеклянном гомогенизаторе в растворе Cell Wash (BD) и осуществляли окрашивание и цитометрию. Для выяснения фенотипических особенностей спленоцитов после их культивирования осуществляли стандартное иммунофлюоресцентное окрашивание клеток с использованием меченных флюорохромами моноклональных антител против антигенов CD45 и CD90 крыс (использованы антитела фирмы Caltag Labs, США). Затем проводили проточную цитофлюорометрию на цитометре FACS Calibur (исследования выполнены на базе лаборатории иммунофармакологии УрО РАН).

Материал для морфологических исследований брали из ПЖ, в первую очередь у здоровых крыс, затем у крыс, подвергнутых аллоксановой ИН и аллогенной трансплантации селезеночной ткани. После фиксации биопсийного материала размерами 0,3 x 0,3 см в нейтральном формалине и промывания проточной водой в течение 24 часов изготавливались срезы толщиной 50 мкм в криостате при температуре 25°C. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, изготовлено более 500 препаратов. Гистохимически определяли окислительно-восстановительные процессы: сукцинатдегидрогеназу по методу Нахласа, кислую фосфатазу по Гомери, кислые гликозамингликаны по Хейлу. Изготовлено более 300 препаратов.

Экспериментальное исследование по обоснованию возможности достижения трансплантационного спленоза фетальными клетками проводилось на восьми кроликах (6-я группа) обоего пола породы шиншилла весом от 2,8 до 4,5 кг. На 1-м этапе проводилась подсадка к самцам четырех самок с целью оплодотворения. После подсадки четырьмя кроликам-самцам под общей анестезией проводилась лапаротомия и спленэктомия. В послеоперационном периоде общее состояние кроликов расценивалось как удовлетворительное. Через три недели после подсадки и операции был проведен 2-й этап экспериментального исследования, суть которого заключалась в выполнении беременным самкам лапаротомии под общей анестезией и извлечении плодов из полости матки. После гемостаза производилось послойное ушивание лапаротомной раны. Количество эмбрионов у каждой особи различалось, в среднем составляло от 6 до 10, и они соответствовали 16–18 суткам беременности. После отмывания эмбрионам выполнялась лапаротомия и при дифференцировке органов брюшной полости выявлялась точечная тканевая структура светло-желтой окраски по большой кривизне желудка в области его дна. Данная структура представляла собой зародышевую селезенку, она извлекалась у всех эмбрионов и погружалась в гомогенизатор из фторопласта с добавлением

5 мл универсальной питательной среды №199. Далее производилось растирание полученной фетальной селезеночной ткани стеклянным поршнем в посуде из фторопласта. Приготовленную таким образом тканевую массу инъецировали под кожу уха четырем взрослым кроликам, у которых предполагали развитие постспленэктомического синдрома. Через полтора месяца после аллогенной трансплантации зародышевой селезеночной ткани производили забор ткани из зоны трансплантации. Микропрепараты (срезы толщиной 7 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином. Всего приготовлено 175 препаратов.

Учитывая опыт исследователей в области экспериментальной диабетологии (Баранов В.Г. с соавт., 1983), возникла необходимость модифицировать модель экспериментального панкреатэктомического СД. Изучено, что ПЖ крыс состоит из двух долек (правой и левой), расположенных по обе стороны ДПК. Если удаление левой доли не сопряжено с техническими трудностями, то удаление правой доли приводит к повреждению общего желчного протока. Выполнение субтотальной панкреатэктомии, т. е. оставление правой доли, не приводит к развитию СД. Поэтому для получения абсолютной ИН необходимо выполнить тотальную панкреатэктомию.

У 10 крыс (*1-я группа*) под эфирным наркозом выполнена тотальная дуоденопанкреатэктомия с наложением гастроюноанастомоза и цистюноанастомоза. Ход оперативного вмешательства соответствует методике, проводимой в клинической практике. В раннем послеоперационном периоде, т. е. на 2-е сутки, все животные погибли, несмотря на введение обезболивающих препаратов и антибиотиков. Высокая травматичность оперативного вмешательства оказалась для лабораторных животных не совместимым с жизнью оперативным пособием. Поэтому данная модель экспериментальной панкреатэктомической ИН нами была отмечена.

Учитывая данные результаты, нами был модифицирован метод экспериментальной тотальной панкреатэктомии, суть которого заключалась в удалении правой доли ПЖ с селезенкой, а левая доля удалялась с использованием радиохирургического аппарата Surgitron (США) (рис. 2.4, см. цв. вклейку). Использование изученных свойств радиоскальпеля (малотравматичность и отсутствие термической травмы) позволило выделить ткань ПЖ из интимно сращенных с ДПК зон, избегая при этом коагуляционного некроза стенки кишки и общего желчного протока. Также в области сегмента между желчным протоком и ДПК радиоскальпель позволял точно деструктировать нерезектабельные ткани ПЖ. На 2-е сутки после операции у лабораторных животных развивалась клиника ИН. В раннем послеоперационном периоде крысам проводились инъекции обезболивающих препаратов и антибиотиков. Для достижения хронического опыта коррекция ИН проводилась однократным введением в сутки препарата «Хумулин»,

подкожно, в расчете 0,5 ЕД/кг массы тела животного (предварительно разбавленного 100 мл физиологического раствора). Данная методика привела к ИН во всех 50 случаях эксперимента и позволила избежать летальных исходов у подавляющего большинства животных.

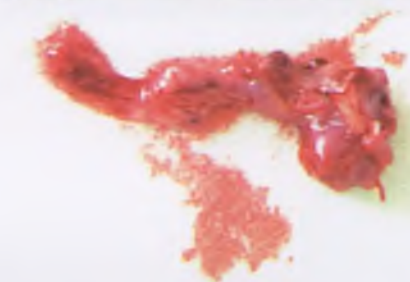
Таким образом, на предварительном этапе исследования нам удалось разработать оптимальные варианты экспериментальной ИН для изучения возможности профилактики и лечения ИН клеточными структурами селезеночной ткани.

2.2.2. Профилактика экспериментальной инсулиновой недостаточности аутотрансплантацией селезеночной ткани

Панкреатэктомическую ИН у 50 крыс (2-я группа) вызывали путем тотального удаления ПЖ и селезенки с использованием радиохирургического скальпеля, под эфирным наркозом. Для изучения эффективности клеток селезеночной ткани в профилактике и лечении ИН в разные сроки после операции экспериментальные животные 2-й группы были разделены на две подгруппы. Подгруппу 2А составили 25 крыс, которым панкреатэктомия производилась с использованием АСТ. В целях изучения возможности профилактики ИН выполняли аутотрансплантацию 1/2 части селезенки в виде фрагментов размерами 0,3 x 0,3 x 0,3 см с имплантацией их в большой сальник. Оставшаяся часть селезеночной ткани обрабатывалась в среде №199 с добавлением антибиотиков и с соблюдением правил асептики направлялась в лабораторию для выделения и последующего культивирования жизнеспособных клеток селезенки по общепринятой методике (Азаян К.Д., 2004; Берсенов А.В., 2003; Шевченко Ю.Л., 2006).

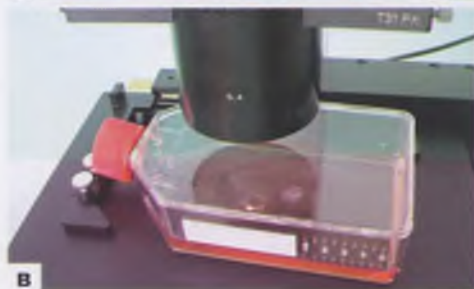
Подгруппу 2В составили 25 крыс, которым АСТ не производилась, данная категория животных была вначале использована как контрольная группа, впоследствии у них была изучена эффективность культивированных клеток соматической селезенки в послеоперационном периоде.

У экспериментальных крыс 2А группы через несколько часов после полного удаления ПЖ наступала гипергликемия и глюкозурия, максимальные величины которых отмечались с 2–3-го дня после операции (табл. 2.2). Содержание сахара в крови колебалось от 33 до 40 ммоль/л. К началу третьей недели у крыс данной группы коррекция сахара препаратом «Хумулин» была отменена — по показателям уровня сахара крови отпала необходимость. Всего за данный период погибли восемь крыс в разные сроки после операции, из них пять крыс — после острого опыта. Данное исследование позволяет сделать вывод, что тотальная панкреатэктомия у крыс вызывает выраженное гипергликемическое состояние, что приводит к гибели в первые сутки и недели после операции в результате развития кетоацидоза. Введение соответствующей дозы инсулина позволяет острый эксперимент перевести в хронический, т. е. подавляющее большинство экспери-



в

Рис. 2.1. а — спленэктомия;
б — тотальная панкреатэктомия;
в — удаленная ПЖ крысы



в

Рис. 2.2. а — питательные среды для
культивирования клеток; б — про-
цесс забора клеток для культиви-
рования; в — микроскопический
мониторинг клеточной культуры



Рис. 2.3. а — определение уровня сахара крови у экспериментальной крысы; б — группа экспериментальных крыс



Рис. 2.4. Радиохирургический аппарат Surgitron (США)

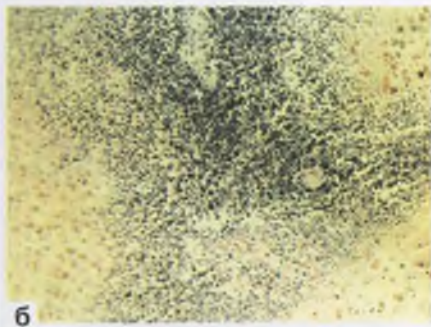


Рис. 2.6. а — изучение морфологической картины имплантата селезеночной ткани; б — белая пульпа с эксцентрично расположенной центральной артерией и красная пульпа трансплантированной части селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

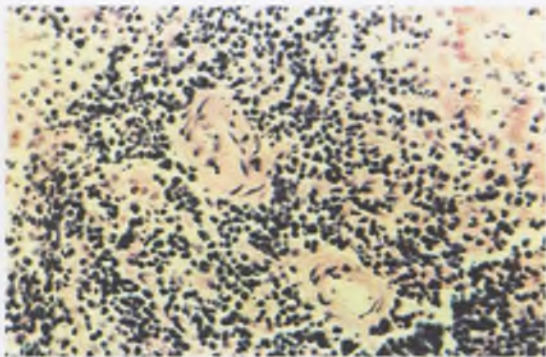


Рис. 2.7. Центральная артерия белой пульпы трансплантата селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

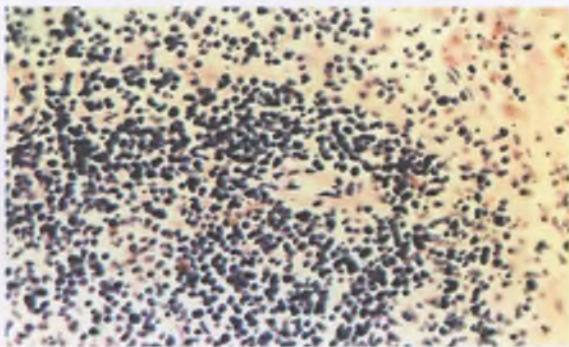


Рис. 2.8. Плотное расположение лимфоцитов, макрофагов и плазматических клеток белой пульпы трансплантата селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

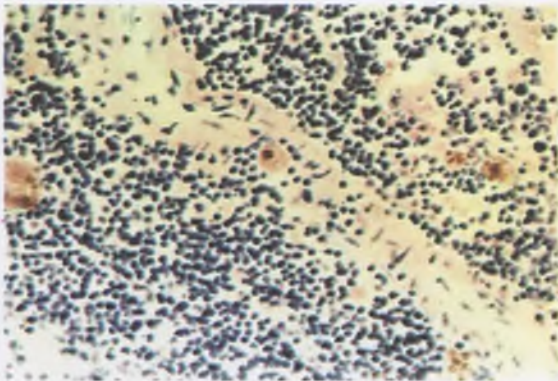


Рис. 2.9. Сидеробласты в белой пульпе и в просвете центральной артерии трансплантата селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

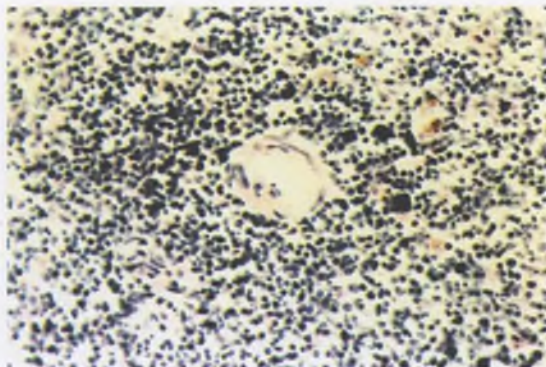


Рис. 2.10. Единичные сидеробласты в трансплантате селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

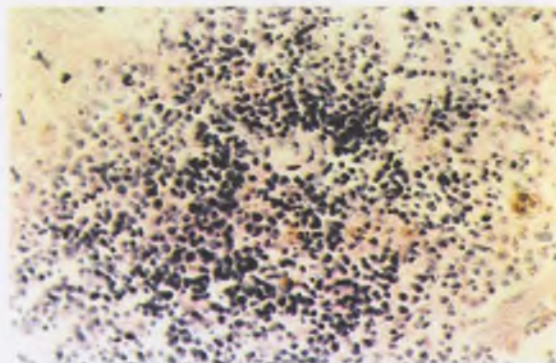


Рис. 2.11. Увеличение количества лимфоцитов в белой пульпе трансплантата селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

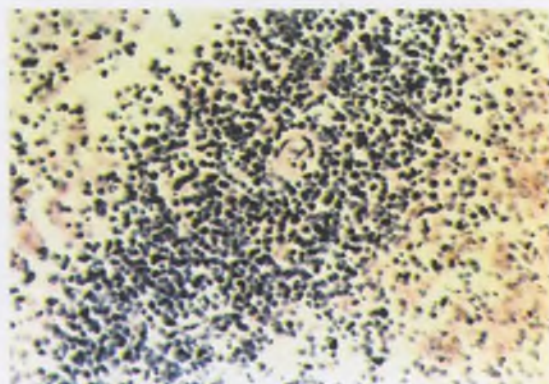


Рис. 2.12. Лимфатический узелок трансплантата селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

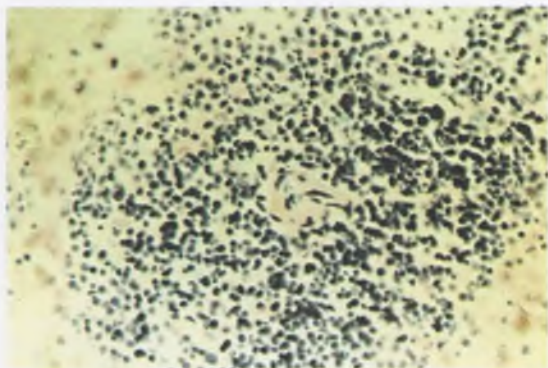


Рис. 2.13. Лимфатический узелок и возрастные количества сидеробластов в красной пульпе трансплантата селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

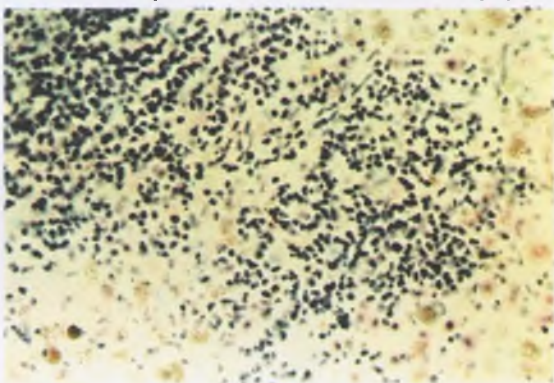


Рис. 2.14. Формирование новой белой пульпы трансплантированной селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

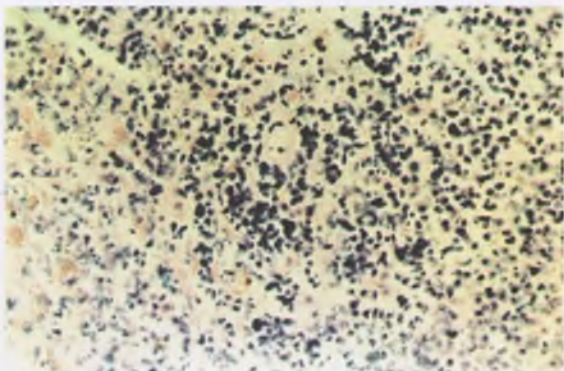


Рис. 2.15. Увеличение вновь образованной белой пульпы. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

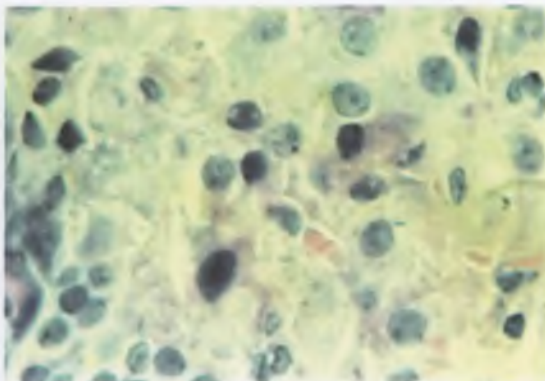


Рис. 2.19. Отростчатые клетки среди лимфоидных клеток трансплантата селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90

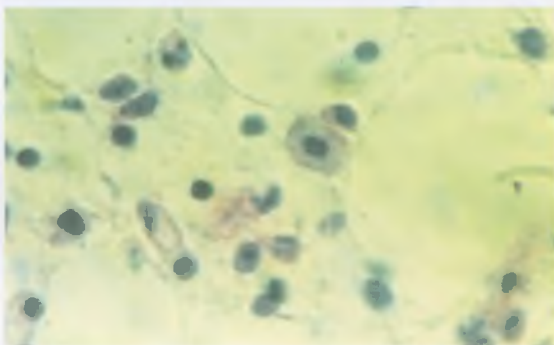


Рис. 2.20. Крупная, овальной формы клетка в трансплантате селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90

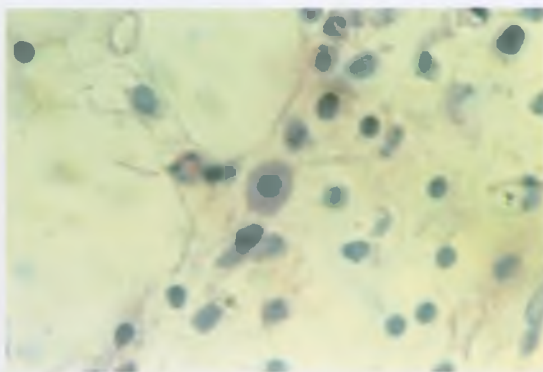


Рис. 2.21. Малодифференцированная клетка трансплантата селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90

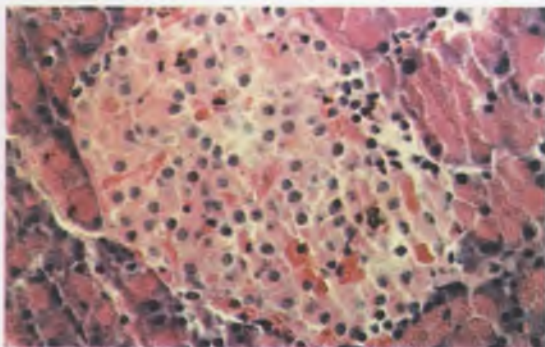


Рис. 2.22. ПЖ контрольной группы животных. Панкреатический островок и экзокринная часть железы. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90

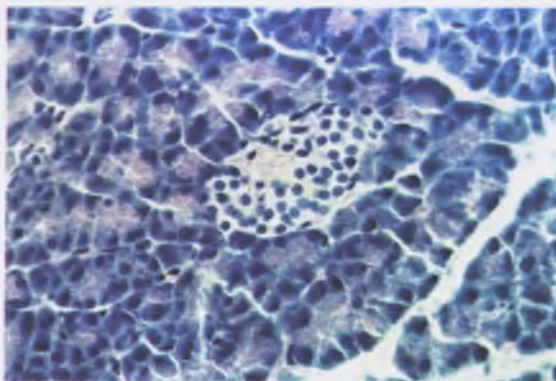


Рис. 2.27. Полное разрушение инсулоцитов центрального участка островка ПЖ при сохранении периферических клеток. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

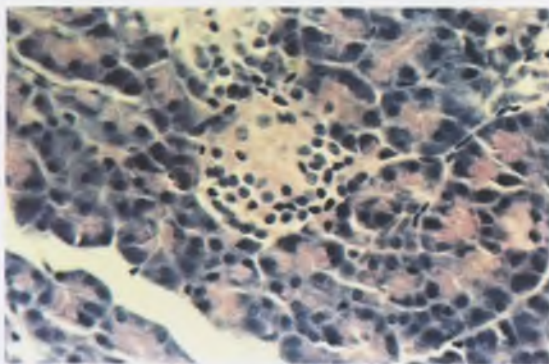


Рис. 2.28. α -клетки, расположенные по периферии панкреатического островка, сохранены; β -единичные клетки при экспериментальной ИН. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

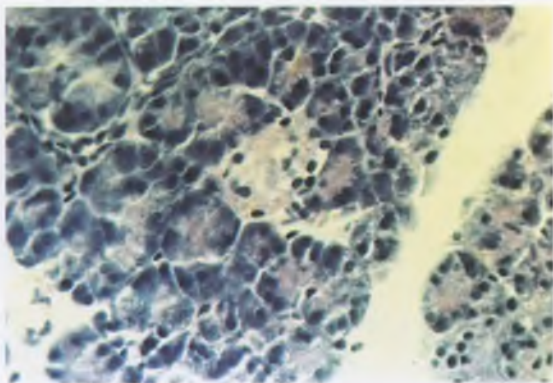


Рис. 2.29. Полная атрофия панкреатического островка ПЖ при экспериментальной ИН. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

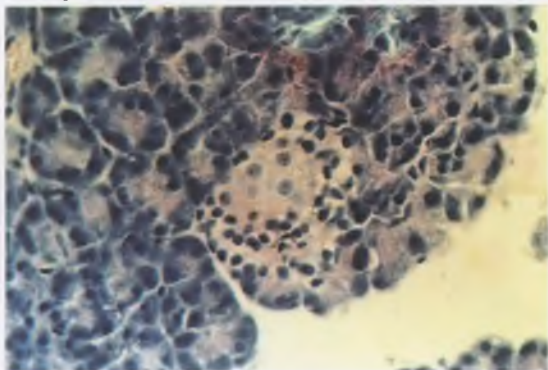


Рис. 2.30. Увеличение количества β -клеток эндокринной части ПЖ после трансплантации селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

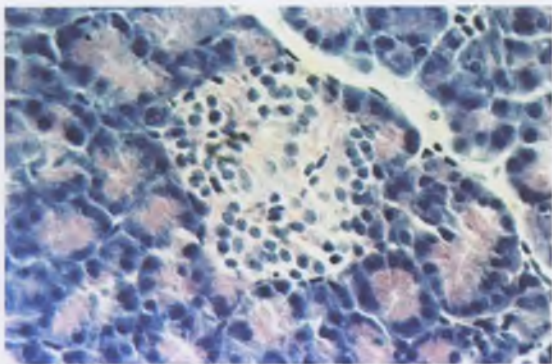


Рис. 2.31. ПЖ после трансплантации селезенки у экспериментальных животных. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

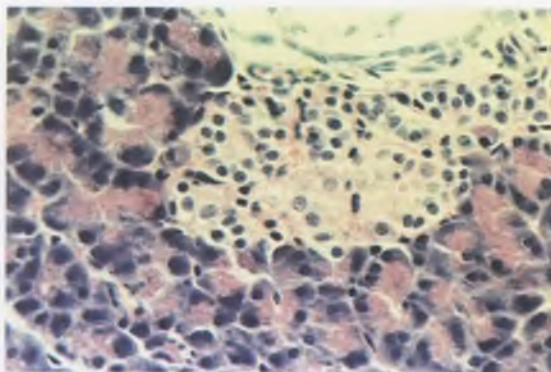


Рис. 2.32. Увеличение β -клеток в панкреатических островках ПЖ после трансплантации селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

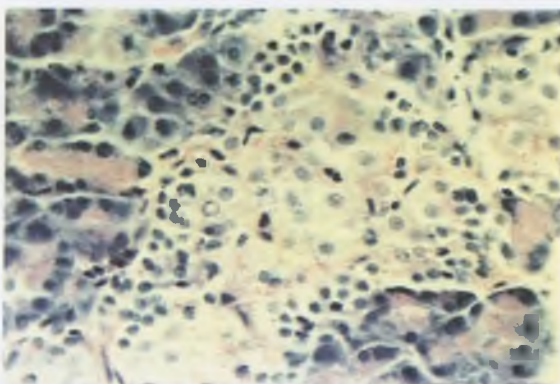


Рис. 2.33. Эндокринная и экзокринная части ПЖ после трансплантации селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

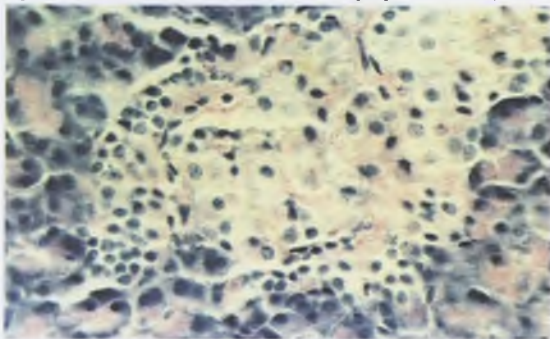


Рис. 2.34. α -клетки расположены по периферии; β -клетки занимают центральную зону эндокринной части панкреатического островка ПЖ после трансплантации селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

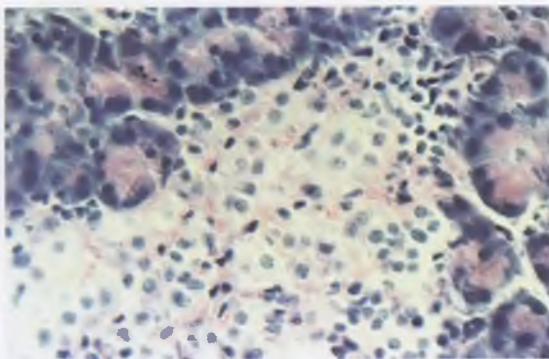


Рис. 2.35. Сеть кровеносных капилляров эндокринной части ПЖ при трансплантации селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

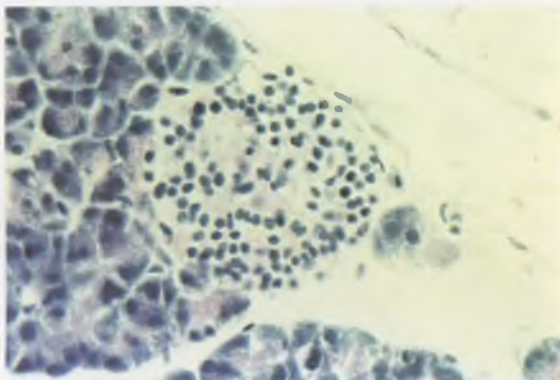


Рис. 2.36. Эндокринная часть ПЖ состоит только из α -клеток. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

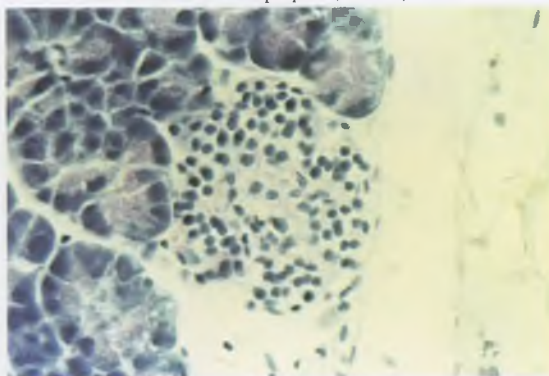


Рис. 2.37. Панкреатические островки из α -клеток при экспериментальной трансплантации селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

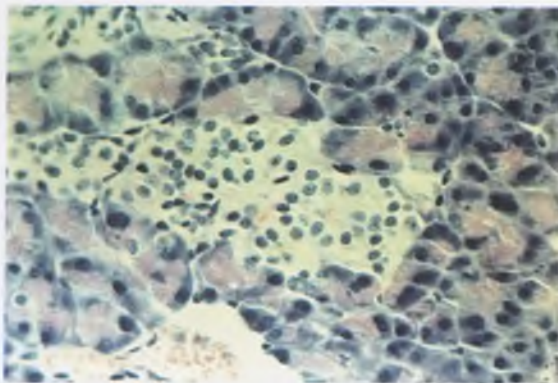


Рис. 2.38. Инсулоциты эндокринной части ПЖ у экспериментальных животных. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40



Рис. 2.39. Динамическая микроскопия культуры клеток селезеночной ткани



Рис. 2.40. Мезенхимальные стволовые клетки в культуре. Микроскопия. Увеличение 100



Рис. 2.41. Клеточные культуры

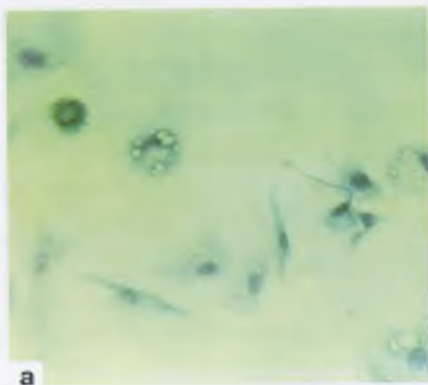


Рис. 2.42. а, б. Фибробластический дифферон, представленный всеми видами клеток



Рис. 2.46. Лапароскопическая диагностика добавочной селезенки

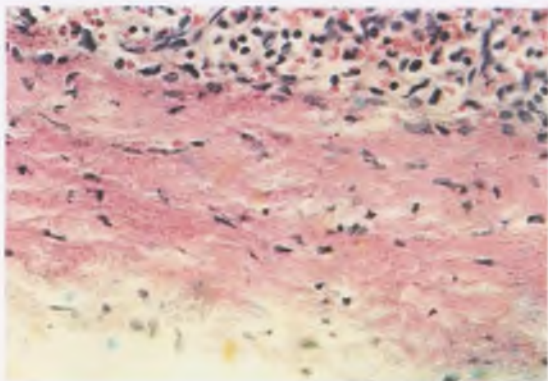


Рис. 2.48. Соединительнотканная капсула добавочной (эктопической) селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

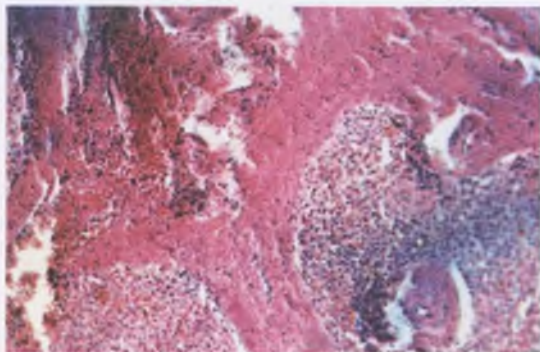


Рис. 2.49. Трабекулы капсулы добавочной селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

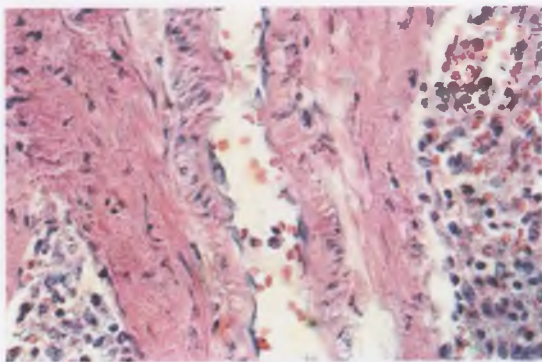


Рис. 2.50. Кровеносные сосуды трабекулы добавочной селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

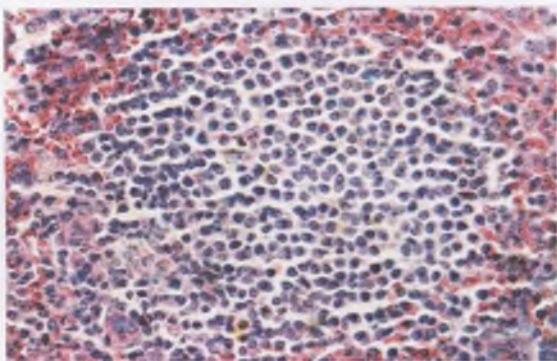


Рис. 2.51. Белая пульпа добавочной селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

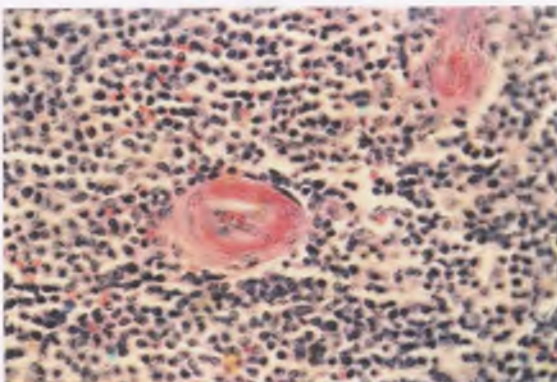


Рис. 2.52. Центральная артерия белой пульпы добавочной селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

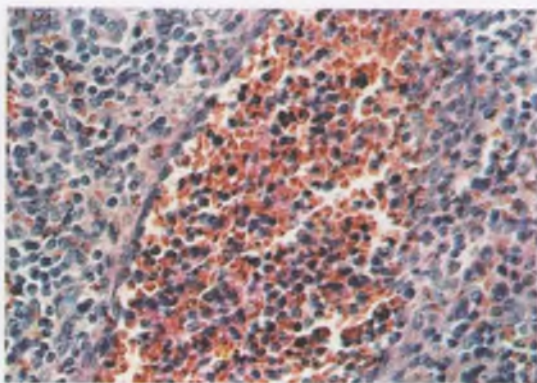


Рис. 2.53. Венозные синусы красной пульпы добавочной селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

ментальных животных можно использовать для изучения течения заболевания. В нашем опыте на ранних этапах послеоперационного периода ИН корректировалась введением пролонгированного инсулина, после его отмены гипергликемия не приобретала крайнего характера, что позволяет сделать вывод о наличии компенсаторного механизма, и данным механизмом могут выступать имплантированные ткани собственной селезенки.

Таблица 2.2

**Показатели сахара крови у экспериментальных крыс
с панкреатэктомической инсулиновой недостаточностью**

Сроки после операции	Группы 2А груп- па	2В группа
До операции	$4,88 \pm 0,19$	$4,72 \pm 0,20$
2-е сутки (начало инсулинотерапии)	$38,5 \pm 2,75$ $p > 0,05$	$37,6 \pm 2,60$ $p > 0,05$
5-е сутки (инсулинотерапия продолжается)	$23,5 \pm 1,32$ $p > 0,05$	$24,8 \pm 0,26$ $p < 0,001$
8-е сутки (инсулинотерапия продолжается)	$15,1 \pm 1,58$ $p > 0,05$	$17,8 \pm 1,20$ $p > 0,05$
14-е сутки (отмена инсулинотерапии)	$17,2 \pm 1,10$ $p > 0,05$	$23,3 \pm 2,75$ $p > 0,05$
21-е сутки	$12,9 \pm 1,28$ $p < 0,001$	$31,5 \pm 2,30$ $p < 0,01$ (введение клеточных культур)
28-е сутки	$11,0 \pm 0,83$ $p > 0,05$	$19,0 \pm 1,77$ $p > 0,05$ (отмена инсулинотерапии)
40-е сутки	$9,77 \pm 1,27$ $p < 0,001$	$17,2 \pm 1,20$ $p > 0,05$
60-е сутки	$7,66 \pm 1,03$ $p < 0,001$	$11,9 \pm 1,28$ $p < 0,001$
90-е сутки	$7,11 \pm 1,70$ $p < 0,005$	$11,0 \pm 1,07$ $p < 0,001$
Через 6 мес.	$6,61 \pm 0,32$ $p < 0,001$	$7,72 \pm 1,27$ $p < 0,005$
Через 1 год	$5,66 \pm 0,21$ $p > 0,05$	$7,31 \pm 1,40$ $p < 0,005$

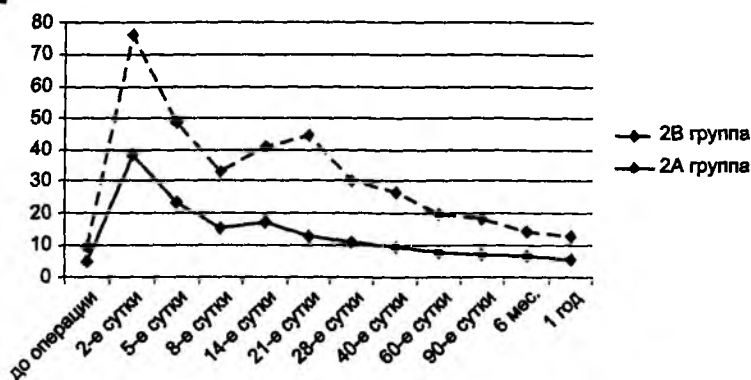


Рис. 2.5. Показатели уровня сахара крови у экспериментальных крыс с панкреатэктомической инсулиновой недостаточностью

К концу первого месяца эксперимента лабораторные животные стали активными, исчезла выраженная вялость, начал проявляться интерес к пище. Изучение показателей сахара крови в динамике показало тенденцию к резкому снижению ($11,0 \pm 0,83$), хотя заместительная терапия инсулином не проводилась. К концу первого года после операции крысы выглядели совершенно здоровыми, показатели сахара крови приблизились к нормальным.

У экспериментальных крыс 2В группы также через несколько часов после полного удаления ПЖ наступала гипергликемия и глюкозурия, максимальные величины которых отмечались со 2–3-го дня после операции (табл. 2.2; рис. 2.5). Содержание сахара в крови колебалось от 33 до 40 ммоль/л. К концу второй недели попытка отмены коррекции сахара у крыс препаратом «Хумулин» привела к гибели 12 крыс от глюкозурии и кетоацидоза. Продолжение курса заместительной терапии пролонгированным инсулином позволило перевести остальных 13 животных в хронический опыт. К концу третьей недели данной группе экспериментальных животных проводился курс клеточной терапии, т. е. в хвостовую вену была введена инъекция клеточных культур взрослой селезенки, культивированных в условиях лаборатории трансплантологии, после чего заместительная инсулиноterapia была отменена. К началу 3-го месяца эксперимента крысы данной подгруппы стали более активными, начали заметно прибавлять в весе. Исследование показателей сахара крови показало тенденцию к постепенному снижению ($11,0 \pm 1,07$), с приближением к нормальным показателям. К концу первого года жизни после операции лабораторные животные вели себя активно, выглядели здоровыми, показатели сахара крови приблизились к нормальным единицам. Данное исследование позволило сделать вывод, что тотальная панкреатэктомия без АСТ у крыс вызывает выраженное гипергликемическое состояние, что приводит к гибели в первые сутки и недели после операции в результате развития кетоацидоза.

Введение соответствующей дозы инсулина позволяет острый эксперимент перевести в хронический, т. е. более половины экспериментальных животных можно использовать для изучения течения заболевания.

В данном опыте на ранних этапах послеоперационного периода ИН корректировалась введением пролонгированного инсулина, после его отмены гипергликемия приобретала крайний характер, что позволяет сделать вывод об отсутствии компенсаторного механизма у данной категории животных. Только трансплантация культивированных клеточных культур селезеночной ткани взрослой крысы позволила продолжить эксперимент, избежать летального исхода в половине случаев и в конечном итоге стабилизировать показатели сахара крови. Данное исследование еще раз убедительно показало, что в клеточной структуре селезеночной ткани лабораторных животных существует компенсаторный механизм, который имеет прямое отношение к коррекции ИН.

Таким образом, данное исследование позволило сделать вывод о возможности наличия компенсаторного механизма в структуре АСТ. По предварительным результатам нашего исследования мы можем предположить, что замещение постспленэктомического иммунодефицита и постпанкреатэктомической ИН происходит за счет участия в регенерации стволовых клеток селезеночной ткани. Для получения ответов на вопросы, возникшие на данном этапе исследования, нами проводилось более углубленное изучение клеточных структур селезеночной ткани.

2.2.3. Морфологическая структура трансплантата селезеночной ткани, выполненной при экспериментальной инсулиновой недостаточности

По данным ряда научных исследований, при трансплантации селезеночной ткани в область корня брыжейки тонкой кишки отмечается рост и развитие всех структурных частей, включая восстановление кровоснабжения трансплантата. Некоторыми авторами утверждается, что вместе с трансплантатом попадают стволовые клетки, способствующие стимулированию роста β -клеток панкреатических островков ПЖ при экспериментальной ИН.

Ставилась цель изучить возможности трансплантации фрагмента селезенки в какие-то участки тела подопытных животных после экспериментальной ИН, а также определить, могут ли стволовые клетки трансплантата селезенки стимулировать эндокринные клетки панкреатических островков в отношении выделения гормона инсулина (рис. 2.6 а, см. цв. вклейку).

При трансплантации части селезенки в корень брыжейки тонкой кишки в гистологических препаратах определяются все структурные части селезенки, а именно белая и красная пульпа с соединительнотканными перегородками и их кровеносными сосудами, включая центральную

артерию (рис. 2.6 б, см. цв. вклейку). Белая пульпа селезенки представлена лимфоидной тканью, образованной из лимфатических узелков, периартериального лимфатического влагалища и маргинальной зоны, хотя четкая граница между ними, особенно маргинальной зоны, определяется с трудом. Центральная артерия мышечного типа мелкая, однако отдает коллатерали в виде мелких кровеносных сосудов. В красной пульпе выделяются венозные синусы, тогда как селезеночные или пульпарные течи четкого разделения не имеют, тем не менее во всех кровеносных сосудах различного калибра отмечается циркуляция крови. В красной пульпе и в небольшом количестве в белой пульпе довольно часто встречаются сидеробласты и сидероциты, образованные в результате фагоцитоза макрофагами интенсивно разрушающихся эритроцитов. Цитоплазма сидеробластов заполнена гранулами пигментов ферритина, гемосидерина и билирубина, т. е. продуктами распада эритроцитов.

Лимфоидные клетки располагаются достаточно плотно вокруг центральной артерии и тесно прилегают к стенке кровеносного сосуда. По краям белой пульпы лимфоциты постепенно рассеиваются в сторону красной пульпы (рис. 2.7, см. цв. вклейку), особенно много лимфоцитов в лимфатических фолликулах (рис. 2.8, см. цв. вклейку) и в периартериальном лимфатическом влагалище. В небольшом количестве сидеробласты, заполненные гранулами гемосидерина, встречаются и в просвете центральной артерии (рис. 2.9, см. цв. вклейку), а также среди лимфоцитных клеток белой пульпы (рис. 2.10, 2.11, см. цв. вклейку), особенно много сидеробластов в красной пульпе трансплантата селезенки (рис. 2.12, 2.13, см. цв. вклейку). Наряду с имеющимися лимфатическими фолликулами определяется формирование новых скоплений лимфоидных клеток (рис. 2.14, см. цв. вклейку), они небольшого размера и достаточно свободно располагаются по отношению друг к другу, вокруг новых фолликул красная пульпа с большим количеством сидеробластов. Вновь образованные и формирующиеся скопления лимфоидных клеток увеличиваются в размерах, постепенно распространяются в сторону красной пульпы (рис. 2.15, см. цв. вклейку), при этом лимфоидные клетки равномерно распределяются на значительное расстояние, а в некоторых случаях новые фолликулы начинают формироваться в непосредственной близости от кровеносных сосудов (рис. 2.16, см. цв. вклейку) или в красной пульпе (рис. 2.17, см. цв. вклейку). Встречаются лимфоидные фолликулы, образованные не только лимфоцитами, но и различными макрофагами (рис. 2.18, см. цв. вклейку), также окруженные сидеробластами и кровеносными капиллярами, определяется активное образование и рост кровеносных сосудов (рис. 2.19, см. цв. вклейку). Именно в центральной части скоплений макрофагов встречаются достаточно крупные клетки отростчатой, округлой или овальной формы (рис. 2.20–2.21, см. цв. вклейку). Размеры ядра такие же, что и в остальных макрофа-

гах, хроматин гомогенный, цитоплазма характеризуется базофилией, цитолемма и кариолемма хорошо определяются. Вполне допустимо, что это малодифференцированные и, вполне вероятно, стволовые клетки трансплантата.

Параллельно проводилось изучение функциональной активности клеток макрофагической системы трансплантата. Методом Перлса проводилась гистохимическая реакция по определению железа в макрофагах (рис. 2.22, см. цв. вклейку). При этом отмечалась высокая реакция на железо в макрофагах трансплантата селезенки, гранулы железа сконцентрированы в цитоплазме в различном количестве, некоторые гранулы крупного размера.

Следовательно, трансплантат селезенки характеризуется ростом и развитием ангиогенеза и восстановлением циркуляции крови по кровеносным сосудам. Вполне вероятно, что в трансплантате селезенки имеющиеся стволовые клетки кроветворного органа получают стимул реализации генетической информации, что и способствует восстановлению, росту и функционированию β -клеток панкреатических островков при искусственной ИН.

2.2.4. Клеточная структура трансплантатов селезеночной ткани, использованных для коррекции экспериментальной инсулиновой недостаточности

Современные исследования в области клеточных технологий в хирургии позволяют рассматривать трансплантации селезеночной ткани как вариант восстановительной терапии стромальными стволовыми клетками. Подтверждением этому являются сообщения ряда исследователей о том, что для регуляции восстановительных процессов в поврежденных органах и тканях различного фенотипа возможно использовать селезеночную ткань, которой присуща не только иммуногенетическая, но и морфогенетическая функция (Апарцин К.А., 2001; Тимербулатов В.М. с соавт., 2005; Тимербулатов М.В. с соавт., 2004). Проведенные нами экспериментальные исследования позволили установить, что введение крысам с индуцированной панкреатэктомической и аллоксановой ИН аллогенных эмбриональных спленоцитов или аллогенных спленоцитов взрослых крыс после предварительного культивирования клеток *in vitro* обеспечивало коррекцию ИН, стабилизировало показатели гликемии, увеличивало выживаемость животных (Тимербулатов В.М. с соавт., 2006). Представляло интерес выяснить некоторые фенотипические характеристики трансплантируемых клеток.

Кроме того, была поставлена задача установить фенотипические особенности аутогенных спленоцитов, трансплантированных в брюшную полость крысы после спленэктомии, спустя семь дней после проведенного оперативного вмешательства.

Культивирование клеток селезеночной ткани производилось после мягкого механического измельчения селезеночной ткани. Кусочки ткани трипсинизированы на магнитной мешалке (37°C, 3 мин). Клетки отмывали средой культивирования и затем культивировали в течение семи суток в среде DMEM с добавлением 5% эмбриональной сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург) в термальной комнате.

После культивирования осуществляли прямое двухпараметрическое окрашивание с использованием PE-меченых мышинных моноклональных антител против антигена CD45 крыс (анти-CD45-PE, Caltag Labs) и FITC-меченых мышинных моноклональных антител против антигена CD90 крыс (анти-CD90-FITC, Caltag Labs) и соответствующих «изотипических» контролей. Процедуру окрашивания осуществляли стандартным способом. Цитофлюорометрию осуществляли на проточном цитометре FACSCalibur (BD). Данные анализировали в рамках программы CellQuest.

Для выяснения возможности выживания и фенотипических особенностей аутогенных спленоцитов, реплантированных в брюшную полость крыс после спленэктомии, анестезированным крысам осуществляли спленэктомию, затем помещали в брюшную полость 3–5 фрагментов селезеночной ткани, брюшную полость ушивали. Спустя семь суток крыс забивали путем декапитации, извлекали фрагменты, измельчали их в стеклянном гомогенизаторе в растворе CellWash (BD) и осуществляли окрашивание и цитометрию. Табл. 2.3 и рис. 2.23 иллюстрируют фенотипическую характеристику анализируемых клеток.

Таблица 2.3

Фенотипическая характеристика эмбриональных спленоцитов и зрелых спленоцитов после 7-суточного культивирования и спленоцитов, полученных из реплантированных в брюшную полость фрагментов

№	Вид клеток	Относительное содержание клеток, %		
		CD45+CD90-	CD45+CD90+	CD45-CD90-
1	Эмбриональные спленоциты	20,2±15,1	31,5±10,4*	9,6±8,8
2	Зрелые спленоциты	77,7±5,0	10,9±1,7	0,3±0,3
3	Спленоциты, полученные из фрагментов селезенки	6,6±1,6	4,2±1,8	0,5±1,2
* Достоверные различия между группами 1 и 2 (P<0,05)				

Известно, что стволовые клетки гематопоезического происхождения экспрессируют на мембране как общелейкоцитарный антиген — гликопротеин CD45, так и, в отличие от зрелых клеток, антиген-белок CD90

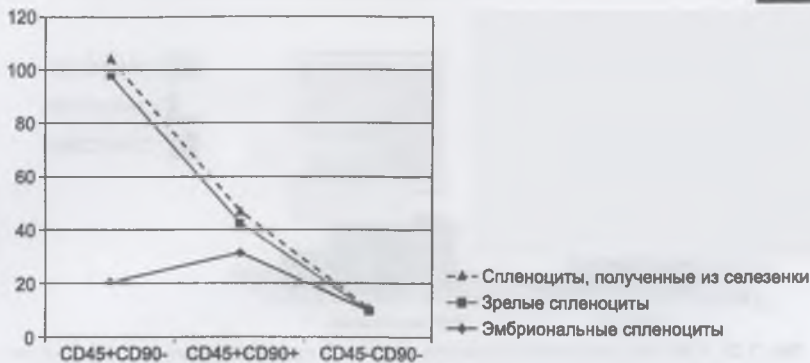


Рис. 2.23. Фенотипическая характеристика эмбриональных спленоцитов и зрелых спленоцитов после 7-суточного культивирования и спленоцитов, полученных из реплантированных в брюшную полость фрагментов

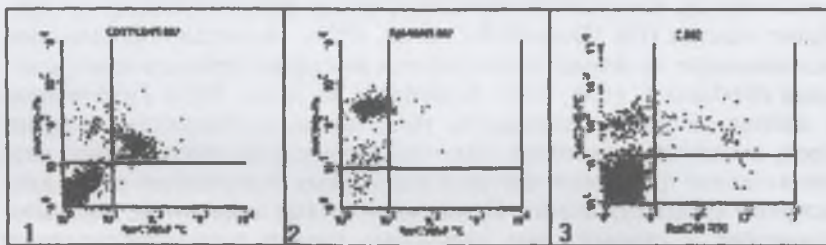


Рис. 2.24 Цитофлюорограммы, иллюстрирующие результаты иммунофенотипирования эмбриональных спленоцитов и зрелых спленоцитов после 7-суточного культивирования и спленоцитов, полученных из имплантированных в брюшную полость фрагментов аутологичной селезенки (1 — аллогенные эмбриональные спленоциты; 2 — аллогенные спленоциты; 3 — аутологичные спленоциты из фрагментов селезенки)

(Thy-1). На представленном слайде (рис. 2.24, 2.25) видно, что в культурах спленоцитов взрослых крыс количественно преобладали зрелые CD45+CD90-клетки, доля стволовых гематопозитических клеток (CD45+CD90+) составила около 11%. В культурах эмбриональных спленоцитов количественно преобладали стволовые гематопозитические клетки. Причем, несмотря на небольшое число наблюдений ($n = 3$), в рамках однофакторного дисперсионного анализа были выявлены статистически значимые различия (F — критерий Фишера — 23,4, $P = 0,0084$).

Интересно, что в культурах эмбриональных спленоцитов идентифицировались клетки, которые экспрессировали антиген CD90, но не экспрессировали лейкоцитарный антиген CD45. Такой фенотип характерен для стромальных стволовых клеток (Badet L. et al., 2002). Клеточная структура извлеченных из брюшной полости аутологичных фрагментов селезенки также характеризовалась наличием как зрелых форм гематопозитических клеток, так и стволовых гематопозитических и стромальных клеток.

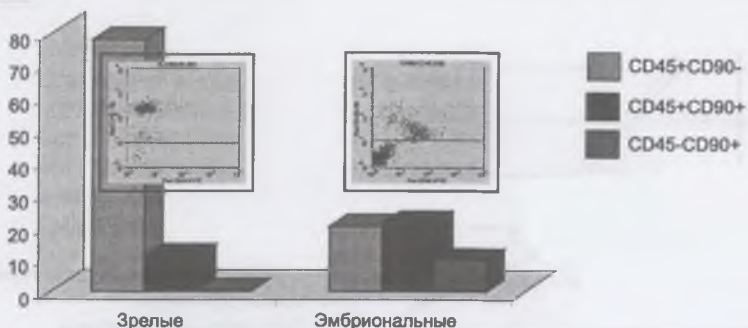


Рис. 2.25. Субпопуляционная структура клеток в 7-суточных культурах зрелых и эмбриональных спленоцитов крыс (проточная цитофлюорометрия)

Обнаружено, что селезенка может быть источником взрослых стволовых клеток, которые способны восстанавливать инсулинпродуцирующие участки ПЖ (Deutsch J.C. et al., 1999). Имеются исследования, указывающие на возможность синтеза инсулина стромальными клетками (Kodama S. et al., 2005; Koulmanda M. et al., 2003). Полученные в настоящей работе результаты убедительно подтверждают сохранность и наличие стволовых гематопозитических (и стромальных) клеток в составе трансплантируемых аллогенных спленоцитов после длительного культивирования. Кроме того, зрелые лейкоциты, гематопозитические и стромальные стволовые клетки идентифицированы в аутологических фрагментах селезенки, реплантированных в брюшную полость после спленэктомии. Этот факт весьма интересен с точки зрения подходов к коррекции постпанкреатэктомической ИН.

2.2.5. Коррекция экспериментальной аллоксановой инсулиновой недостаточности путем трансплантации культивированных клеточных культур селезеночной ткани

В 5-й группе экспериментального материала аллоксановая ИН получена у всех животных. Первые три дня являются критическими, и восемь крыс погибли в эти сроки. Причина смерти — гипергликемическая кома (диаграмма летальности). Коррекцию ИН проводили введением пролонгированного инсулина, что позволило перевести остальных лабораторных животных в хронический эксперимент. В первую неделю показатели сахара крови колебались от 28,5 до 38,5 ммоль/л, замечательная коррекция продолжалась в течение одной недели. К концу недели всем животным проводилась инъекция аллогенных клеточных культур в двух вариантах — эмбриональной (5А подгруппа) и взрослой (5В подгруппа) селезенки. Клеточный материал в количестве 1 мл, что соответствует 1 млн клеток, вводился с помощью инъекции в хвост-

вую часть лабораторного животного. Крысам продолжалась заместительная коррекция ИН еще в течение недели, после чего была отменена. Если в первую неделю после клеточной терапии показатели сахара крови колебались от 14,5 до 22,0 ммоль/л, то в последующем отмечалось снижение в среднем до 8,5 единицы (табл. 2.4). Если в 5А группе крыс отмечалось ускоренное, значительное и стойкое снижение, то в 5В группе снижение показателей носило длительный и волнообразный характер. К концу первого месяца трансплантации лабораторные животные стали более активными и начали хорошо питаться.

Таблица 2.4

**Показатели сахара крови у экспериментальных крыс с аллоксановой
инсулиновой недостаточностью**

Сроки после операции	Группы	5А группа	5В группа
До операции		$5,5 \pm 0,19$ $p < 0,05$	$5,05 \pm 0,28$ $p > 0,05$
2-е сутки (начало инсулинотерапии)		$39,5 \pm 1,75$ $p > 0,05$	$38,6 \pm 1,60$ $p > 0,05$
5-е сутки (инсулинотерапия продолжается)		$23,5 \pm 1,32$ $p > 0,05$	$24,8 \pm 0,26$ $p < 0,001$
8-е сутки (инсулинотерапия продолжается, трансплантация клеточных культур)		$15,1 \pm 1,58$ $p > 0,05$	$17,8 \pm 1,20$ $p > 0,05$
14-е сутки (отмена инсулинотерапии)		$17,2 \pm 1,10$ $p > 0,05$	$21,3 \pm 1,75$ $p > 0,05$
21-е сутки		$12,9 \pm 1,28$ $p < 0,001$	$17,5 \pm 2,30$ $p < 0,01$
28-е сутки		$11,0 \pm 0,80$ $p > 0,05$	$16,0 \pm 1,17$ $p > 0,05$
40-е сутки		$9,77 \pm 1,27$ $p < 0,001$	$10,2 \pm 1,31$ $p > 0,05$
60-е сутки		$7,66 \pm 1,03$ $p < 0,001$	$10,9 \pm 1,38$ $p < 0,001$
90-е сутки		$7,11 \pm 1,70$ $p < 0,005$	$8,0 \pm 1,07$ $p < 0,001$
Через 6 мес.		$6,91 \pm 0,33$ $p < 0,001$	$7,72 \pm 1,27$ $p < 0,005$
Через 1 год		$5,11 \pm 0,22$ $p > 0,05$	$6,37 \pm 1,40$ $p < 0,005$

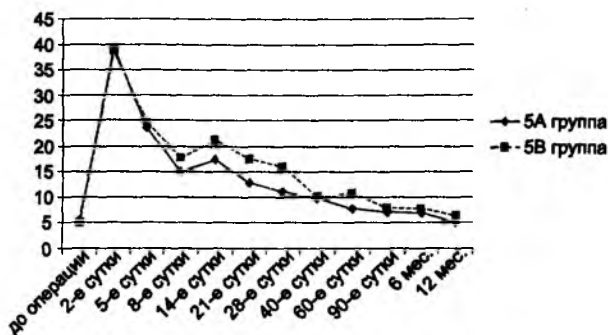


Рис. 2.26. Показатели уровня сахара крови у экспериментальных крыс с аллоксановой инсулиновой недостаточностью

Проведенное исследование в данной группе предполагало получить ответ на возможность коррекции экспериментальной ИН путем использования клеточных культур селезеночной ткани. Данное исследование позволило убедиться, что аллогенная имплантация селезеночной ткани с течением времени (более четырех недель) в большинстве случаев приводит к постепенной коррекции ИН до нормальных показателей к концу 60-х суток (рис. 2.26).

Полученные результаты позволили убедиться, что культивированные клетки селезеночной ткани также обладают компенсаторным механизмом при коррекции ИН. Более эффективными в этом отношении являются клетки эмбриональной селезеночной ткани, что и понятно с позиции их меньшей дифференцированности. Клеточные культуры взрослой селезенки также показали свою эффективность, хотя привели к коррекции ИН в более длительный период.

2.2.6. Морфологическая структура поджелудочной железы при аллогенной трансплантации клеточных культур селезеночной ткани

У контрольной группы животных основной структурно-функциональной единицей экзокринной части ПЖ является ацинус, который образован ацинарными клетками. Эндокринная часть железы имеет вид овальной или неправильной формы скопления клеток — панкреатические островки. При обычных методах гистологической обработки инсулоциты слабо окрашиваются, островки выглядят светлыми участками на фоне интенсивно окрашенных концевых отделов экзокринной части ПЖ. Эндокринная часть ПЖ отделяется от экзокринной тонкими прослойками соединительной ткани. Панкреатические островки состоят из различных инсулоцитов, между которыми располагаются ретикулярные волокна и фенестрированные кровеносные капилляры. Как из-

вестно, α -клетки составляют 20–25% общего числа инсулоцитов и располагаются преимущественно по периферии островков. Это округлые клетки с круглым ядром и узкой цитоплазмой, содержащей плотные гранулы. β -клетки составляют 60–70% общего числа инсулоцитов, образуют центральную часть островков. Они кубической или призматической формы, иногда отростчатые, располагаются тяжами вдоль кровеносных капилляров, имеют круглые, богатые гетерохроматином ядра, гранулы, содержащие гормон инсулин, скапливаются у конца клетки, примыкающего к капилляру.

У животных, подвергнутых экспериментальной аллоксановой ИН, в островках ПЖ определяются выраженные гистологические изменения. Прежде всего нарушается гистоструктура инсулоцитов, расположенных в центральной части эндокринной железы. При этом клетки теряют четкость клеточных границ, цитоплазма клеток приобретает сродство к оксифилии, появляются мелкие гранулы, содержащие жидкую среду, ядра дегенерирующих клеток уплотнены, тогда как у других клеток хроматин слабо воспринимает красители. В целом центрально расположенные клетки подвергаются кариопикнозу, кариолизису или кариорексису (рис. 2.27, см. цв. вклейку). В результате деструктивно-дегенеративного процесса центральная часть островков замещается соединительно-ткаными структурами, т. е. коллагеновыми волокнами и фибробластами, одновременно нарушается циркуляторная функция кровеносных капилляров. Вместе с тем клетки, расположенные по периферии панкреатического островка, остаются без изменений. Они по-прежнему хорошо окрашиваются, четко определяется цитолемма, цитоплазма окрашивается оксифильно, ядро — базофильно, хроматин плотный (рис. 2.28, см. цв. вклейку). Клетки располагаются в виде кольца вокруг разрушающихся клеток, расположенных в центральной части островка. Однако встречаются отдельные панкреатические островки с дегенеративными процессами не только центрально расположенных инсулоцитов, а также эндокриноцитов, расположенных по периферии (рис. 2.29, см. цв. вклейку). При этом эндокриноциты центральной части полностью подвергаются деструктивно-дегенеративным процессам, на их месте остаются отдельные фрагменты клеточных структур, несколько увеличиваются коллагеновые волокна, фибробластические клетки, а также отдельные макрофагические клетки. Разбросанные по периферии отдельные клетки также подвергаются деструктивным процессам, некоторые из них имеют характерные клеточные строения, однако цитолемму клеток определить невозможно, хроматин ядра таких клеток сильно уплотнен, тогда как ядра других клеток слабо прокрашиваются или фрагментируются на отдельные части. В целом разрушающиеся панкреатические островки начинают замещаться бесструктурной белково-углеводной массой (остатки разрушающихся клеток-инсулоцитов). Постепенно исчезает сеть кровеносных капилляров и даже разграничительная соединительнотканная

прослойка между секреторными отделами эндокринной части ПЖ и разрушающимися эндокринными островками. Вместе с тем наряду с разрушающимися эндокринными островками встречаются инсулоциты с относительно сохраненными гистологическими структурами.

После аллогенной трансплантации клеточных культур селезенки подопытным животным с экспериментальной ИН в их поджелудочной железе начинают восстанавливаться эндокринные островки. При этом среди ацидофильных клеток, расположенных по периферии островка, появляются отдельные базофильные клетки (рис. 2.30, см. цв. вклейку). Ацидофильные клетки преимущественно сконцентрированы по периферии эндокринного островка, для них характерны ядра с плотным хроматином, ядрышки не определяются, клетки располагаются плотно друг к другу. Среди ацидофильных клеток обнаруживаются клетки достаточно крупного размера, полигональной формы, с четкой границей, базофильным оттенком цитоплазмы, довольно крупным, округлой формы ядром, расположенным в центральной части клетки, хроматин ядра неплотный, определяются одно или два ядрышка. Клетки тесно контактируют между собой, между ними определяются кровеносные капилляры. Тогда как в других панкреатических островках количество базофильных клеток становится еще больше, все клетки характеризуются гомогенным хроматином, также содержат ядрышки, клетки полигональной формы, с четкой цитолеммой, однако среди них появляются клетки с признаками деструкции. Вполне вероятно, что это результат апоптоза, т. е. физиологически запрограммированная гибель клеток. Индуцирующим сигналом, запускающим генетическую программу апоптоза, могут служить недостаточность гормонального фактора, неполный контакт клеток между собой или компонентами межклеточного вещества, а также различные повреждающие факторы физического и химического характера, например гипоксия, ишемия в результате недостаточного восстановления сети кровеносных капилляров. При этом хроматин в ядре приобретает форму крупных полулуний или концентрируется у кариолеммы, тогда как центральная часть ядра заполняется светлой бесструктурной массой. Разрушающиеся отдельные клетки постепенно теряют цитолемму, затем фрагментируется цитоплазма. Наряду с кариолизисом встречаются клетки с фрагментацией ядра. Панкреатические островки продолжают увеличиваться в размерах за счет как α -клеток, так и β -клеток, однако единичные деструктивные явления β -клеток встречаются. Сеть кровеносных капилляров проявляется в еще большей степени (рис. 2.31, см. цв. вклейку), они умеренно полнокровны. После трансплантации клеточной культуры селезенки подопытным животным островки ПЖ продолжают увеличиваться (рис. 2.32, 2.33, 2.34, см. цв. вклейку), α -клетки располагаются по периферии панкреатических островков, клетки характеризуются плотным расположением, хроматин ядра плотный, часть клеток с гомогенным хроматином ядра, цитоплазма окрашивается оксифильно, границы

клеток определяются хорошо. Центральную часть островков занимают базофильные клетки, характеризующиеся полигональным строением, с хорошо выраженной границей клеток, ядро занимает центральное положение, ядра отдельных клеток с плотно сконцентрированным хроматином, однако у подавляющего большинства β -клеток хроматин ядра гомогенный. Вместе с тем встречаются единичные клетки с характерными признаками апоптоза, когда хроматин концентрируется у кариолеммы, тогда как центр ядра имеет вид светлого пузырька. У многих панкреатических островков развита соединительнотканная прослойка на границе с экзокринной частью ПЖ, определяются соединительнотканые прослойки, разделяющие инсулоциты на отдельные участки (зоны), а в соединительнотканых прослойках развита сеть фенестрированных кровеносных капилляров, плотно прилегающих к инсулоцитам, кровеносные капилляры умеренного полнокровия (рис. 2.35, см. цв. вклейку). Однако у подопытных животных с искусственным СД и трансплантированной селезеночной тканью продолжают встречаться панкреатические островки с небольшим количеством β -клеток (рис. 2.36, 2.37, см. цв. вклейку), при этом основную их массу составляют α -клетки с характерными гистологическими структурами. Кровеносные капилляры островков хорошо развиты, умеренного полнокровия (рис. 2.38, см. цв. вклейку). Тонкая соединительнотканная присоска между экзокринными и эндокринными частями, соединительнотканые присоски между инсулоцитами также определяются.

Таким образом, при введении подопытным животным клеточных культур селезеночной ткани в гистологических структурах панкреатических островков ПЖ определяются выраженные деструктивные процессы центрально расположенных клеток, т. е. β -клеток, тогда как α -клетки остаются без изменений, одновременно с деструктивно-дегенеративными процессами определяется нарушение циркуляции сети кровеносных капилляров в результате спазма артериол.

Подопытным животным с ИН, подтвержденной биохимическими анализами, производили трансплантацию клеточной культуры аллогенной селезеночной ткани (в объеме 1 млн клеток) в виде в/м инъекции в основание хвоста.

В течение трех недель после трансплантации производили биохимическое определение сахара крови в динамике. Все анализы подтвердили постепенное снижение в крови его показателей. Убедившись в том, что идет восстановление функции панкреатических островков, животные были забиты и произведены гистологические исследования. Удалось проследить восстановление гистоструктур β -инсулоцитов в панкреатических островках. Вполне возможно, что инъекция клеточной культуры селезеночной ткани животным с экспериментальным СД обеспечила трансплантацию и стимуляцию стволовых клеток, способствующих образованию β -клеток с восстановлением их функциональ-

ной активности, т. е. выработки гормона инсулина. У подопытных животных в панкреатических островках отчетливо определяется восстановление микроциркуляторного русла эндокринной железы.

2.2.7. Микроскопическое исследование культуры клеток селезеночной ткани

При динамическом микроскопическом наблюдении за культурой клеток селезеночной ткани крыс выявлено, что в культуре (рис. 2.39, см. цв. вклейку), содержащей эмбриональные клетки селезенки, максимально плотный монослой сформировался на 4-е сутки.

В монослое встречались крупные клетки с крупными ядрами (6%). В цитоплазме этих клеток обнаруживалось множество включений (морфологические признаки гемопоэтических стволовых клеток). Интенсивная пролиферация клеток отмечена на 6-й день с увеличением количества клеток в 3,5 раза. Среди монослоя образуются шаровидные скопления клеток с выраженной пролиферацией. В центре «шара» единичные крупные клетки с крупными ядрами и выраженной цитоплазмой (мезенхимальные стволовые клетки). Начиная с 10-х суток из «шаров» отделяются скопления клеток, которые также приобретают шаровидную форму, в них тоже идет интенсивная пролиферация. Такое сосуществование «клона» с микроокружением, выраженная пролиферация клеточной культуры еще раз подтверждают, что в ткани селезенки сосредоточены запасы стволовых клеток (рис. 2.40, см. цв. вклейку).

Во флаконах с клетками селезенки взрослых крыс максимальный монослой образовался на 7-й день (рис. 2.41, см. цв. вклейку). Получен прирост клеток в 1,5 раза. Гемопоэтические стволовые клетки — менее 1%.

Через семь дней клетки монослоя аккуратно снимали при помощи скребка для клеток (SARSTEDT, США) и в разведении 2×10^6 кл/мл в питательной среде (объем 1 мл) использовали для введения в хвостовую вену подопытных крыс.

Покровные стекла, извлеченные из культуральных флаконов, фиксировали в смеси 96% этанола и нейтрального формалина (9:1), окрашивали и исследовали методом иммерсионной микроскопии в гистocyтoлогической лаборатории кафедры гистологии БГМУ.

Другая часть культивированных клеток после снятия в концентрации 2×10^6 кл/мл (в пробах по 3 мл) исследовалась методом проточной цитофлуометрии.

2.2.8. Морфологическое исследование клеток культуры селезеночной ткани

На микрофотографиях определяется фибробластический дифферон, представленный всеми видами клеток. В центре и сверху — ство-

ловые клетки; от них — веретенообразные (вихревые) структуры из клеток дифферона, включающего малодифференцированные клетки с округлым или овальным ядром и небольшим ядрышком, базофильной цитоплазмой, богатой РНК. По периферии преобладают функционально активные (зрелые) фибробласты: ядра светлые, овальные, содержат 1–2 крупных ядрышка, цитоплазма слабо базофильна (рис. 2.42, см. цв. вклейку).

2.2.9. Морфологическое исследование аллогенных трансплантатов зародышевой селезенки

Гистологическое и гистохимическое исследования зоны аллогенной трансплантации зародышевой селезеночной ткани под кожу уха кроликам показали, что в трансплантате отчетливо определяется белая пульпа, окруженная красной пульпой. Лимфатические узелки округлой формы, вокруг них выделяется маргинальная зона в виде тонкого слоя лимфоцитов, ретикулярных клеток и макрофагов на границе красной пульпы. В свою очередь красная пульпа состоит из венозных синусов, заполненных форменными элементами крови, включая многочисленные эритроциты, а также селезеночных тяжей, образованных из форменных элементов крови, включая эритроциты, тромбоциты и лейкоциты. Определяется функциональная активность макрофагов красной пульпы, выполняющих фильтрационную функцию, поглощая поврежденные эритроциты. Данный факт может служить подтверждением того, что трансплантированная селезеночная ткань может выполнять обезвреживающую функцию. Однако нельзя исключить возможность миграции макрофагов из прилегающих тканей донора и поступления продуктов распада гемоглобина из сети сосудов, расположенных вокруг трансплантата. На различном расстоянии от белой и красной пульпы формирующейся селезенки располагаются довольно большого размера скопления лимфоидной ткани, состоящие из лимфоцитов, макрофагов и плазматических клеток. Вероятно, такого рода скопления лимфоидных клеток возникают в результате деления стволовых клеток имплантационной ткани, так как соединительная ткань дермы не проявляет признаков воспаления. Вокруг имплантированной селезеночной ткани соединительная ткань состоит из фибробластов, гистиоцитов и единичных макрофагов и лимфоцитов. В более отдаленных от трансплантата участках деструктивные явления или очаги воспалительного процесса также не выявляются.

Данное исследование показывает, что иммунная система взрослого кролика остается толерантной к трансплантату эмбриональной селезенки, что подтверждается отсутствием реакции иммунокомпетентных клеток взрослого организма, а также сосудистой реакцией вокруг трансплантата. В самом трансплантате селезеночной ткани отмечается

наличие белой и красной пульпы со всеми клеточными элементами, форменных элементов крови и макрофагов, что характеризует высокую функциональную его активность. Небольшие очаги лимфоидной ткани в непосредственной близости от трансплантата образуются, по-видимому, благодаря делению камбиальных клеток трансплантата.

Изучение возможности достижения аллогенного трансплантационного спленоза в эксперименте позволяет заключить, что имеется большая вероятность получения эффективного метода коррекции последствий аспленизма в отдаленном послеоперационном периоде, суть которой заключается в коррекции иммунодефицита клеточными культурами фетальной селезенки (Koulmanda M. et al., 2003). В недалеком будущем, после разрешения проблемы с позиции законодательной базы, данное перспективное направление, возможно, получит широкое применение в клинической практике и может быть использовано в коррекции иммунодефицитных состояний другой этиологии.

2.3. Исследование возможных путей профилактики инсулиновой недостаточности трансплантацией селезеночной ткани в абдоминальной хирургии

2.3.1. Сплениз как вариант коррекции нарушенной функции организма

Публикации в отечественной медицинской литературе, посвященные изучению роли добавочной селезенки и спленоза в абдоминальной хирургии, являются единичными. Поэтому на сегодня недостаточно определено их предназначение с позиции целенаправленного клинического и морфофункционального исследования.

Если придерживаться определения, что добавочная селезенка (splen accessorius) — это разрастание селезеночной ткани вне селезенки, которое является аномалией развития или возникает в результате травматической имплантации клеток паренхимы селезенки на соседние органы, то получается, что она может быть врожденной и приобретенной. Как известно, врожденные добавочные селезенки обнаруживаются у 14–30% больных и выявляются в воротах и связках селезенки, также в большом сальнике (Григорьев Е.Г. с соавт., 2001; Campbell I.L. et al., 1988).

Они обычно имеют небольшие размеры — до 30 мм в диаметре, эхографическую структуру и экзогенность, идентичные нормальной селезенке (Arzoumanian A. et al., 1995; Попов М.В. с соавт., 2001). Эктопичная селезеночная ткань обнаруживается в гистологических препаратах, взятых у больных из различных отделов слизистой желудочно-кишечного тракта во время кровотечения или же при резекции, а также в составе тканей различных органов и систем (Abbas A.K. et al., 1996; Heneine W. et al., 1998;

Kodama S. et al., 2004). Эктопичная селезеночная ткань, получившая развитие после спленэктомии, которая в литературе обозначается как спленоз, представляет собой очаги регенерации селезеночной ткани, диссеминированной во время травмы и кровотечения в брюшную полость, или остаток фрагмента ткани на своем месте как неудаленный участок (Апарцин К.А., 2001; De Backer A.I. et al., 2000). Частота развития спленоза при травмах селезенки колеблется от 67% (Feldman S.D. et al., 1977) в случаях обычной спленэктомии до 80% (Bosi E. et al., 2001; Expert J.J. et al., 2001) в случаях лапароскопической спленэктомии. К этому типу можно отнести спленоз, который достигается путем целенаправленной АСТ в различных ее вариантах, проводимой хирургами с целью профилактики постспленэктомического синдрома (Домрачев С.А. с соавт., 2000; Ионкин Д.А. с соавт., 2000; Тимербулатов В.М. с соавт., 2005; Тимербулатов М.В. с соавт., 2004; Чулкин С.Н., 2000; Шапкин Ю.Г. с соавт., 2000).

Современные представления большинства исследователей о возможностях восстановления иммунологических показателей после спленэктомии с последующей аутотрансплантацией ткани селезенки как в эксперименте, так и в клинике (Усейнов Э.Б. с соавт., 2006; Шапкин Ю.Г. с соавт., 2000) подвергаются сомнению исследованиями ряда ученых, не выявивших существенных различий в результатах иммунологических и лабораторных показателей у больных после спленэктомии и органосохраняющих операций как в раннем, так и в отдаленном послеоперационном периоде (Зубарев П.И. с соавт., 1990; Смольяров А.Н., 2001). Данную противоречивость в иммунологических показателях после операции в разные сроки некоторые исследователи объясняют несколькими факторами: наличием не выявленной интраоперационно добавочной селезенки и развитием спонтанного и резидуального постспленэктомического спленоза (Kovarik J. et al., 1999).

Наличие добавочной селезенки и спленоза, возможно, в ряде случаев приводит к гнойно-септическим осложнениям в виде некроза и абсцедирования, кровотечениям при их травматических повреждениях. По всей видимости, нередко ситуации, когда возникает необходимость проведения дифференциации их от образований брюшной полости высокотехнологичными методами исследования. Но сообщений о наблюдениях из клинической практики и обобщающих исследований по данной теме в отечественной литературе практически нет. Учитывая существующий пробел в данном вопросе, мы проанализировали свой клинический материал.

При обзоре литературы становится понятным, что единого подхода к классификации спленоза нет. Здесь сразу хочется подчеркнуть, что существующее разночтение в определении типа «эктопичная селезенка», «дополнительная селезенка», «добавочная селезенка» и «спленоз» приводит к некой путанице. Во-первых, добавочная селезенка присутствует с самого рождения и не совсем является аномалией, для данного

индивидуума она представляет собой норму. Во-вторых, спленоз развивается после травматических повреждений селезенки; он может определяться как добавочная селезенка в том случае, если она присутствовала у индивидуума в дооперационном периоде и не была удалена вместе с селезенкой. В этой ситуации мы можем говорить об органосохраняющем варианте операции по типу субтотальной резекции селезенки. Различные варианты постспленэктомического спленоза следует рассмотреть как метод протезирования фильтрационной функции органа, а не как способ сохранения органа, приводящего к регенерации клеток селезеночной ткани со способностью к функциональной активности. Исходя из этих соображений, на наш взгляд, добавочную селезенку можно рассматривать как врожденную форму спленоза, что позволит найти общую точку приложения при решении задач данной проблемы. Поэтому мы попытались упорядочить существующие разночтения в определении и обозначениях структурных единиц спленоза.

Вся эта группа, обозначенная нами как спленоз, является нормальной и необходимой организму в функциональном отношении структурной единицей. Как любому органу брюшной полости, ему присущи патологические состояния, приводящие к тяжелым осложнениям

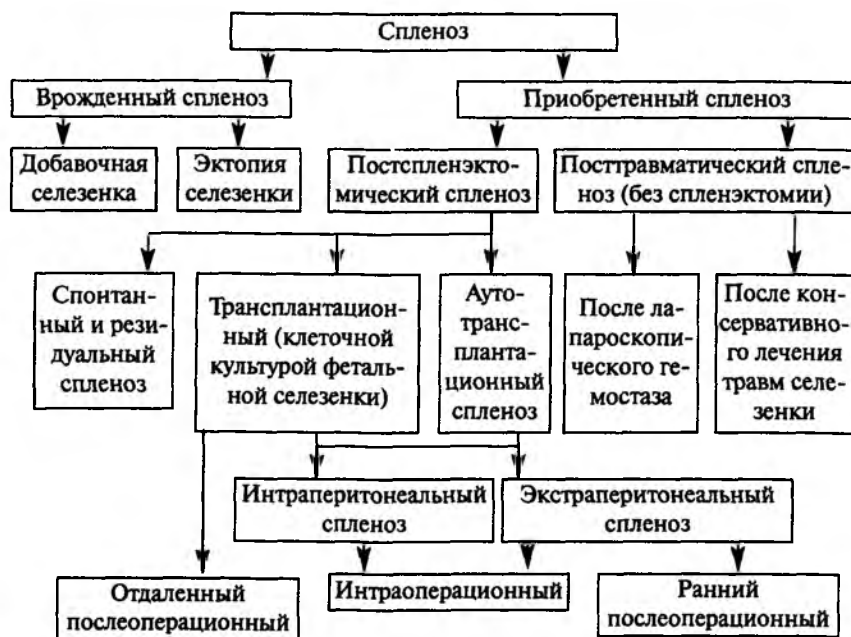


Рис. 2.43. Классификация спленоза

и требующие хирургической коррекции. Поэтому предлагаемая нами классификация, при выявлении спленоза в клинической практике, позволит более адекватно оценить тактику хирургического лечения, а в научном плане — оценить роль различных его вариантов в профилактике приобретенного постспленэктомического иммунодефицита (рис. 2.43), а в случаях панкреатэктомии — профилактике ИН.

Итак, учитывая вышеперечисленное, мы можем следующим образом дать определение понятию «спленоз»: это разрастание селезеночной ткани вне зоны естественной локализации селезенки, которое может быть врожденным в виде добавочной селезенки и эктопии в тканях других органов или же приобретенным, возникающим в результате травмы селезенки и имплантации ее клеток на соседние органы и предназначенным для компенсации функции утраченной селезенки.

2.3.2. Результаты клинического исследования

Клинический материал составили 64 больных, госпитализированных в клинику Больницы скорой медицинской помощи Уфы за период с 1996 по 2006 г. Возраст больных варьировал от 19 до 49 лет, мужчин было 51 (79,7%), женщин — 13 (20,3%) (рис. 2.44).

Клиническое исследование включало изучение анамнеза жизни и заболевания, жалоб больного, механизма получения травмы, общего и локального статуса.

Инструментальные методы исследования включали рентгенологические, эндоскопические и ультразвуковые (УЗИ).

Компьютерная томография (аппарат — рентгеновский компьютерно-томографический сканер для всего тела, модель TCT-500S фирмы Toshiba) проводилась пострадавшим с травмами селезенки при ранней диагностике, а также в послеоперационном периоде при наличии осложнений и для выяснения степени развития спленоза.

УЗИ (аппарат Logiq-400 и Acuson) проводилось нами у всех больных, его разрешающая способность составила более 80%.

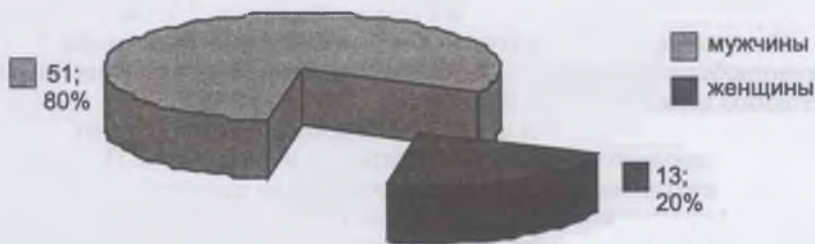


Рис. 2.44. Распределение клинического материала по полу



Рис. 2.45. Распределение клинического материала по причинам развития спленоза и методам диагностики

Целенаправленное ультразвуковое исследование по выявлению спленоза выполнено 48 (75,0%) больным, у которых в анамнезе имела травма селезенки и была выполнена спленэктомия, из них в 34 (70,8%) случаях она была дополнена АСТ в большой сальник, а в 14 (29,2%) случаях не проводилась. Сроки наблюдения после операции составили от 2 до 10 лет. Наличие добавочной селезенки выявляли случайно во время лечебно-диагностических мероприятий у 16 хирургических больных. Из них в четырех случаях она выявлена во время лапароскопии, выполненной по поводу абдоминальной травмы и при диагностике острого аппендицита, в шести — во время лапаротомии и ревизии органов брюшной полости, в шести — при ультразвуковом исследовании органов брюшной полости, у четырех больных с целью дифференциальной диагностики дополнительно потребовалась компьютерная и ядерно-магнитная резонансная томография (табл. 2.5, рис. 2.45).

Иммунологический статус больных оценивали по содержанию иммуноглобулинов классов G, A, M, T-лимфоцитов и B-лимфоцитов, состоянию лейкоцитарной формулы.

Биопсийный материал из удаленной добавочной селезенки получили в виде продолговатых кусочков размерами 0,3 x 0,3 мм. После фиксации в нейтральном формалине и промывания проточной водой в течение 24 часов изготавливались срезы толщиной 50 мкм в криостате при температуре 25°C. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. После соответствующей гистологической проверки всего изготовлено 70 микропрепаратов.

Таблица 2.5.

**Распределение клинического материала по причинам развития спленоза
и методам диагностики**

№ п/п	Форма спленоза Метод диагностики и вид операции	Ауто- транс- планта- ционный спленоз	Посттрав- матичес- кий спон- танный спленоз	Врож- денная добавоч- ная се- лезенка	Эктопия селезе- ночной ткани	Все- го
1	Лапаротомия:	34	14	-	-	48
	А) Спленэктомия без АСТ	-	14	-	-	14
	Б) Спленэктомия с АСТ	31	-	-	-	31
	В) Дуоденопанкре- ат-эктомия с АСТ	3	-	-	-	3
	Г) Аппендэктомия	-	-	1	-	1
	Д) Неотложные за- болевания брюш- ной полости	-	-	6	-	6
2	Лапароскопия	-	-	4	-	4
3	УЗИ	26	14	6	-	46
4	Компьютерная то- мография	-	-	4	-	4
	Всего	34	14	16	-	64

Эндоскопические исследования заключались в проведении диагностической лапароскопии и фиброэзофагогастродуоденоскопии (ФЭГДС). При помощи эндоскопических методов исследований определяли наличие повреждений органов и их осложнений, а также в послеоперационном периоде изучали результаты лечения.

ФЭГДС проводили при ранениях и разрывах органов панкреатодуоденальной зоны как в дооперационном периоде, так и интраоперационно для исключения повреждений желудка и ДПК.

Исследование показателей глюкозы крови и мочи проводилось в лаборатории Больницы скорой медицинской помощи по общепринятой методике.

Математическая обработка показателей проведенных исследований включала расчет средних величин (M), определение среднеквадратичного отклонения (δ) и средней ошибки (m). Вычислялся критерий до-

стochasticности Стюдента (t) и определялся доверительный интервал для значения исследуемых показателей ($M \pm tm$).

Необходимо отметить, что случайное выявление врожденного спленоза в клинической практике, во время лечебно-диагностических мероприятий и при отсутствии патологии должно ограничиться констатацией факта и больной об этом должен быть извещен (рис. 2.46, см. цв. вклейку). Удаление добавочной селезенки может быть оправданно только в гематологической практике, при выполнении лечебной спленэктомии. Также по отношению к приобретенному спленозу должна соблюдаться органосберегательная тактика. Но, в отличие от врожденной формы, мы здесь можем предварительно предположить о наличии постспленэктомического спонтанного и аутотрансплантационного спленозов, предназначенных для профилактики аспленизма, и подтвердить это неинвазивными и мини-инвазивными методами исследования. Роль посттравматических спленозов при органосберегательной тактике в хирургии селезенки сводится, скорее всего, к профилактике и коррекции гипоспленизма.

Для определения состояния иммунной системы у больных мы проводили исследования в случаях применения спленэктомии у пострадавших без АСТ и после ее применения сравнительно здоровой группе (контрольная группа). Полученные нами данные лейкоцитарной формулы у пострадавших с травматическими повреждениями селезенки, которым проводились спленэктомии без АСТ и органозаместительные операции, при сравнительном анализе общего количества лейкоцитов, процентного и абсолютного содержания нейтрофилов не позволили отметить достоверных изменений в обеих группах, по сравнению с показателями контрольной группы.

У больных после спленэктомии со спонтанным спленозом увеличивалось процентное и абсолютное содержание лимфоцитов ($p < 0,001$), процентное содержание эозинофилов ($p < 0,01$), а в группе больных после заместительных операций эти показатели достоверно от нормы не отличались. В обеих группах установлено процентное снижение моноцитов ($p < 0,01$), хотя их абсолютное значение в группе больных с органозамещающими операциями достоверно от контрольной группы тоже не отличалось.

При сравнительном анализе формулы белой крови между данными группами больных достоверных изменений не отмечено, за исключением лишь процентного содержания нейтрофилов, количество которых в группе спленэктомизированных больных было достоверно ниже.

Таким образом, прослеженные изменения в лейкоцитарной формуле характерны для оперативного вмешательства на селезенке и незначительно выражены у больных после спленэктомии с установленным спонтанным спленозом. АСТ приводит к несущественным сдвигам лейкоцитарной формулы, что свидетельствует об удовлетворительном состоянии системы иммунитета после данных операций.

Больным также проводились исследования гематологических показателей, при этом выявлено, что анемия у больных после АСТ носит временный характер, удаление же органа способствует развитию стойкой анемии. Увеличение ретикулоцитов после АСТ носило временный характер с нормализацией на 7-й неделе, при этом нормализация у больных со спленэктомией не наступала. Высокие показатели тромбоцитоза сохранялись у спленэктомизированных больных в течение всего периода исследований, у больных после АСТ с 7-й недели после операции отмечалась четкая тенденция к снижению тромбоцитов с нормализацией к 9-й неделе (табл. 2.6).

Таблица 2.6

Лейкоцитарная формула у больных со спленозом

Изучаемые показатели	Контрольная группа (n = 20)	После спленэктомии (спонтанный спленоз) (n = 14)	Спленоз после аутотрансплантации (n = 34)
Общее количество лейкоцитов	$6,35 \times 10^9 \pm 0,09$	$6,58 \times 10^9 \pm 0,23$ $p > 0,25$	$6,34 \times 10^9 \pm 0,18$ $p > 0,25$
Нейтрофилы, %	$58,4 \times 10^9 \pm 6,4$	$50,4 \times 10^9 \pm 1,1$ $p > 0,25$	$53,6 \times 10^9 \pm 1,2$ $p > 0,5$
Нейтрофилы, абс. $\times 10^9/\text{мкл}$	$3,64 \times 10^9 \pm 0,2$	$3,2 \times 10^9 \pm 0,1$ $p > 0,5$	$3,24 \times 10^9 \pm 0,12$ $p > 0,5$
Лимфоциты, %	$31,32 \times 10^9 \pm 1,12$	$38,8 \times 10^9 \pm 1,9$ $p < 0,001$	$35,8 \times 10^9 \pm 2,3$ $p > 0,1$
Лимфоциты, абс. $\times 10^9/\text{мкл}$	$2,1 \times 10^9 \pm 0,09$	$2,54 \times 10^9 \pm 0,21$ $p < 0,001$	$2,28 \times 10^9 \pm 0,27$ $p < 0,001$
Моноциты, %	$9,4 \times 10^9 \pm 0,4$	$7,64 \times 10^9 \pm 0,67$ $p < 0,01$	$7,3 \times 10^9 \pm 0,41$ $p < 0,01$
Моноциты, абс. $\times 10^9/\text{мкл}$	$0,57 \times 10^9 \pm 0,04$	$0,47 \times 10^9 \pm 0,02$ $p < 0,05$	$0,49 \times 10^9 \pm 0,21$ $p > 0,5$
Эозинофилы, %	$0,88 \times 10^9 \pm 0,32$	$2,31 \times 10^9 \pm 0,16$ $p < 0,01$	$2,27 \times 10^9 \pm 0,32$ $p > 0,25$
Эозинофилы, абс. $\times 10^9/\text{мкл}$	$0,017 \times 10^9 \pm 0,003$	$0,15 \times 10^9 \pm 0,02$ $p > 0,5$	$0,14 \times 10^9 \pm 0,15$ $p > 0,5$

Примечание:

p — достоверность различий с контрольной группой;

p* — достоверность различий между группами.

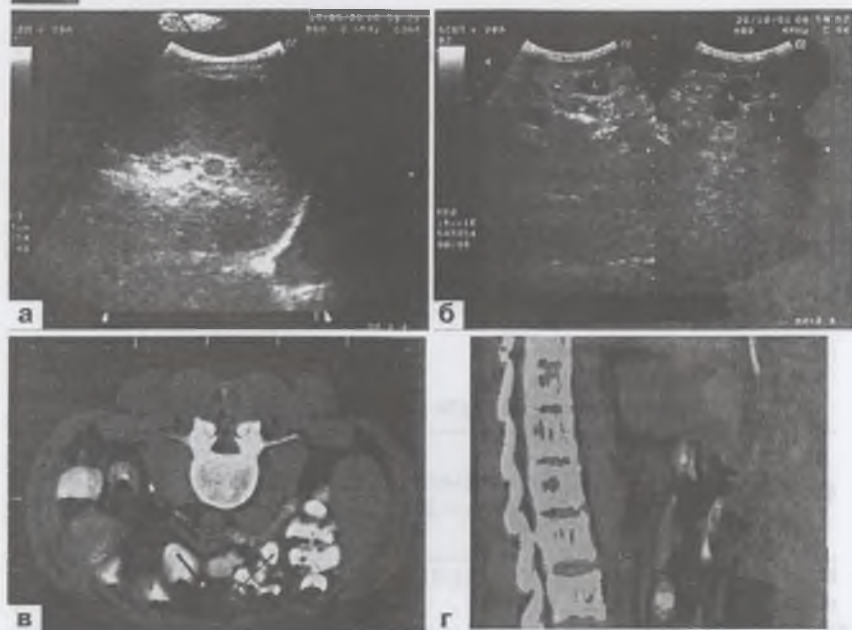


Рис. 2.47. а — УЗИ-диагностика добавочной селезенки; б — УЗИ-диагностика ауто-трансплантационного спленоза брюшной полости; в — КТ-диагностика ауто-трансплантационного спленоза; г — КТ-диагностика ауто-трансплантационного спленоза

Проведенное клиническое исследование гематологических показателей и состояния системы иммунитета после спленэктомии с АСТ и без ее использования убедительно свидетельствует в пользу замещающих оперативных пособий, позволяющих избежать спленэктомических иммунодефицитных состояний.

Также исследование показало, что спонтанный спленоз со временем становится компенсаторным механизмом в коррекции аспленизма, хотя его значение в этом менее выражено по сравнению с ауто-трансплантационным вариантом спленоза.

Иммунологическое исследование показало, что у 34 больных после спленэктомии с АСТ отсутствовал постспленэктомический иммунодефицит, что еще раз доказывает об эффективности данного метода. При ультрасонографическом исследовании в брюшной полости выявлялись очаги спленоза (рис. 2.47). Отсутствие постспленэктомического синдрома наблюдалось у четырех (28,6%) больных, которым АСТ не производилась. При ультразвуковом исследовании брюшной полости у трех больных выявлены разнокалиберные очаги спленоза в области ложа селезенки, у одного — по большой кривизне желудка, у четырех больных наличие спленоза подтверждено при помощи КТ (рис. 2.47 в, г).

У остальных 10 (71,4%) больных иммунологические исследования подтвердили наличие иммунодефицита, а при ультразвуковом исследовании брюшной полости спленоз не был выявлен. Таким образом, утверждение некоторых авторов о том, что спленэктомия редко сопровождается иммунодефицитом, инфекционными и тромбоэмболическими осложнениями объясняется послеоперационным спленозом и компенсацией функции удаленной селезенки.

В двух случаях резидуальная ткань селезенки в области большой кривизны желудка размерами 2,0 x 3,0 и 3,0 x 4,0 см соответственно была ошибочно расценена как опухолевидное образование брюшной полости и удалена. Удаление резидуальной ткани селезенки у данных больных связано с отсутствием у хирургов информации относительно возможности наличия оставленной ткани селезенки после спленэктомии у ворот органа и ее регенерации. Данная тактическая ошибка, конечно же, приведет к постспленэктомическому синдрому, при отсутствии резидуальной ткани в других областях брюшной полости.

У одного больного при выполнении аппендэктомии выявлены заворот пряди большого сальника и в составе некротизированной пряди опухолевидное образование размерами 1,5 x 1,5 см. В гистологическом заключении подтвердился некроз добавочной селезенки. В этом случае нельзя исключить, что пусковым механизмом заворота оказалась добавочная селезенка.

В другом случае при выполнении лапароскопической диагностики по поводу открытой абдоминальной травмы добавочная селезенка размерами 1,5 x 2,0 см была повреждена и явилась источником активного кровотечения. Удаление добавочной селезенки привело к стойкому гемостазу, других повреждений органов брюшной полости не было выявлено. Удаленная добавочная селезенка послужила материалом для морфологического исследования.

У трех больных при выполнении тотальной дуоденопанкреатэктомии была использована методика АСТ в круглую связку печени. Если в одном случае имела место травма ПЖ и ДПК, то в двух случаях дуоденопанкреатэктомия была выполнена в плановом порядке у больных с хроническим диффузным туморозным панкреатитом. В послеоперационном периоде коррекция ИН проводилась в первые две недели, после отмены заместительной инсулинотерапии у всех больных показатели сахара крови оставались невысокими, т. е. приблизились к нормальным.

2.3.3. Морфологическое исследование добавочной селезенки

Гистологическое исследование удаленной добавочной селезенки показало, что в микропрепарате отчетливо определяются все структурные образования селезенки. Визуально определялись соединительноткан-

ная капсула, ворота селезенки с артерией и веной. Селезенка покрыта капсулой из плотной соединительной ткани (рис. 2.48, см. цв. вклейку).

От капсулы вглубь отходят трабекулы (рис. 2.49, см. цв. вклейку), формируют остов селезенки, разделяющий ее на отдельные участки. На одном участке капсула заворачивается внутрь, как бы продолжаясь в трабекулы, и в этом месте в селезенку вступают кровеносные сосуды — разветвления артерии и вен, вступающих в ворота селезенки, затем проходят по трабекулам (рис. 2.50, см. цв. вклейку).

Как капсула, так и трабекулы образованы плотной волокнистой соединительной тканью, содержащей многочисленные коллагеновые и эластические волокна, а также фиброцитами. Между трабекулами располагается пульпа селезенки. Красная пульпа имеет темно-красный оттенок и заполнена клетками крови, среди которых преобладают эритроциты. Красная пульпа занимает основную часть селезенки. В ней в виде вкраплений определяются островки округлой формы — это скопление лимфоцитов белой пульпы (рис. 2.51, см. цв. вклейку).

Белая пульпа образована из лимфатических узелков, периартериальных лимфатических влагалищ и маргинальной зоны. В каждом лимфоидном узелке определяется центральная артерия, лежащая несколько эпицентрично (рис. 2.52, см. цв. вклейку).

Разветвления артерий, вступающих в ворота селезенки, проходят по трабекулам, затем вступают в красную пульпу, далее оказываются в белой пульпе (центральная артерия). При выходе из белой пульпы формируются кисточковые артериолы, распадающиеся на венозные синусы.

Красная пульпа образована венозными синусами (рис. 2.53, см. цв. вклейку), выстланными эндотелиальными кисточками с щелевидными промежутками между ними, а также селезеночными тяжами, состоящими из макрофагов, плазматических клеток и эритроцитов.

Как в красной, так и в белой пульпе определяются ретикулярные кисточки (*penicilli*), макрофаги, антиген-представляющие интердигирующие кисточки, лимфоциты (Т- и В-клетки), а также отмечается разрушение старых и поврежденных эритроцитов и тромбоцитов, фагоцитоз инородных частиц.

Как показало гистологическое исследование, добавочная селезенка имеет все структурные части основной селезенки и проявляет все ее функции: наряду с кроветворением происходит развитие лимфоцитов, участвует в формировании гуморального и клеточного иммунитета, разрушении старых и поврежденных эритроцитов и тромбоцитов, а также депонировании крови.

Таким образом, в клинической практике спленоз может явиться причиной абдоминальной хирургической патологии, подлежащей экстренной операции. Основными методами выявления спленоза являются ультразвуковое исследование и лапароскопия, при дифференциальной диагностике с опухолями брюшной полости возникает необходи-

мость дополнить их компьютерной и ядерно-магнитной резонансной томографией. У трети больных постспленэктомический спленоз развивается спонтанно, без аутотрансплантации ткани селезенки и приводит к профилактике иммунодефицита, что в конечном счете может исказить результаты исследований в области органозаместительной хирургии селезенки. Исследование морфофункционального состояния добавочной селезенки подтверждает, что она имеет все структурные части основной селезенки и проявляет все ее функции. Представляется, что проработанный в эксперименте трансплантационный вариант спленоза, достигаемый путем аллогенной трансплантации фетальной селезеночной ткани, может найти применение в клинической практике для коррекции приобретенных иммунодефицитных состояний.

2.3.4. Способ профилактики инсулиновой недостаточности в абдоминальной хирургии

Способ АСТ применен нами у трех больных, в одном случае при тяжелом сочетанном повреждении ДПК и ПЖ, а также в двух случаях при хроническом диффузном панкреатите, что предполагало тотальное удаление ДПК и ПЖ с селезенкой.

Способ профилактики ИН (Патент №2272582 от 27.03.2006 г.) осуществляется следующим образом: больному проводят верхнесрединную лапаротомию под общим обезболиванием. После ревизии органов брюшной полости производится пересечение печеночно-ободочной и желудочно-сбодочной связок вплоть до верхнего полюса селезенки с порционной перевязкой сосудов и коротких артерий желудка. Мобилизация ДПК производится по Kocher. Для этого сверху вниз на протяжении 6–10 см, отступя вправо от нисходящей части ДПК примерно на 1 см, рассекается задний листок париетальной брюшины. Тупфером, зажатым в инструмент, проводится сдвигание подковообразного изгиба ДПК вместе с головкой ПЖ на несколько сантиметров влево и вверх, т. е. до правого края верхней брыжеечной вены. Далее проводится отделение острым путем брыжейки поперечно-ободочной кишки от ПЖ. Перевязки сосудов здесь не требуется. Затем селезенка оттягивается вправо и вниз и остро разделяется ее верхний полюс от фиксирующей диафрагмо-селезеночной связки с перевязкой сосудов. Также рассекается селезеночно-ободочная связка, поддерживающая нижний полюс селезенки, перевязываются ее сосуды. Продолжая оттягивать селезенку вправо и вниз, рассекается брюшина там, где она переходит с заднего края селезенки на переднюю поверхность левой почки. После этого селезенка приподнимается из ложа вместе с хвостом ПЖ, что позволяет выполнить мобилизацию тела ПЖ до ее шейки тупым способом. Определяется граница тела и антрального отдела желудка и производится его двухкратное прошивание на уровне данной

границы аппаратом УКЛ-40, после чего пересекается желудок между прошитыми линиями. Производятся пересечение и перевязка правой желудочной и правой желудочно-сальниковой артерий. Накладываются серо-серозные узловые швы на культю желудка капроном №3. Отступя на 10 см от связки Трейтца, двукратно прошивается тощая кишка аппаратом УКЛ-40 и пересекается между прошитыми линиями. Отводящая культя тощей кишки погружается с использованием полукисетных швов. Пересекаются и перевязываются сосуды, проходящие в брыжейке верхней культи тощей кишки. Пересекается и перевязывается нижняя поджелудочно-двенадцатиперстная артерия. Затем указательным пальцем производится формирование туннеля между передней поверхностью дистального отдела ДПК и задней поверхностью верхней брыжеечной артерии и вены и протягивание через него мобилизованной петли тощей кишки (верхней). Под верхним краем ПЖ, у места отхождения от желудочно-двенадцатиперстной артерии рассекается и перевязывается верхняя поджелудочно-двенадцатиперстная артерия. Над верхним краем ПЖ лигируется селезеночная артерия, перевязывается и рассекается между лигатурами. На задней поверхности ПЖ лигируется, перевязывается и рассекается между лигатурами селезеночная вена. Над ДПК рассекается и перевязывается общий желчный проток. Попеременно приподнимая головку ПЖ справа, тело и хвост слева в вентральном направлении, остро и тупо, препарируя и лигируя мелкие артерии и вены, которые соединяют железу с магистральными сосудами, производится удаление комплекса, состоящего из ПЖ, селезенки, антральной части желудка, ДПК, отрезка тощей кишки и дистальной части общего желчного протока. Из данного комплекса выделяется селезенка. В целях предимплантационной подготовки производится ее декапсуляция, фрагментация 1/3 органа на кусочки размерами 3,0 x 3,0 x 1,0 см и погружение данных фрагментов в стерильный сосуд с асептическим раствором (фурацилин) и с добавлением антибиотиков (4 г канамицина). После этого следует реконструктивный этап операции. Культя тощей кишки противобрыжеечной поверхностью подводится к желчному пузырю и производится наложение латеро-латерального холецистоюноанастомоза, двухрядно, узловыми швами, капроном №3. Отступя на 15–20 см от холецистоюноанастомоза, петля тощей кишки противобрыжеечной поверхностью подводится к культе желудка и фиксируется к ней узловыми серо-серозными швами. Ближе к большой кривизне накладывается передний термино-латеральный гастроеюноанастомоз, двухрядно, узловыми швами, капроном №3. Производятся контроль на гемостаз, осушение и дренирование пространств брюшной полости. Фрагменты селезеночной ткани извлекаются из сосуда, производится их дополнительное промывание в стерильном растворе. На всем протяжении рассекается круглая связка печени, формируется «футляр» для импланта-

ции. После этого часть имплантируемых фрагментов селезеночной ткани распределяется в сформированном «футляре» круглой связки печени и при помощи непрерывного кетгутового шва восстанавливается целостность круглой связки печени, при этом на всем протяжении связки устанавливается дренажная трубка из-под системы с множественными боковыми отверстиями. Далее восстанавливается целостность брюшины передней брюшной стенки при помощи непрерывного кетгутового шва. Другая часть фрагментов селезеночной ткани распределяется по предбрюшинной клетчатке, после чего накладываются узловые швы капроном №5 на апоневроз прямой мышцы живота. Также в предбрюшинной клетчатке оставляется дренажная трубка из-под системы с боковыми отверстиями. Дренажные трубки круглой связки печени и предбрюшинного пространства выводятся через дополнительный прокол кожи передней брюшной стенки. Накладываются послойные швы на подкожную клетчатку и кожу. В раннем послеоперационном периоде 2–3 раза в сутки в дренажные трубки вводятся антибактериальные (канамицин) и антиоксидантные (раствор диоксида) препараты. Также в послеоперационном периоде проводится весь комплекс лечебных мероприятий, направленных на профилактику и коррекцию нарушений функции жизненно важных органов. Коррекция ИН в первые 10–12 суток проводится путем введения соответствующей показателям сахара крови дозы инсулина (до 40 ЕД в сутки). К 10–12-м суткам при отмене введения инсулина показатели сахара крови остаются в норме (5,0–7,0 ммоль/л), и впоследствии коррекция сахара не проводится.

Клинический пример. Больной Н., 46 лет, поступил в Больницу скорой медицинской помощи Уфы с клиникой закрытой травмы живота, через 16 часов после получения травмы. Жалуется на сильные боли в животе, сухость во рту, тошноту, рвоту, резкую слабость. Произведены ультразвуковое исследование брюшной полости и диагностическая лапароскопия под общим обезболиванием, при которых выявлены наличие крови в брюшной полости до 300 мл и забрюшинная гематома. Произведена верхнесрединная лапаротомия, при которой выявлен разрыв забрюшинной части ДПК, ПЖ с явлениями забрюшинной гематомы и флегмоны и жирового травматического панкреатита. В брюшной полости около 300 мл серозно-геморрагического выпота со сгустками, который эвакуировали. После ревизии органов брюшной полости произведено пересечение печеночно-ободочной и желудочно-ободочной связок вплоть до верхнего полюса селезенки с порционной перевязкой сосудов и коротких артерий желудка. Мобилизация ДПК произведена по Kocher. Для этого сверху вниз на протяжении 6–10 см, отступя вправо от нисходящей части ДПК примерно на 1 см, рассечен задний листок париетальной брюшины. Тупфером, зажатым в инструмент, проведено сдвигание подковобразного изгиба ДПК вместе с головкой ПЖ на не-

сколько сантиметров влево и вверх, т. е. до правого края верхней брыжеечной вены. Далее проведено отделение острым путем брыжейки поперечно-ободочной кишки от ПЖ. Затем селезенка оттянута вправо и вниз и остро разделен ее верхний полюс от фиксирующей диафрагмо-селезеночной связки с перевязкой сосудов. Также рассечена селезеночно-ободочная связка, поддерживающая нижний полюс селезенки, перевязаны ее сосуды. Продолжая оттягивать селезенку вправо и вниз, рассечена брюшина там, где она переходит с заднего края селезенки на переднюю поверхность левой почки. После этого селезенка приподнята из ложа вместе с хвостом ПЖ, что позволило выполнить мобилизацию тела ПЖ до ее шейки тупым способом. Определена граница тела и антрального отдела желудка и произведено его двукратное прошивание на уровне данной границы аппаратом УКЛ-40, после чего пересечен желудок между прошитыми линиями. Произведены пересечение и перевязка правой желудочной и правой желудочно-сальниковой артерий. Наложены серо-серозные узловые швы на культю желудка капроном №3. Отступая на 10 см от связки Трейтца, двукратно прошита тощая кишка аппаратом УКЛ-40 и пересечена между прошитыми линиями. Отводящая культя тощей кишки погружена с использованием полукисетных швов. Пересечены и перевязаны сосуды, проходящие в брыжейке верхней культи тощей кишки. Пересечена и перевязана нижняя поджелудочно-двенадцатиперстная артерия. Затем указательным пальцем произведено формирование туннеля между передней поверхностью дистального отдела ДПК и задней поверхностью верхней брыжеечной артерии и вены и протягивание через него мобилизованной петли тощей кишки (верхней). Под верхним краем ПЖ, у места отхождения от желудочно-двенадцатиперстной артерии рассечена и перевязана верхняя поджелудочно-двенадцатиперстная артерия. Над верхним краем ПЖ лигирована селезеночная артерия, перевязана и рассечена между лигатурами. На задней поверхности ПЖ лигирована, перевязана и рассечена между лигатурами селезеночная вена. Над ДПК рассечен и перевязан общий желчный проток. Попеременно приподнимая головку ПЖ справа, тело и хвост слева в вентральном направлении, остро и тупо, препарируя и лигируя мелкие артерии и вены, которые соединяют железу с магистральными сосудами, произведено удаление комплекса, состоящего из ПЖ, селезенки, антральной части желудка, ДПК, отрезка тощей кишки и дистальной части общего желчного протока. Из данного комплекса выделена селезенка. В целях предимплантационной подготовки произведены ее декапсуляция, фрагментация 1/3 органа на кусочки размерами 3,0 x 3,0 x 1,0 см и погружение данных фрагментов в стерильный сосуд с асептическим раствором (фурацилин) и с добавлением антибиотиков (4 г канамицина). После этого произведен реконструктивный этап операции. Культя тощей кишки противобрыжеечной поверхностью подведена к желчному пузырю и произведено наложение латеро-ла-

терального холецистоеюноанастомоза, двухрядно, узловыми швами, капроном №3. Отступя на 15–20 см от холецистоеюноанастомоза, петля тощей кишки противобрыжеечной поверхностью подведена к культе желудка и фиксирована к ней узловыми серо-серозными швами. Ближе к большой кривизне наложен передний термино-латеральный гастро-еюноанастомоз, двухрядно, узловыми швами, капроном №3. Произведен контроль на гемостаз, осушены и дренированы пространства брюшной полости. Фрагменты селезеночной ткани извлечены из сосуда, произведено их дополнительное промывание в стерильном растворе. На всем протяжении рассечена круглая связка печени, сформирован «футляр» для имплантации. После этого часть имплантируемых фрагментов селезеночной ткани распределена в сформированном «футляре» круглой связки печени и при помощи непрерывного кетгутового шва восстановлена целостность круглой связки печени, при этом на всем протяжении связки установлена дренажная трубка из-под системы с множественными боковыми отверстиями. Далее восстановлена целостность брюшины передней брюшной стенки при помощи непрерывного кетгутового шва. Другая часть фрагментов селезеночной ткани распределена по предбрюшинной клетчатке, после чего наложены узловые швы капроном №5 на апоневроз прямой мышцы живота. Также в предбрюшинной клетчатке оставлена дренажная трубка из-под системы с боковыми отверстиями. Дренажные трубки круглой связки печени и предбрюшинного пространства выведены через дополнительный прокол кожи передней брюшной стенки. Наложены послойные швы на подкожную клетчатку и кожу. В послеоперационном периоде 2–3 раза в сутки в дренажные трубки производилось введение антибактериальных (канамицин) и антиоксидантных (раствор диоксилина) препаратов. В послеоперационном периоде проводился весь комплекс лечебных мероприятий, направленных на профилактику и коррекцию нарушений функции жизненно важных органов. Коррекция ИН проводилась путем введения до 40 ЕД инсулина в сутки. К 12-му дню при отмене введения инсулина показатели сахара крови оставались в норме (5,0–7,0 ммоль/л), и впоследствии коррекция сахара не проводилась. Больной осмотрен через 48 месяцев, состояние удовлетворительное, биохимические анализы крови, в том числе глюкоза крови, в пределах нормы.

Таким образом, клинико-экспериментальное исследование позволило заключить:

1. Экспериментальная аллоксановая и панкреатэктомическая инсулиновая недостаточность в настоящее время является наиболее удобной моделью сахарного диабета человека и продолжает сохранять значение в научных исследованиях.
2. Тотальная дуоденопанкреатэктомия у лабораторных животных во всех случаях приводит к летальному исходу. Поэтому при мо-

делировании экспериментальной панкреатэктомической абсолютной инсулиновой недостаточности хронический опыт у крыс можно получить путем удаления левой доли поджелудочной железы хирургическим способом, а правой доли — путем радиохирургической деструкции с использованием аппарата Surgitron. Данный способ наиболее удобен для изучения патогенеза и результатов лечения инсулиновой недостаточности в хирургической панкреатологии.

3. *Использование способа аутотрансплантации селезеночной ткани при выполнении панкреатэктомии позволяет провести профилактику инсулиновой недостаточности у большинства экспериментальных животных, что дает основание предположить возможность получения подобного эффекта при применении в клинической практике.*
4. *Использование трансплантации аллогенных клеточных культур фетальной и «взрослой» селезеночной ткани при аллоксановой инсулиновой недостаточности позволяет достичь ее коррекции у большинства экспериментальных животных.*
5. *Морфологическое, цитофлюорометрическое и микроскопическое исследования трансплантируемых аллогенных спленцитов после длительного культивирования, а также аутологичных фрагментов селезенки, реимплантированных в брюшную полость, показали, что в их составе идентифицируются гемопоэтические и стромальные стволовые клетки, которые участвуют в восстановлении инсулинотропных клеток в организме экспериментального лабораторного животного.*
6. *У больных с тяжелой травмой поджелудочной железы и хроническим псевдотуморозным панкреатитом, которым проводится тотальная дуоденопанкреатэктомия, использование аутотрансплантации селезеночной ткани должно быть обязательным пособием, позволяющим предупредить развитие постспленэктомического синдрома и инсулиновой недостаточности.*
7. *В клинической практике спленоз в 25% случаев является врожденным, после спленэктомии в 53,2% случаев он достигается ауто-трансплантацией селезеночной ткани, в 21,8% развивается спонтанно и выступает компенсаторным механизмом при нарушенных функциях организма.*

Глава 3.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ГЕПАТИТОВ И ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

(клинико-экспериментальное исследование)

3.1. Клеточная терапия хронических гепатитов и цирроза печени в эксперименте

В настоящее время трансплантация клеток превратилась в новый способ изучения раннего эмбрио- и органогенеза, возникновения и судьбы специализированных клонов в эмбриональных и фетальных тканях, анализа взаимодействия клеток в развитии. Пересадки специализированных соматических клеток используются с целью генной терапии или заместительной клеточной терапии в случае фатальных иммунодефицитов, наследственных дефектов клеточного метаболизма, а также острой функциональной недостаточности органов (Grisham J.W., 1962; Robenek H. et al., 1979).

Практически вся пренатальная медицина построена на манипуляциях с клетками и макромасштабной молекулярной диагностике. Специализированные клетки крыс, человека и обезьяны стабильно выживают и функционируют в организме иммунодефицитных мышей (Вакулин Г.М. с соавт., 1978, 1993; Волкова О.В. с соавт., 1982; Кудрявцев Б.Н. с соавт., 1993; Сакута Г.А. с соавт., 1996; Hashimoto M. et al., 1998; Kaibori M. et al., 1997).

Ряд технологий используется в клиниках США и Европы для лечения острой печеночной недостаточности и цирроза печени, наследственных дефектов метаболизма печени, системных врожденных иммунодефицитов, нарушений гемопоэза, у пациентов с мышечной дистрофией и дегенеративными заболеваниями нервной ткани, репродуктивной системы, костной, хрящевой и покровных тканей, глаза, уха и других органов чувств. На базе фетального материала создаются биопродукты, биоматериалы для заместительной клеточной терапии, установки для регенерации, а также искусственные органы для кратко- и долгосрочного использования. Например, подключение на 5–7 дней установки «искусственная печень» для лечения пациентов с недостаточностью функции печени стоит порядка 250 тыс. долларов. Примерно в ту же сумму обходятся пересадки миобластов у пациентов с мышечной дистрофией и стволовых клеток у детей с лейкемией.

Наконец, не последнюю роль играет меньшая себестоимость клеточных трансплантаций по сравнению с пересадкой целого органа. Стоимость операции трансплантации печени в США и Европе колеблется в пределах 250–350 тыс. долларов (Сухих Г.Т., 1998).

Все чаще вместо свежей фетальной ткани стали использовать биоматериал в виде стандартизированных линий соматических клеток человека с улучшенными биологическими и пролиферативными характеристиками. Источником стандартизированного биоматериала стали клеточные банки. Биотехнологические компании и банки клеток занимаются клеточной инженерией и конструированием искусственных органов. Клетки человека в современной медицине являются не только важнейшей моделью, но и эффективным средством изучения и лечения заболеваний человека.

Лечение сводится к пересадке региональных стволовых клеток (РСК) и формированию устойчивых ростков здоровой донорской ткани. В генной терапии чаще всего используют РСК, трансфицированные соответствующими дефицитными генами (Kitamura T. et al., 1998; Krebs W. et al., 1990).

Если в 1990 г. в 143 центрах Европы проведено 4234 трансплантации гематогенных стволовых клеток, то в 1994 г. — 10 066 аналогичных трансплантаций в 306 научных центрах, расположенных в 30 странах. За четыре года количество пересадок алло/аутогенной ткани значительно возросло. В середине 1990-х гг. число трансплантаций гематогенных стволовых клеток в 12 ведущих странах Европы достигло 16–17 операций на 1 млн человек (Hamazaki K. et al., 1994).

Изучение терапевтических возможностей фетальных клеток привело к открытию новых генов, контролирующих органогенез и образование РСК. С помощью рекомбинационного выключения и вставок генов в развивающийся зародыш удалось получить новый пласт информации о путях и механизмах сборки клеток в органы.

Применение фетотерапии во многих ситуациях одновременно обогатит фундаментальные исследования в этой области, что двояко отрицательно влияет на судьбу всего направления (Marchenisi G. et al., 1982).

Известно, что в США и Европе только 15–25% пациентов получают адекватное лечение в виде пересадки гистосовместимого органа. Потребности современной медицины только в донорской печени составляют 10 органов в год на 1 млн человек. Не более двух из 10 пациентов доживают до спасительной операции, остальные погибают без радикального лечения. С каждым годом количество больных, нуждающихся по жизненным показаниям в трансплантации печени, почки или сердца, увеличивается во всех странах одновременно с заметным демографическим старением населения планеты, увеличением хронических вирусных и экологических заболеваний. Вследствие этого трансплантация соматических клеток рассматривается в качестве главной альтернативы пересадке органа. Например, пересадка гепатоцитов или 3–6-дневное подключение пациентов с острой печеночной недостаточностью к «колонке» с искусственной печенью дает время для поиска подходящего донорского органа. В недалеком будущем такие «ко-

лонки» смогут обеспечить выживание пациентов в острой фазе болезни и вернуть их к нормальной жизни (Сухих Г.Т., 1998).

Наиболее часто эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) используются для получения РСК: нейрональных прогениторных клеток, кардиомиобластов, миобластов скелетных мышц, мезенхимальных стволовых клеток, бластных линий энтодермальных органов. Многие биотехнологические компании занимаются созданием бессмертных РСК животных и человека, которые при введении в ткани способны рекапитулировать эмбриогенез и создавать новые устойчивые ростки специализированных клонов (Алексеева И.Н. с соавт., 1986; Бекетова Т.П. с соавт., 1982; Жданов Т.В. с соавт., 1980; Gerling P. et al., 1992).

3.1.1. Характеристика основных хирургических методов лечения цирроза и других деструктивных заболеваний печени

С каждым годом численность данных заболеваний растет по всему миру, что ведет к учащению обращаемости и госпитализации, увеличению затрат и нахождения больных в стационаре.

Лечение очаговых и диффузных заболеваний печени относится к одним из наиболее сложных разделов хирургии. Поэтому заслуживает внимания любое усовершенствование, направленное на улучшение результатов лечения больных (Нартайлаков М.А. с соавт., 1994; Подымова С.Д. с соавт., 1993; Радзиховский А.П. с соавт., 1995; Рывняк В.В. с соавт., 1996; Садовникова В.В. с соавт., 1998; Chijiwa K. et al., 1994; Diehl A.M. et al., 1991; Hoffman A.L. et al., 1994).

Заболеваемость диффузным поражением печени в среднем по России составляет 4 на 100 тыс. населения. Разработанные рядом авторов методы оперативного лечения диффузных поражений печени, несмотря на очевидные преимущества, не могут в полной мере удовлетворить ни клиницистов, ни самих больных из-за своей травматичности и неудовлетворенности отдаленных результатов (Нартайлаков М.А., 1995).

Печеночная недостаточность у больных хирургического профиля, развившаяся до или после оперативного вмешательства, по-прежнему является одним из наиболее грозных осложнений. Активные методы детоксикации (плазмаферез, дренирование грудного лимфатического протока, сорбционные методы) при данной патологии имеют временный характер и не всегда эффективны. Лечение печеночной недостаточности остается одной из сложнейших задач современной медицины.

Среди населения растет заболеваемость гепатитами различных форм, что неизбежно влечет за собой рост деструктивных поражений печени. В.Б.Егоров, И.А.Ушаков отмечают, что в настоящее время как в РФ, так и в нашей республике большую актуальность приобретает проблема вирусного гепатита В, заболеваемость которым в России выросла в 1998 г. на 60% по сравнению с 1993 г.

Сегодня особое внимание к себе привлекает изучение таких направлений, как **регенерация** и воспаление. При разработке новых хирургических методов лечения исследователи зачастую в недостаточной степени используют возможности регулирования течения различных фаз воспаления, заживления ран, регенерации эпителия, соединительной ткани и репаративной регенерации различных органов (Журавлева М.В. с соавт., 1970; Карташова О.Я. с соавт., 1982; Романова Л.К., 1984; Hwang T.L. et al., 1995; Matsumoto K. et al., 1997).

На конференции 1976 г. по регуляции воспаления и регенерации в хирургии профессор В.И.Русаков отмечал, что изучение опыта отечественной и зарубежной хирургии показывает почти безграничные возможности выполнения сложнейших операций на самых различных органах и системах человеческого организма, вплоть до таких операций, как пересадка почки, печени и сердца. Проблема пересадки органов возникла вследствие наших малых знаний, и ее можно рассматривать как своеобразную защитную реакцию на недостаточность врачебных возможностей.

Изучая регенеративные свойства печени в эксперименте, патофизиологи А.А.Подколин и И.П.Гаранина установили, что после удаления 70–75% печени у собак или крыс через 4–8 недель происходит полное восстановление ее первоначальной массы. Восстановление органа носит двухфазный характер. Наиболее быстрое нарастание массы наблюдается в течение первых трех суток после операции, что связано с периодом интенсивного деления гепатоцитов. Вторая фаза увеличения массы печени наблюдалась с 7-х суток и была обусловлена гипертрофией клеток. В процессе регенерации происходило изменение обмена веществ. Резко снижалось содержание гликогена в печени в первые часы после частичного удаления. В этот же момент уменьшался процесс утилизации глюкозы, так как активность гексокиназы и глюкокиназы падала на 50% от нормы. По сведениям авторов, в регенерирующей печени заметно понижалась активность трансаминазы, аргиназы и других ферментов. Наиболее резкие изменения наблюдались в обмене нуклеиновых кислот. Период, начинающийся с 12 часов после удаления печени и продолжавшийся до трех суток, характеризовался интенсивным синтезом ДНК и РНК. Вывод исследователей: частичное удаление печени может неоднократно повторяться без уменьшения способности к регенерации и без выпадения основных ее функций.

Ряд авторов отмечает важность возрастных изменений в печени, приводящих к снижению способности к восстановлению гепатоцитов и органа в целом (Кудрявцева М.В. с соавт., 1994; Михайлов В.П. с соавт., 1981; Новиков К.Н., 1985; Ariosto F. et al., 1989; Kaïdo T. et al., 1998).

Например, в своей работе «О внутрипеченочной гемодинамике при длительно протекающей желтухе у больных пожилого возраста» И.А.Сафин отмечает: «Многочисленные экспериментальные исследо-

вания и клинические наблюдения показывают, что при затянувшемся течении и при многократном повторении даже кратковременно возникающей механической желтухи в конечном счете возникают значительные нарушения функционального состояния и морфологической структуры печени. Это обстоятельство имеет огромное значение при оперативных вмешательствах у больных пожилого возраста, у которых сочетание этих нарушений с оперативным вмешательством может привести к развитию острой печеночной недостаточности».

Вопросами изучения возрастных изменений в организме занимаются геронтологи В.В.Фолькис, А.Л.Кобзарь, Г.И.Парамонова. Ими в эксперименте изучен инверторный механизм изменения состояния плазматических мембран гепатоцитов при индукции микросомальных монооксигеназ у взрослых и старых крыс. Представленные в работе данные свидетельствуют о существовании определенного соотношения между снижением с возрастом способности к генетической индукции у крыс и характером изменения состояния плазматической мембраны (МП, активность Na⁺, K-АТФазы), а также выявлено снижение способности к регенерации в тканях печени крыс с возрастом.

3.1.2. Анализ некоторых направлений в трансплантологии

Согласно международной терминологии трансплантации тканей, принятой в Вене в 1967 г. и используемой в современной научной литературе, ткани, используемые для пересадок, классифицируются на ауто-, алло- и ксенотрансплантаты.

Аутотрансплантация отличается от других видов пересадки тем, что всегда рассчитана на истинное приживление трансплантатов. Вследствие того что пересадка осуществляется в пределах одного организма, реакция тканевой несовместимости отсутствует. При аутотрансплантации тканей возможны следующие исходы:

- 1) истинное приживление;
- 2) замещение новообразованной тканью с последующим фиброзом, что приводит к рубцовой контракции за счет пролиферации миофибробластов;
- 3) некроз трансплантата вследствие недостатка кровоснабжения после пересадки.

Главными недостатками аутотрансплантации являются ограниченная возможность забора трансплантатов и дополнительная травма, наносимая больному при заборе ткани. Кроме того, при гетеротопической аутотрансплантации часто наблюдается рубцовая деформация.

Аллотрансплантация создает широкую возможность забора тканей, так как в современной хирургии источником трансплантатов являются исключительно трупные ткани. Вторым важным преимуществом аллотрансплантации является возможность консервации трансплан-

тагов, что обеспечивает их длительное хранение. Заготовка и консервация трансплантатов в условиях специализированных тканевых банков позволяют значительно увеличить количество хирургических вмешательств с использованием пересадок. Указанные преимущества позволяют считать аллотрансплантацию тканей наиболее перспективным направлением, открывающим возможность широкого внедрения пересадок в хирургическую практику.

Основным препятствием для широкого использования аллотрансплантатов является реакция тканевой несовместимости. При пересадке нативного трансплантата, как правило, развивается иммунное воспаление, приводящее к быстрому лизису пересаженной ткани и последующему рубцеванию. Если же пересаживать консервированные ткани, то выраженной иммунной реакции не наблюдается и трансплантаты с различной скоростью замещаются новообразованной тканью или инкапсулируются в зависимости от метода консервации.

При **ксенотрансплантации** основным преимуществом является возможность заготовки тканей в большом объеме, которая может иметь характер серийного производства. Однако при использовании ксенотрансплантатов реакция тканевой несовместимости еще более выражена, чем при аллотрансплантации, в связи с видовой несовместимостью и имеет характер острого иммунного воспаления, приводящего к быстрому лизису трансплантата. Иммуногенные свойства ксеногенных тканей можно несколько снизить с помощью консервации в альдегидах, но и в этом случае трансплантаты вызывают бурную клеточную инфильтрацию с набуханием и разволокнением пучков волокон. В отдаленные сроки после операции ксенотрансплантаты окружаются плотной волокнистой капсулой, так как при обработке альдегидами повышается устойчивость тканей к ферментативному лизису.

Таким образом, при алло- и ксенотрансплантации основными факторами, влияющими на результаты операций, являются антигенные свойства трансплантатов и степень их снижения с помощью консервирования. С этой точки зрения наиболее перспективным следует считать использование консервированных аллотрансплантатов.

Вместе с тем проблема трансплантации органов и тканей далека от своего решения. Если пересадка почки стала типовой операцией в современных клиниках развитых стран мира и количество людей, успешно перенесших подобную операцию, исчисляется тысячами, то существует ряд направлений, в которых трансплантология совершает лишь первые шаги и встречается со значительными трудностями (Кованов В.В. с соавт., 1986; Кулик В.П., 1986; Кулик В.П. с соавт., 1994).

Пересадка печени, безусловно, превосходит по своим конечным лечебным возможностям временное подключение органа, однако в техническом отношении эта операция является значительно более сложной и травматичной (Петровский Б.В. с соавт., 1972).

Показаниями к трансплантации печени служат врожденная атрезия желчных путей, массивные поражения этого органа альвеококкозом, прорастающим ворота печени, конечные стадии цирроза печени с выраженными явлениями печеночной недостаточности и печеночной комы. Показания к трансплантации печени при раке в настоящее время дискутируются, так как применение иммунодепрессивных препаратов в послеоперационном периоде вызывает прогрессирование и генерализацию опухолевого процесса.

Э.И. Гальперин и соавт. сообщили о пересадке левой доли печени. Экспериментальные данные подтвердили состоятельность такой операции с точки зрения гемодинамики. Разработанные способы парциальной пересадки печени были апробированы в клинике у двух больных с явлениями тяжелой печеночной недостаточности при центральном неоперабельном альвеококкозе и постнекротическом циррозе печени. В обоих случаях отмечено улучшение клинических и биохимических показателей в ближайшем послеоперационном периоде. Смерть наступила от сопутствующих осложнений через 4 и 20 дней после пересадки. Первый клинический опыт подтвердил техническую выполнимость такой пересадки (Балакирев Е.М. с соавт., 1980).

Отсутствие тенденции к увеличению числа ортотопических пересадок печени во многом объясняется трудностью и сложностью гепатэктомии у больных циррозом печени из-за выраженных явлений печеночной недостаточности и портальной гипертензии, обуславливающей большую кровопотерю во время удаления печени. Следует указать также на сложность и тяжесть самого оперативного вмешательства, отсутствие достаточно эффективных средств лечения печеночной недостаточности и отсутствие аппарата вспомогательной печени, подобного аппарату «искусственная почка».

Проблему гетеротопической пересадки печени обуславливают два основных обстоятельства:

- 1) отсутствие в брюшной полости места для такого большого органа, как печень, и связанные с этим сдавление трансплантата, перерыв сосудов и нарушение органного кровотока, а также дыхательные и гемодинамические расстройства у реципиента;
- 2) трудности подведения к донорской печени портальной крови, а также феномен «конкуренции» между печенью донора и реципиента.

Одним из возможных решений проблемы пересадки печени может явиться пересадка не целого органа, а его части. При этом отпадает главная причина неудач гетеротопической трансплантации печени, заключающаяся в отсутствии места для расположения в организме дополнительного большого органа (Шумаков В.И. с соавт., 1978).

В настоящее время, несмотря на отсутствие радикального решения коренного вопроса трансплантологии, преодоления биологической не-

совместимости, пересадка таких органов, как кожа, кости, почки, сердце, нашла довольно широкое распространение в клинической практике. Однако пересадка органов пищеварения — печени, поджелудочной железы, в меньшей степени кишечника, желудка, пищевода, слюнных желез — не имеет явной тенденции к увеличению (Сухих Г.Т., 1998).

Причиной является не отсутствие показаний к этим операциям, а трудности биологического характера. На первый план выступает отсутствие решения вопроса о выборе рациональной схемы иммунодепрессивной терапии после пересадки печени, поджелудочной железы и кишечника. Все известные химические препараты такого назначения токсичны для печени; некоторые из них, в том числе антилимфоцитарные сыворотки и глобулины, вызывают серьезные нарушения слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и пейеровых бляшек; гормональные иммунодепрессанты (преднизолон и др.) прямо противопоказаны при диабете (Кудрявцева М.В. с соавт., 1994; Кулик В.П., 1986).

Одно из основных значений в трансплантологии приобрела иммунология как наука, объясняющая процессы отторжения или приживания пересаживаемого биологического материала. Поэтому изучение процесса взаимодействия тканей на иммунологическом уровне и является одним из основных разделов современной трансплантологии.

После трансплантации в ряде случаев может развиваться так называемая трансплантационная болезнь, требующая особого подхода в ее лечении, с применением соответствующей иммуносупрессивной терапии (Бабаев А.Г., 1985; Епифанов О.И. с соавт., 1988; Зарецкая Ю.М., 1979; Пауков В.С. с соавт., 1995; Alvizoun-Mimos M. et al., 1992; Gaudio E. et al., 1991; Geisler A. et al., 1994; Melchiorri C. et al., 1994).

Трансплантационная болезнь развивается после введения жизнеспособных несингенных иммунокомпетентных клеток иммунологически инертному реципиенту (Мисник Л.И. с соавт., 1982).

Поэтому проблема профилактики трансплантационной болезни в послеоперационном периоде привлекает к себе все больший интерес.

В трансплантационной иммунологии выделяют следующие цели и задачи.

Цель: повышение эффективности аллогенных трансплантаций.

Задачи: изучение факторов, обуславливающих эффект усилия (изучение MLC-A,B-совместимости, изучение MLC-D,R-локуса, изучение предоперационной гемотрансфузии); иммунологический мониторинг.

В эксперименте на животных с моделью печеночной недостаточности получены положительные результаты применения изолированных гепатоцитов. Это явилось основанием для использования биологически активной клеточной взвеси гепатоцитов в клинике (Маянский Д.Н. с соавт., 1988).

Донорскую печень для получения гепатоцитов брали от трупов скоропостижно умерших, плодов человека поздних сроков развития или животных (свины, собаки). Применялся ферментно-механический способ получения гепатоцитов с последующей их криоконсервацией или хранением при низких (положительных) температурах (Губский Ю.И. с соавт., 1984; Маянский Д.Н. с соавт., 1984; Маянский Д.Н., 1978).

Применение клеточной терапии позволяет способствовать разрешению печеночной недостаточности у самой тяжелой категории больных с эндотоксикозом (Васина Н.В. с соавт., 1995).

Возрос интерес среди ученых по использованию трупного материала для трансплантации как способствующего регенеративным процессам. С этой целью был разработан препарат «Аллоплант», представляющий собой продукт химической обработки аллогенных тканей (Булгаков А.В., 1991; Зарецкая Ю.М., 1979; Мулдашев Э.Р., 1994; Мустафин А.Х., 1995; Нартайлаков М.А. с соавт., 1994; Нигматуллин Р.Т., 1996; Нигматуллин Р.А., 1991; Сафин И.А. с соавт., 1997; Сафин И.А. с соавт., 1994; Muldashev E.R. et al., 1998).

3.1.3. Обзор методов экспериментальной и клинической трансплантации гепатоцитов эмбриона

Многочисленные методы хирургической коррекции патологии печени имеют ряд недостатков, препятствующих их широкому распространению. В настоящее время нет возможности для стандартизации методов трансплантации в гепатологии. В этой связи трансплантация гепатоцита для исправления ферментативных нарушений могла бы быть альтернативой к целой трансплантации органа. Это имело бы главную роль, чтобы использовать ксеногенетические клетки без иммуносупрессивной терапии.

Связь между регенерацией печени и индукцией иммунной реакции не до конца изучена. После трансплантации измененная среда печени, связанная с регенерацией, увеличивает иммунную реакцию к трансплантату. При сравнении на 4-е сутки после трансплантации гистологическая экспертиза показала более энергичную ячеистую инфильтрацию в синусоидальной области транспантированной печени. Эти данные дают предположение, что реакция ячеистой инфильтрации на трансплантацию была активирована. Эти результаты необходимо учитывать при дальнейших исследованиях в данной области (Nakayama S. et al., 1989).

Применение трансплантации фетальных тканей человека у детей с хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени, как однократное, так и в виде серии инъекций, улучшает общее состояние, повышает эмоциональный тонус, уменьшает симптомы печеночной недостаточности (Бобрик И.И. с соавт., 1987).

В настоящее время трансплантация клеток развивается в трех главных направлениях: пересадка специализированных соматических клеток, региональных (РСК) и эмбриональных (ЭСК) стволовых клеток (Сухих Г.Т., 1998).

Терапевтические эффекты пересадок могут быть связаны с эмбрио-специфическими ростовыми факторами, цитокинами и другими сигнальными молекулами, способными активизировать регенерацию и выживание клеток в организме реципиента. Предполагают, что введение фетальных клеток в организм взрослой особи с помощью сети сигналов активирует специализированные и прогениторные клетки. Донорские и регенерирующие клетки реципиента частично или полностью восстанавливают нарушенный молекулярный или клеточный гомеостаз. Экспериментальные и клинические исследования стимулируют поиск новых классов биологически активных соединений. Например, недавно открыты новые белки фетальных клеток с высокой бактериостатической активностью, а также новые иммуномодуляторы фетальных тканей, контролирующие иммунный ответ матери на плод.

Огромный прогресс достигнут в исследовании ЭСК, обнаруженных в ранних зародышах млекопитающих в виде двух независимых популяций. Первый вид ЭСК — это линии бессмертных недифференцированных клеток, получаемых от предимплантационных зародышей млекопитающих. Клетки этого происхождения сохраняют тотипотентность и признаки бессмертия при соблюдении следующих условий: они должны культивироваться в жидкой среде над слоем фидерных клеток, который блокирует взаимодействие ЭСК с подложкой. Кроме того, эти клетки для сохранения незрелого состояния нуждаются в добавлении трех цитокинов: LIF, SCF и IL-3. Эти сигналы принуждают весь хроматин ЭСК находиться в неактивном состоянии. Практически идентичными свойствами обладают линии тератокарциномы человека и млекопитающих, выделенные из спонтанно возникающих опухолей яичников (Сухих Г.Т., 1998).

Другой вид ЭСК получают из герментативных зародышевых клеток, возникающих вне зародышей млекопитающих и человека на стадии, когда основные органы зародыша еще не сформированы. Эта уникальная популяция ЭСК затем мигрирует из желточного мешка к половому бугорку, где формируются провизорные половые органы зародыша. Фактически примордиальные половые зародышевые клетки не являются «собственностью» зародыша. Скорее зародыш является временным носителем бессмертных зародышевых клеток, которые транзитом передаются из поколения в поколение. В настоящее время получены многочисленные бессмертные линии ЭСК человека и млекопитающих из пула примордиальных зародышевых клеток. Наиболее важное свойство ЭСК — способность к полной рекапитуляции эмбриогенеза в организме псевдобеременной самки. С помощью ЭСК удается пре-

одолевать межвидовые барьеры и получать животных, состоящих из нескольких исходных родительских клонов.

Методы пересадки клеток играют все большую роль во внутриутробной коррекции наследственных дефектов. Техниклой трансгенного включения и выключения генов *in situ* у животных созданы корректные модели многих генетических болезней человека. Такие трансгенные линии животных используются для апробации новых технологий переноса генов или клеток с целью коррекции симптомов заболевания (Бахадуров Ф.Н. с соавт., 1998; Косых А.А. с соавт., 1990; Муслимов С.А., 1984; Gaudio E. et al., 1993; Kudryavtseva M.V. et al., 1996; Volk A. et al., 1995).

Медицина последних трех десятилетий создала серьезные научные предпосылки для развития фетальной терапии и трансплантации клеток. Хирурги пришли к идее пересадки клеток одновременно с пересадкой органа из-за огромного дефицита качественного донорского материала. Экспериментаторы и клиницисты искали пути уменьшения количества трансплантируемой ткани, стремясь помочь максимальному числу пациентов.

При заболеваниях нервной и иммунной систем изначально лечение ограничивалось лишь пересадкой клеток или небольшого объема ткани (Урываева И.В. с соавт., 1988; Hamazaki K. et al., 1994).

С помощью ЭСК удается осуществлять массовое тиражирование эмбрионов — генетических близнецов. Описаны эффективные способы клонирования зародышей мышей с идентичным геномом, причем тиражирование идентичных зародышей получено в третьем поколении одного клона мыши с абсолютно идентичным геномом. В будущем клонированные линии животных будут необычайно полезны для изучения эффектов генов и окружающей среды (Дунаев П.В. с соавт., 1999).

Общепринято считать родоначальником фетотрансплантации русского врача-эмигранта С.Воронцова, который в 1920–1930-е гг. в Париже пытался пересаживать фетальные ткани в случаях преждевременного старения.

Показательно, что пересадка лишь 3–5% гепатоцитов компенсирует практически любой наследственный метаболический дефект печени. Мини-трансплантации клеток вполне достаточно для полной эффективной компенсации дефекта фермента, белка-переносчика или белка-рецептора. Несмотря на низкую приживляемость донорских гепатоцитов в печени или селезенке, прикрепленные донорские клетки размножаются и формируют устойчивые ростки новой паренхимы в матриксе селезенки или печени реципиента. Для увеличения эффективности имплантации донорских гепатоцитов создают условия повышенной регенерации гепатоцитов реципиента стимуляцией апоптоза или частичной ишемии органа. Внутривенное введение рекомбинантного HGF (Hepatocyte Growth Factor) пациентам с печеночной недостаточностью почти на порядок понижает количество гепатоцитов в «искусственной

печени», необходимых для выживания пациентов. HGF стимулирует одновременно имплантацию и пролиферацию донорских гепатоцитов и регенерацию оставшейся паренхимы печени пациентов. Преимущество пересадки клеток связано с возможностью повторных эктопических инъекций криопрезервированных клеток. Существенно, что линии специализированных соматических клеток лишены примеси ретикулоэндотелиальной ткани, которая содержит до 70% антигенов органа. Поэтому уровень иммунологических проблем в организме реципиента значительно уменьшен по сравнению с пересадкой исходных органов.

Введение экспериментальным животным эмбриональной ткани печени человека в условиях алиментарной гиперхолестеринемии приводит к достоверному снижению в цитоплазме гепатоцитов количества липидов, росту сосудистого русла за счет увеличения площади и количества капилляров, а также уменьшает площадь липидной инфильтрации аорты экспериментальных животных и способствует более быстрой регрессии изменений, произошедших на фоне алиментарной гиперхолестеринемии. Введение экспериментальным животным ФТП в условиях алиментарной гиперхолестеринемии приводит к достоверному снижению в цитоплазме гепатоцитов количества липидов, росту сосудистого русла за счет увеличения площади и количества капилляров, а также уменьшает площадь липидной инфильтрации аорты экспериментальных животных и способствует более быстрой регрессии изменений, произошедших на фоне алиментарной гиперхолестеринемии (Алексеев В.А. с соавт., 1984).

Ряд авторов экспериментально пересаживал фрагменты тканей печени, при дальнейшем исследовании которых трансплантат эмбриональной печени состоял из системы полостей («сот»), выстланных цилиндрическим, кубическим эпителием. Полости были разделены соединительнотканными перегородками различной толщины. В просветах некоторых полостей скопления клеток типа гемопоэтической ткани. Таким образом, трансплантат сохраняет строение эмбриональной печени. Последний образует небольшие выросты и сосочки, обращенные внутрь полостей. Наблюдаются очаги округлых гепатоцитоподобных клеток, не образующих трабекул, единичные очаги формирования хрящеподобной ткани между эпителием. При данной трансплантации печени плода появляются клеточные элементы типа гепатоцитов и отсутствуют признаки эмбрионального кроветворения (Соловьев Ю.Н. с соавт., 1985).

В экспериментальной работе по изучению пролиферативной активности селезенки после введения экстракта плаценты и суспензии фетальной печени человека О.П.Рябчиков, Л.В.Кузнецова с соавт. (НИИ морфологии человека РАМН) пришли к выводам, что:

- введение мышам экстракта плаценты человека усиливает пролиферативный ответ лимфоцитов селезенки на конканавалин А и липополисахарид спустя 7 и 40 суток после начала эксперимента;

- митогениндуцированная пролиферация Т- и В-лимфоцитов после введения экстракта плаценты связана с истинным повышением пролиферативного потенциала одной клетки; имплантация мышам суспензии ФПЧ не влияет на митогениндуцированную пролиферацию Т- и В-лимфоцитов;
- после имплантации мышам экстракта плаценты и суспензии ФПЧ существенно снижается спонтанная пролиферация лимфоцитов селезенки *in vitro* (подобного эффекта *in vivo* не наблюдалось);
- после введения животным суспензии в селезенке значительно увеличивается процентное содержание В-лимфоцитов, а на 60-е сутки эксперимента — и Т-клеток;
- имплантация экстракта плаценты вызывает увеличение в селезенке мышей количества Т-клеток на 60-е и В-клеток на 14-е сутки эксперимента;
- изменения в иммунном статусе лимфоцитов селезенки мышей связаны с наличием в препаратах экстракта плаценты и суспензии ФПЧ-комплекса гормональных веществ, белков зоны беременности (фетоплацентарного комплекса), а также ряда других биологически активных молекул.

Наибольшее количество проектов клеточной трансплантации соматических дифференцированных клеток связано с генной терапией болезней человека. Сюда относятся проекты лечения мышечной дистрофии Дюшенна пересадкой трансфицированных миобластов. Наиболее перспективными оказались проекты пересадки фрагментов гена дистрофина или гена утrophина — эмбрионального дистрофина мышц. Пересадки ауто- и аллогенных трансфицированных линий миобластов не приводили к полному излечению, но существенно тормозили прогрессирование заболевания. Только в клинике профессора П.Лоу в Мемфисе прошли лечение методом пересадки миобластов здоровых родителей более 350 пациентов из 20 стран мира. По схеме П.Лоу пересадки миллионов донорских и реципиентных миобластов на мышцу проводят с целью рекапитуляции эмбриогенеза мышцы. На ранних фазах болезни в дегенерирующей мышце у пациентов-дистрофиков сохраняется значительный пул миобластов, которые прямо в мышце сливаются со здоровыми миобластами донора. Химерные мышечные волокна оказались слабыми антигенами, что облегчает их дальнейшее выживание.

Другим примером применения аллогенных дифференцированных соматических клеток является пересадка изолированных островков Лангерганса пациентам с инсулинзависимым диабетом. Известно, что даже у нормальных людей численность островков, продуцирующих инсулин в поджелудочной железе, ограничена $5-6 \times 10^6$ β -клетками. У многих больных сахарным диабетом дефицит островков обусловлен вирусной инфекцией и аутоиммунной гибелью клеток. Эктопические

пересадки аллогенных фетальных островков человека и свиньи в ряде случаев дают устойчивую ремиссию заболевания. Обычно эффективность трансплантации и длительность ремиссии зависят от степени иммуноtolерантности, которую удастся достичь в отношении новой имплантированной ткани. Во многих случаях пересадки эндокринной части поджелудочной железы спасают пациентов от неминуемой гибели. Как известно, отечественные ученые и хирурги добились неоспоримого приоритета в этой области (Сухих Г.Т., 1998).

Пробные попытки клинических пересадок фетального яичника выполнены при некоторых формах стерильности женщин, хотя отдаленные результаты изучены недостаточно. Проводятся клинические испытания лечения гемофилии (наследственный дефицит фактора свертывания VIII или IX) путем трансплантации миеобластов либо фибробластов, трансфицированных соответствующим геном. На стадии клинических испытаний находятся проекты генной терапии семейной гиперхолестеринемии, болезни Гоше, болезней отложения липидов у пациентов с наследственным дефицитом гидролитических ферментов лизосом.

Каждая пересаженная фетальная клетка в благоприятном окружении способна дать самообновляющийся долгоживущий росток функциональной ткани в организме реципиента. Например, 40% клеток фетальной печени составляют РСК, более 58% приходится на blastные элементы, тогда как на долю дифференцированных гепатоцитов — менее 1% клеток органа. Напротив, печень взрослого человека на 99,8% состоит из популяций зрелых дифференцированных гепатоцитов, синусных и купферовых клеток. Фетальные ткани 17–32 недель развития практически полностью состоят из прогениторных клеток с высоким потенциалом миграции и репопуляции. Каждая фетальная клетка имплантируется в 10–100 раз активнее в тканях реципиента и дает в 100–10 000 раз больше клеток в ростках по сравнению с дифференцированными клетками человека из взрослых органов. Пул региональных стволовых клеток составляет менее 1% численности клеток органа (если вспомнить, что взрослая печень содержит 10^9 клеток, то пул овальных blastных клеток насчитывает десятки миллионов — солидный резерв для регенерации органа). Медицина делает первые шаги в сторону активного использования этих скрытых резервов здоровья (Княсов А.П. с соавт., 2008; Martinez-Hernandez A. et al., 1991).

В настоящее время в мире широко используются региональные стволовые клетки. Наиболее эффективные примеры пересадок РСГК, получаемых из донорской пупочной вены или фетальной печени, связаны с лечением наследственных иммунодефицитов у детей (например, АДА-дефицита, обусловленного избирательной гибелью клонов Т-лимфоцитов). Пересадки РСГК в костный мозг детей приводят к постепенной стабильной репопуляции гематогенной ткани донорскими предшественниками и мие-

лоидными ростками вплоть до формирования нормальной полноценной популяции зрелых лимфоцитов. Такая искусственно собранная «химерная» иммунная система больного начинает нормально функционировать с постепенным исчезновением симптомов иммунодефицита.

В 1995 г. больному СПИДом из Калифорнии впервые было проведено несколько сеансов трансплантации РСГК приматов для реконструкции его иммунной системы. Известно, что иммунная система приматов имеет видовую резистентность к вирусу СПИДа. Пересадки костного мозга обезьяны блокировали развитие болезни, хотя добиться полного функционального восстановления иммунитета не удалось. Данный больной является первым пациентом с иммунитетом-«химерой», искусственно собранным из ростков стволовых клеток обезьяны и человека. Практика показала, что стволовые и дифференцированные клетки двух видов млекопитающих могут не только сосуществовать, но и выполнять единые защитные функции.

Уникальные возможности открывают пересадки донорских РСГК в лечении болезней головного мозга, вызванных наследственным дефектом ферментов лизосом и накоплением полимерных шлаков в нервных клетках. Подсчитано: когда доля донорских здоровых клеток микроглии достигает в головном мозге 3–5%, биохимические признаки заболевания начинают исчезать одновременно со значительным улучшением неврологической симптоматики.

Миграция нормальных донорских моноцитов в мозг через гемато-энцефалический барьер создает новую популяцию микроглии. В эксперименте на мышах показано, что достаточно 5% нормальной микроглии для производства фермента, разрушающего избыток цереброзидов в мозге.

Также с успехом применяют трансплантацию нейрональных стволовых клеток. Пионером нейротрансплантации считают американского нейрохирурга Томпсона, который в середине прошлого века делал пересадки нервной ткани в мозг животных в Нью-Йоркском университете.

Главный прорыв в последнее десятилетие связан с препаративным выделением, культивированием и созданием линий нейрональных стволовых клеток (НСК) (Кирпатовский И.Д., 1998; Коваленко П.П., 1975; Flisiak R., 1997).

Долгие годы НСК не удавалось выделить из мозга взрослых млекопитающих. Поиски НСК в головном мозге взрослых особей казались бесперспективными, поскольку считалось общепринятым, что мозговая ткань млекопитающих и человека не регенерирует. В частности, это связывали с отсутствием НСК, способных производить новые популяции нейронов. Однако из-за ограничений на макротрансплантацию нейрохирургия первой перешла на рельсы молекулярных и клеточных вмешательств.

3.2. Моделирование вариантов экспериментального хронического гепатита и цирроза печени и способов их коррекции

Экспериментальное исследование выполнено на 300 белых крысах линии Вистар ($m = 250\text{--}350$ г) по пересадке гепатоцитов эмбриона. Животных содержали на обычном питании в сходных условиях.

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых принципов, международных нормативных документов и инструкций МЗ РФ и РАМН по работе с лабораторными животными (Байматов В.Н., 1993; Проскурякова И.С. с соавт., 1992; Сетков Н.А. с соавт., 1991; Bosch J. et al., 1994; Czaja M.I. et al., 1989).

Характеристика экспериментальных животных. Изучение характеристики экспериментальных животных проводилось на 30 белых крысах линии Вистар ($m = 250\text{--}350$ г). Для разведения были отобраны здоровые, упитанные, подвижные животные с блестящей шерстью, в возрасте 8–10 месяцев.

Вес печени здоровой особи колебался от 8,5 г (у крыс весом 250 г) до 12–14 г (у крыс весом 350 г), что составляло 4–6% общего веса животного.

Отработка технологии

Для отработки технологии было проведено два эксперимента с выделением:

- 1) 9 печеней эмбриона от одной самки, ориентировочно на 15-е сутки беременности, с добавлением 9 мл физиологического раствора,
- 2) 6 печеней эмбриона от одной самки, ориентировочно на 15-е сутки беременности, с добавлением 6 мл питательной среды №199.

Гомогенат был получен в *тефлоновом гомогенизаторе*. Полученный субстрат был отцентрифугирован в течение 30 минут на скорости 1500 об./мин. После чего гомогенат разделился на три слоя. Каждый слой подвергался тщательному морфологическому исследованию на предмет изучения качественного, количественного состава слоев, жизнеспособности и функциональной активности клеточных структур в них. Каждый слой выделен в отдельную пробирку и окрашен:

- 1) по Романовскому-Гимзе,
- 2) *трипановым синим* (краситель, выявляющий погибшие клетки) в концентрации 0,4% раствора. Морфологическое исследование (5 мл) показало, что в *верхнем* (4 мл) слое практически отсутствуют клетки или клеточные структуры, в *среднем* (0,7 мл) — основное количество живых гепатоцитов (до 98%), а также в небольшом количестве клеточные структуры, лимфоциты, макрофаги и др., в *нижнем* (1,3 мл) — лимфоциты, макрофаги, клеточные

структуры и в небольшом количестве гепатоциты. Подсчет велся в камере Горяева при 40-кратном увеличении.

Гомогенат получали по отработанной технологии при содействии сотрудников ЦНИЛа (директор ЦНИЛа — проф. В.В.Сперанский).

Было выделено 10 печеней эмбриона от одной самки. После механической очистки печени были отмыты в питательной среде №199 (в данной среде клетки могут быть жизнеспособными в течение длительного времени) и помещены в свежую среду №199 (10 мл). Была произведена гомогенизация в тefлоновом гомогенизаторе (до однородной массы). Гомогенат отцентрифугировали в двух пробирках по 5 мл в течение 40 минут при 1500 об./мин. Средний слой (2 мл) после выделения был разведен в 3 мл среды №199.

Эксперименты проводились в два этапа.

Первый (предварительный) этап представлял собой пересадку фетальных клеток в здоровую печень с целью изучения поведения трансплантата и организма реципиента. Работа проводилась на 50 крысах.

Пересадка печеночной ткани осуществлялась следующим образом. Осуществляли забор крысиного эмбриона сроком 15–17 суток путем лапаротомии, извлекали печень зародыша (печень выделяли в стерильных условиях) и помещали в определенный объем питательной среды (в качестве питательной использовали среду №199), получали гомогенат в гомогенизаторе, который разливали в пробирки с равными объемами и подвергали центрифугированию. Центрифугировали при скорости 1500 об./мин в течение 30 минут. В гомогенате использовали печень эмбрионов от одной самки.

После центрифугирования содержимое пробирок (условно) разделяли на три слоя: верхний, средний и нижний, выделяли средний слой и верхнюю часть нижнего слоя, разводили в питательной среде №199 и вводили в воротную вену крысе-реципиенту.

Операция производилась следующим образом.

Передняя брюшная стенка рассекалась по срединной линии (верхне-средне-срединный разрез), брюшную полость орошали 0,5% раствором новокаина, сальник и петли кишечника отводились в левую половину брюшной полости марлей, доли печени приподнимали кверху тупфером, смоченным в растворе фурацилина (1:1000), выделялась v. portae, медленно, инсулиновым шприцем вводили трансплантат в количестве 0,3 мл, иглу шприца извлекали из вены через 25–30 секунд после окончания введения трансплантата с целью предупреждения кровотечения. В связи с кратковременной портальной гипертензией область укола обкладывали близлежащими тканями, переднюю брюшную стенку ушивали непрерывным погружным швом, рану обрабатывали раствором фурацилина и 96% спиртом, накладывали стерильную повязку.

Оперированных животных помещали в заранее простерилизованные клетки (каждое животное в отдельную клетку) в хорошо освещенной комнате, где предварительно была проведена санитарная обработка. Первые 12 часов прооперированному животному давалась только вода. Ежедневно, в течение первых 10 суток после операции в комнате с животными проводили санобработку и смену настила в клетках. Животные получали полноценный рацион питания три раза в сутки.

Гибели животных в послеоперационном периоде, связанной с пересадкой эмбриональных гепатоцитов, не отмечалось.

Второй (основной) этап представлял собой трансплантацию фетальных гепатоцитов в печень реципиента с моделью цирроза. Работа проводилась на 200 крысах.

Большинство авторов в качестве модели цирроза предлагают использовать затравку экспериментальных животных раствором четыреххлористого углерода (CCl_4) в различных концентрациях (Венгерский А.И. с соавт., 1999; Солопаев Б.П. с соавт., 1980; Ушаков В.Ф. с соавт., 1990; Chen M.F. et al., 1994; Gererts A. et al., 1991; Greenwel P. et al., 1991; Hernandez-Munoz R. et al., 1997; Herbst H. et al., 1992; Krahlenbuhl S. et al., 1990; Lukita-Atmadja W., 1993).

Модель цирроза была получена путем введения per os CCl_4 (Венгеровский А.И., Батурина Н.О. с соавт.) в течение одного месяца по схеме (табл. 3.1). Летальность составила до 25%. Отмечено снижение массы тела у каждой особи в среднем на 50 г.

Затравка проводилась на базе Научно-исследовательского института медицины труда и экологии человека при содействии сотрудников вивария и лаборатории токсикологии (заведующий лабораторией — проф. В.А.Мышкин).

Способ приготовления раствора для введения.

Концентрированный CCl_4 разводят с подсолнечным маслом в равных пропорциях.

Были затравлены 200 крыс. Летальность составила 30%. Проводилось целенаправленное изучение особенности реакции в зависимости от пола, резко выраженных отличий не наблюдалось.

Таблица 3.1

Расчет необходимой дозировки p-ра CCl_4 (по Батуриной с соавт.)

Вес (г)	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350
CCl_4 (мл)	0,36	0,38	0,4	0,42	0,44	0,46	0,48	0,5	0,52	0,54	0,56	0,58	0,6	0,62	0,64	0,66	0,68	0,7
P-p (мл)	0,72	0,76	0,8	0,84	0,88	0,92	0,96	1,0	1,04	1,08	1,12	1,16	1,2	1,24	1,28	1,32	1,36	1,4

Морфологическая картина и биохимические сдвиги свидетельствовали о возникновении классической картины тяжелой декомпенсированной формы цирроза (Волкова О.В. с соавт., 1982; Сакута Г.А., 1997; Секамова С.М. с соавт., 1989; Серов В.В. с соавт., 1989).

Методы окраски. Кусочки печени, почки и селезенки фиксировались в 10% растворе формалина и исследовались морфологически. Проводилось также цитохимическое исследование.

Окраской *по Романовскому-Гимзе* определяли клеточный состав тканей, предназначенных для трансплантации (50 препаратов).

Окраской *трипановым синим* выявляли количество погибших клеток после гомогенизации (трипановый синий окрашивает погибшие клетки, проникая через поврежденную клеточную мембрану) (30 препаратов).

Окраской *гематоксилином* и *эозином* выявляли морфоструктурные изменения в тканях (1600 препаратов).

Проводились *гистохимические* исследования. Из забранной печеночной ткани в криостате готовили срезы толщиной 7 мкм при температуре -20°C . Активность окислительно-восстановительного фермента сукцинатдегидрогеназы определяли методом Нахласа, количество кислых гликозаминогликанов — методом Хейла и оценивали количеством методом: высокая, умеренная, слабая и инактивная (150 препаратов).

3.3. Морфологические изменения в печени и других органах после трансплантации

3.3.1. Морфологические изменения в здоровой печени после трансплантации эмбриональных гепатоцитов

Данный этап представлял собой пересадку фетальных клеток в здоровую печень с целью изучения поведения трансплантата и организма реципиента. Работа проводилась на 50 крысах. Во время операции погибли шесть особей, в раннем послеоперационном периоде — три особи. Все операции проводились под эфирным наркозом.

Животных подвергали морфологическому и цитохимическому исследованию. Забивали путем декапитации. Исследования проводились в динамике на 10-е и 20-е сутки после операции.

Морфологически на 10-е сутки наблюдалась частичная гибель пересаженных клеток. Гепатоциты, расположенные вокруг сосудов с трансплантатом, не имели четкой границы, их ядра были уменьшены в размерах, хроматин плотный, что свидетельствует о вялотекущем воспалительном процессе (рис. 3.1–3.4, см. цв. вклейку).

На 20-е сутки исследования в дольках печени мелкоочаговый некроз пересаженных гепатоцитов уже не определялся, однако встречались скопления без резко выраженной границы колоний клеток, с базофильной цитоплазмой (см. рис. 3.2—3.4, см. цв. вклейку).

Вероятно, это очаги бывшего некроза гепатоцитов донора с постепенным рассасыванием зоны разрушения и заполнением их новыми делящимися клетками трансплантата. Интересные морфологические изменения определялись в зоне расположения крупных кровеносных сосудов, особенно вокруг триады печени и центральной вены, с веерообразным расположением интенсивно окрашивающихся гепатоцитов. Большинство из них вытянутой формы, следуют друг за другом и в целом формируют печеночные пластинки. Рядом с такими же гепатоцитами располагаются полигональной формы клетки, которые составляют основную массу клеток печени, для них также характерны светлая цитоплазма, слабая окрашиваемость ядра и обязательно наличие ядрышка. Интенсивно окрашенные тяжи гепатоцитов растут вглубь дольки по ходу печеночных пластинок. В то же время можно видеть изолированно расположенные гепатоциты. Наконец, в некоторых дольках печени определяется довольно большое скопление гепатоцитов, отличающихся по тинкториальным свойствам от других (собственных) гепатоцитов печени. Реакции отторжения трансплантата, связанной с пересадкой эмбриональных гепатоцитов, не наблюдалось ни в одном из случаев.

3.3.2. Морфологические изменения в печени с моделью цирроза после трансплантации эмбриональных гепатоцитов

Целью исследования явилось изучение воздействия четыреххлористого углерода (CCl_4) на морфологическое строение печени экспериментальных животных.

Затравка четыреххлористым углеродом приводила к выраженным морфологическим изменениям исследуемых органов, особенно в печени.

Прежде всего определялось нарушение дольчатости строения печени вследствие разрастания междольковой соединительной ткани с фибробластическими и гистиоцитарно-лимфоидными клетками, а также коллагеновыми и эластическими волокнами. Строма печени проникала в дольку и изолировала отдельные группы гепатоцитов из клеточных пластинок с образованием узлов регенерации (ложные дольки). Соединительнотканые структуры появлялись и внутри печеночных долек, эта ткань отодвигала печеночные пластинки друг от друга и разделяла дольку на фрагменты. Отдельные гепатоциты или их небольшие группы достигали очень больших размеров, многие из них имели

полиплоидное ядро. Крупного размера гепатоциты встречались и в толще долек печени. Более крупного размера скопления гепатоцитов характеризовались нормальными размерами как самих клеток, так и их ядер, среди них отмечались делящиеся гепатоциты. Достаточно часто обнаруживались гепатоциты со слабой окрашиваемостью цитоплазмы и ядер. Контуры таких клеток не имели четких границ, хроматин ядра представлял собой мелкие диспергированные глыбки (рис. 3.5, см. цв. вклейку). Для некоторых гепатоцитов было характерно повышение базофильности цитоплазмы в результате усиления внутриклеточного метаболизма, однако встречались гепатоциты с ацидофильной цитоплазмой с четкой границей клеток и плотным хроматином в ядре. Они могут располагаться отдельно и небольшими группами. Во многих участках печени, особенно в центральной части долек, преобладали гепатоциты с явлениями жировой дистрофии. Жировые включения могли быть пылевидными, мелкокапельными и крупнокапельными. Часть гепатоцитов подвергалась денатурации и коагуляции с последующей деструкцией мембранных структур клетки. Встречались гепатоциты с гидролитической дистрофией, которая проявлялась возникновением в клетке вакуолей, наполненных цитоплазматической жидкостью. Наряду с разрастанием междольковой соединительной ткани печени и выраженными некротическими изменениями в гепатоцитах определялось полнокровие крупных кровеносных сосудов с периваскулярным скоплением фибробластических и лимфоидных клеток.

Таким образом, четыреххлористый углерод обладает выраженным гепатотоксическим действием, которое проявляется резкими нарушениями дольчатого строения с интенсивным фиброзом и образованием ложных долек печени, дистрофией и некрозом гепатоцитов, гистолимфоцитарной инфильтрацией паренхимы и нарушением системы кровообращения, что свидетельствует о явной картине хронического гепатита.

При интоксикации четыреххлористым углеродом отмечалась почечная недостаточность в результате глубокого нарушения крово- и лимфообращения почки. Спазм сосудов коркового слоя сопровождался сморщиванием отдельных почечных телец. При этом капилляры почечных телец находились в спавшемся состоянии. Особенно хорошо определялись глубокие дистрофические и некробиотические изменения проксимального отдела нефронов. Эпителий проксимального отдела нефрона находился в состоянии гиалиново-капельной, гидропической или жировой дистрофии. В просветах таких канальцев располагались цилиндры, местами можно было видеть разрушение базальной мембраны клеток нефрона, встречались лейкоцитарная инфильтрация и отек интерстициальной ткани. В просвете отдельных нефронов обнаруживались большие скопления слущенных эпителиаль-

ных клеток или их фрагментов с белковыми компонентами. Подобные структуры полностью закупоривали просвет нефрона. Одновременно определялись достаточно большие скопления лимфоидной ткани в непосредственной близости от функционирующего почечного тельца или между канальцами нефрона в соединительнотканной строме почки. Часто определялось полнокровие кровеносных капилляров.

При морфологическом исследовании селезеночной ткани отмечалась гиперплазия лимфоцитов, многие из которых были с плазмодитарной трансформацией. Определялись полнокровие и увеличение белой пульпы селезенки, гиперплазия и плазматизация красной пульпы, в которой отмечалось большое количество макрофагов.

Через 10 дней после трансплантации в селезенке отмечались уменьшение размеров белой пульпы и полнокровие красной, а также мелкие лимфоидные скопления в красной пульпе селезенки, свидетельствовавшие о диффузном воспалительном процессе, затронувшем орган. На 20-е сутки после трансплантации морфологическая картина резко не менялась, хотя поражение селезенки имело менее выраженный характер. Также присутствовали лимфоидные скопления в красной пульпе селезенки. В последующие дни (30-е, 40-е сутки) активность воспалительного процесса постепенно снижалась.

На 10-е сутки в гистологических препаратах печени (междолькового пространства), прежде всего в зоне расположения триады печени, практически исчезли большие скопления клеток макрофагической системы, а также основная масса соединительнотканых структур. В целом отмечается восстановление дольчатого строения печени у подопытных животных. В то же время все еще сохранена умеренная воспалительная реакция печеночной паренхимы, а именно междольковые венозные сосуды, центральные вены долек, а также внутريدольковые синусоидные капилляры остаются полнокровными. Во многих случаях в просветах крупных венозных сосудов отмечается большое скопление лейкоцитов, они распределены равномерно или прилегают непосредственно к внутренней оболочке кровеносных сосудов, иногда встречаются небольшие скопления лимфоидной ткани в периваскулярной зоне.

В целом реакция сосудистой системы печени стабилизируется: венозный застой умеренный, периваскулярный отек не определяется, реакция лимфоидной системы печени постепенно ослабевает, одновременно исчезают клеточные элементы и межклеточное вещество междольковой соединительной ткани.

Дифференцированные гепатоциты характеризуются пенисто-ячеистым строением цитоплазмы, все они мелкие, скорее всего, это зоны расположения трофических включений. Некоторые гепатоциты имеют полноценное ядро. В различных участках дольки печени встречаются гепатоциты с оксифильной цитоплазмой, они могут распола-

гаться отдельно или небольшими группами. В то же время в различных участках дольки печени встречаются небольшого размера гепатоциты с базофильной цитоплазмой, и многие из них активно делятся. Чаще всего они располагаются вдоль синусоидных капилляров или по ходу печеночных балок. Встречаются достаточно большого размера скопления подобных клеток, которые имеют округлую, полигональную или вытянутую форму. Часть из них имеет относительно изолированное расположение от дифференцированных гепатоцитов (рис. 3.6, см. цв. вклейку), тогда как в других случаях базофильные клетки, имеющие полигональную форму, распространяются в различных направлениях от основной массы клеток. Такие клетки располагаются в виде клеточных тяжей, имеют различную длину и толщину. Клетки полигональной формы, ядро с плотным хроматином, цитоплазма базофильная.

Таким образом, одиночные или небольшого размера скопления базофильных клеток являются трансплантированными эмбриональными гепатоцитами, способствующими постепенному восстановлению морфологического строения и функциональной активности печени подопытных животных.

На 20-й день эксперимента в печеночной ткани определяется дальнейшее восстановление морфологической структуры долек. Цитоплазма гепатоцитов равномерной окраски. Многие гепатоциты имеют полиплоидное ядро, они содержат от одного до трех ядрышек. Вокруг центральной вены, особенно вокруг междольковых кровеносных сосудов, определяются небольшие скопления интенсивно окрашенных гепатоцитов, они имеют вытянутую или полиплоидную форму.

Такие клетки преимущественно располагаются вдоль кровеносных капилляров. Некоторые из них могут быть с двумя или тремя ядрами. Хроматин ядра очень плотный, цитоплазма окрашивается базофильно. Интенсивно окрашенные гепатоциты, достигающие больших размеров, выстраиваются в ряд и входят в состав печеночных пластинок. Такие гепатоциты встречаются и внутри дольки печени, в основном они полигональной формы, некоторые из них двухъядерные. По ходу кровеносных сосудов печени, главным образом в зоне расположения триады, определяются небольшие скопления лимфоидной ткани. Они могут располагаться вокруг кровеносных сосудов в виде муфты. Между дольками печени вокруг кровеносных сосудов определяются скопления лейкоцитов с оксифильной зернистостью цитоплазмы (эозинофилы). Ядра округлой или вытянутой формы, некоторые из них с выраженной сегментацией, количество сегментов — чаще всего два, встречаются ядра и с трехлопастной фигурой. Как правило, клетки эозинофильного типа располагаются в периваскулярной зоне. По-видимому, концентрическое расположение эозинофильных лейкоцитов по ходу или вокруг кровеносных капилляров является результатом ал-

лергической реакции организма на введение гомогената (эмбриональных печеночных клеток).

В то же время внутри печеночных долек обнаруживаются большие скопления интенсивно окрашенных клеток (рис. 3.7, см. цв. вклейку). Подобные скопления клеток могут занимать значительную часть долек печени. Полигональной формы клетки располагаются тяжами, формируя фигуру печеночных балок. Цитоплазма клеток окрашивается равномерно и базофильно. Определяются делящиеся клетки. В просвете междольковых вен обнаруживаются достаточно большие скопления гепатоцитов, клетки полигональной или кубической формы, они тесно соединены между собой и формируют клеточные тяжи, среди них можно увидеть делящиеся клетки. По краю расположения гепатоциты вплотную прилегают к эндотелиоцитам кровеносных сосудов. По ходу клеточных тяжей гепатоцитов располагаются сильно вытянутой формы клетки с веретеновидным ядром, являющиеся по всем признакам эндотелиоцитами кровеносных капилляров. Часть гепатоцитов в области просвета кровеносных сосудов располагается изолированно, вокруг трансплантата — форменные элементы крови (рис. 3.8, см. цв. вклейку). Гепатоциты, расположенные внутри кровеносных сосудов, по всем морфологическим показателям не только жизнеспособны, но даже некоторые из них продолжают делиться. У делящихся гепатоцитов размеры клетки и ядра в два раза меньше, чем у неделящихся гепатоцитов. Ядро таких клеток имеет плотный хроматин. Таким образом, эмбриональная клеточная масса из гепатоцитов, трансплантированная через воротную вену, продолжает увеличиваться в количестве и в просвете кровеносного сосуда, тогда как часть трансплантированных гепатоцитов проникает вовнутрь дольки через щелевидные промежутки между эндотелиальными клетками синусоидных капилляров. В просвете отдельных кровеносных сосудов можно видеть скопления лимфоидных клеток, частично они выходят и в периваскулярную зону. В отдельных случаях лимфоидные клетки могут располагаться небольшими группами в непосредственной близости от кровеносных сосудов печени.

Через 20 дней после трансплантации эмбриональных гепатоцитов в организм взрослых животных в гепатоцитах печени окислительно-восстановительный фермент СДГ (сукцинатдегидрогеназа — фермент, изменение активности которого является показателем функциональной деятельности клетки) проявляет высокую активность, при этом фермент по всей цитоплазме гепатоцитов распределяется равномерно (рис. 3.9, см. цв. вклейку). Однако в дольках печени, особенно по ходу печеночных пластинок, встречаются отдельные гепатоциты с очень высокой реакцией на фермент. Междольковая соединительная ткань и триада печени проявляют слабую реакцию на СДГ. Кислые гликозаминогликаны в гепатоцитах определяются в умеренном количестве

и распределены равномерно. В это же время в различных участках долилки печени, чаще всего в непосредственной близости от кровеносных сосудов, в отдельных клетках выявляется большое количество кислых гликозаминогликанов, что позволяет считать, что это трансплантированные эмбриональные гепатоциты, проявляющие высокую функциональную активность.

Через 30 дней после эксперимента определяется хорошо выраженная дольчатость печени, междольковая соединительная ткань развита слабо, меж- и внутридольковые кровеносные сосуды умеренного кровенаполнения. По ходу междольковых кровеносных сосудов продолжают встречаться небольшие скопления лимфоидных клеток. Вдоль внутридольковых синусоидных капилляров располагаются интенсивно окрашенные гепатоциты, формирующие печеночные балки. Клетки полигональной или кубической формы, многие из них с полиплоидным ядром, довольно часто встречаются двухъядерные клетки. Часто полиплоидные клетки остаются соединенными цитоплазмой (рис. 3.10, см. цв. вклейку).

Встречаются печеночные долилки, состоящие из двух половин. Одна половина долилки окрашивается интенсивно, так же как остальные долилки печени (рис. 3.11, см. цв. вклейку). Другая половина долилки окрашивается слабее. Такие участки долилки печени занимают пространство между триадой печени и центральной веной, они имеют овальную форму. Между этими двумя зонами долилки печени не определяются соединительнотканые перегородки, однако на их границе проходят кровеносные капилляры, но радиальное расположение гепатоцитов незаметно. Цитоплазма гепатоцитов имеет пенисто-ячеистое строение, тогда как ядра гепатоцитов не отличаются от ядер гепатоцитов других участков печени. Вокруг триады печени располагаются интенсивно окрашенные гепатоциты. Они внедряются вовнутрь долилки, формируя печеночные балки. Подавляющее большинство из них двухъядерные, между печеночными балками проходят кровеносные капилляры. В то же время встречаются небольшие очаги фибробластических клеток со скоплением лимфоидной ткани. Клетки имеют веретеновидную форму. Внутри долилки можно видеть и более интенсивно окрашенную группу гепатоцитов, они располагаются между двумя триадами печени. Клетки располагаются тяжами, они вытянутой формы, многие из них двухъядерные. Между тяжами клеток проходят кровеносные капилляры с эндотелиоцитами вытянутой формы.

Через 40 дней после трансплантации как в печени, так и в селезенке существенных изменений в морфологическом строении в целом не выявляется. Однако встречаются небольшие очаги интенсивно окрашенных клеток, расположенных тяжами. Клеточные тяжи располагаются кругами, клетки имеют вытянутую или полигональную форму. Между клеточными тяжами (балками) располагаются синусоидные

капилляры, образованные эндотелиоцитами и макрофагическими клетками. Встречаются небольшие скопления лимфоидной ткани по ходу кровеносных сосудов печени. Селезенка состоит из красной и белой пульпы и не отличается от селезенки контрольной группы.

Через 50–70 дней определяется хорошо выраженная дольчатость печени. Междольковая соединительная ткань развита слабо. Вдоль междольковых кровеносных сосудов и внутридольковых кровеносных капилляров встречаются небольшие скопления лимфоидной ткани. Среди гепатоцитов вдоль печеночных пластинок определяются интенсивно окрашенные клетки печени, не отличающиеся от других гепатоцитов. Они также полигональной или кубической формы, хроматин умеренной плотности, цитоплазма с мелкой ячеистостью. Также клетки вплотную прилегают к кровеносным капиллярам дольки печени (рис. 3.12, см. цв. вклейку).

Хроническое отравление белых крыс четыреххлористым углеродом приводит к выраженным воспалительным процессам в печени, почках и селезенке. Воспалительный процесс в печеночной ткани сопровождается разрастанием междольковой соединительной ткани, скоплениями лимфоидной ткани в соединительнотканых структурах и особенно по ходу кровеносных сосудов печени, отмечаются нарушения кровообращения в печеночной ткани в виде венозного стаза, периваскулярного отека и деструктивно-дегенеративных процессов в гепатоцитах. После воздействия на экспериментальных животных четыреххлористым углеродом и развития у них модели цирроза печени была проведена трансплантация эмбриональных гепатоцитов (гомогенат печени эмбрионов) взрослым крысам через воротную вену. На 10-е, 20-е, 30-е, 40-е, 50-е, 60-е и 70-е сутки после операции проводились морфологические исследования печени и селезенки экспериментальных животных. Параллельно производили гистохимические исследования для определения функциональной активности гепатоцитов.

Уже через 10 суток после трансплантации эмбриональных гепатоцитов морфологические признаки цирроза печени становятся менее выраженными, а через 20–30 суток исчезают полностью, и печень приобретает нормальное морфологическое строение. Также установлено, что с 10-х суток эксперимента в дольках печени появляются одиночные клетки, расположенные в периваскулярной зоне. Они характеризуются высокой функциональной активностью. Для них характерны базофильность цитоплазмы, частые митотические деления и двухъядерность клеток. В последующие сроки эксперимента количество подобных клеток увеличивается, они выстраиваются в клеточные тяжи гепатоцитов печени или располагаются большими скоплениями в дольках печени. В то же время в просвете междольковых вен печени выявляются довольно большие скопления гепатоцитов. Они распола-

гаются в виде клеточных тяжей, формируя печеночные балки, некоторые из них митотически делятся.

Таким образом, результаты морфологических и гистохимических исследований свидетельствуют о миграции эмбриональных гепатоцитов при их попадании в долики печени через щелевидные пространства синусоидных капилляров. Эти клетки делятся митозом и постепенно внедряются в дольку печени, участвуя в образовании печеночных пластинок, или формируют скопления развивающихся клеток внутри долек печени. Одновременно происходит рост и развитие гепатоцитов в просвете междольковых вен, которые в дальнейшем постепенно внедряются в паренхиму печени.

Таким образом, экспериментальное исследование позволило заключить:

1. Пункционная имплантация гомогената эмбриональной печеночной ткани по разработанному методу является эффективным способом пересадки гепатоцитов.
2. Пересаженные в здоровую печень эмбриональные гепатоциты обладают высокой регенерирующей способностью и создают новые популяции функционально активных «зрелых» гепатоцитов.
3. В экспериментальной модели цирроза печени пересаженные эмбриональные гепатоциты создают устойчивые пролиферирующие ростки новой здоровой ткани, компенсируя недостаток объема и функциональной активности поврежденных гепатоцитов реципиента.
4. Пересаженные эмбриональные гепатоциты, по данным морфологических и цитохимических исследований, не вызывают серьезных патологических реакций в печени и организме в целом.

3.4. Аутологичная клеточная терапия хронических гепатитов и цирроза печени в клинической практике

Экспериментальное исследование с созданием моделей острого и хронического повреждения печени путем интоксикации подопытных животных четыреххлористым углеродом показало значительное ускорение регенерации печени при применении клеточных культур из фетальной печени.

Но из-за отсутствия достаточного количества клинических исследований, доказывающих эффективность и безопасность клеточной терапии, широкого распространения данная методика в настоящее время не получила.

Кроме того, использование фетальных клеток человека в клинической практике резко ограничено из-за отсутствия законодательной ба-

зы, регулирующей этот метод клеточной терапии. Поэтому использование регенеративных возможностей стволовых клеток собственного организма у больных с циррозом печени становится, возможно, единственным и эффективным направлением терапии заболевания.

Об успешном клиническом опыте трансплантации мобилизованных аутологичных гемопоэтических стволовых клеток для лечения больных с циррозом печени сообщают как зарубежные, так и отечественные исследователи.

Большинство исследователей, занимающихся этой проблемой, утверждают, что при однократном введении клеточной культуры в портовую систему эффективность метода носит кратковременный характер (от 3 до 6 месяцев), а более стойкий и длительный терапевтический эффект достигается при использовании повторных курсов ауто-трансплантации.

Однако до настоящего времени отсутствует как единая общепринятая методика данного вида клеточной терапии, так и показания к ее проведению.

Целью настоящего исследования явилась оценка клинической эффективности методики аутологичной трансплантации клеточных культур костного мозга у больных циррозом печени.

В исследование были включены 32 больных с циррозом печени (19 мужчин, 13 женщин) в возрасте от 17 до 56 лет, которым проводилась аутоотрансплантация клеточных культур, стимулированных и выделенных из собственного костного мозга в условиях отделения мини-инвазивной абдоминальной и реконструктивно-пластической хирургии Клинической больницы скорой медицинской помощи Уфы за период с 2004 по 2007 г.

Диагностика цирроза печени проводилась на основании общеклинических признаков, данных биохимических и дополнительных методов исследования, включая ФЭГДС, УЗИ органов брюшной полости, доплерографию сосудов, компьютерную томографию, пункционную биопсию печени и лапароскопию с биопсией печени.

В соответствии с клинической классификацией Чайльда-Пью цирроз печени класса А диагностировался у 8 (25%), класса В — у 18 (56,2%) и класса С — у 6 (18,8%) больных.

Причинами заболевания у 17 (53,1%) больных являлись хронические вирусные гепатиты (В, С или сочетанные варианты), у 8 (25%) — алкогольный гепатит, у 4 (12,5%) — гепатиты смешанной этиологии (вирусный + алкогольный) и у 3 (9,4%) — другой этиологии (аутоиммунный, криптогенный).

Критериями включения в разработку являлись наличие клиники цирроза печени, подтвержденного гистологическим исследованием, возраст не старше 65 лет, информированное согласие больного и решение этического комитета ученого совета БГМУ. Из исследования ис-

ключались больные с циррозом печени в стадии декомпенсации (застойный цирроз печени; кардиальный), с осложненными формами цирроза печени (геморрагический синдром, сердечно-сосудистая и легочная недостаточность).

Выделение из периферической крови мононуклеарных клеток костного мозга проводилось путем лейкофереза сепаратором Cobe Spectra после их предварительной стимуляции с использованием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) в дозе 1 млн ЕД на 1 кг веса. План исследования предполагал внутривенную инфузию препарата в течение трех дней. После завершения введения препарата проводился лейкоферез сепаратором крови Cobe Spectra. В условиях проблемной научно-исследовательской лаборатории трансплантологии проводился сбор CD34⁺-фракции, подсчет количества и определение жизнеспособности мононуклеарных клеток и разделение ее на две части. Одна часть фракции направлялась в операционную для аутотрансплантации, вторая часть хранилась в криобанке для трансплантации в более отдаленные сроки. Эффективность мобилизации ГСК у пациентов составила в среднем 2,2 млн мононуклеарных клеток на 1 кг веса.

Аутологичная трансплантация клеточной фракции в портальную систему проводилась через реканализированную пупочную вену круглой связки печени 20 пациентам из мини-лапаротомного доступа в правом подреберье; в 12 случаях из-за неэффективности реканализации — в вены большого сальника, в т. ч. желудочно-ободочные вены, при этом использовалось общее обезболивание.

В сроки после шести месяцев всем пациентам проведен повторный курс аутотрансплантации криозамороженной фракции в портальную систему путем катетеризации вен большого сальника: у 12 больных — с использованием лапароскопического способа, у 18 больных — с использованием мини-лапаротомного доступа, в 2 случаях — в паренхиму печени, пункционно, под ультразвуковой навигацией. Объем вводимого курсового клеточного материала составил в среднем 50 млн клеток.

В качестве интегрального показателя тяжести состояния вычисляли сумму баллов по шкале Child-Pugh, включающей оценку уровня альбумина, общего билирубина, протромбинового индекса, наличие асцита, выраженности энцефалопатии и астенического синдрома.

Больные после проведения первичной и повторной аутотрансплантации клеток находились под диспансерным наблюдением и проходили обследование через 3, 6, 12 и 24 месяца после операции.

Введение аутологичных клеток костного мозга не сопровождалось развитием выраженных побочных реакций. Повышение температуры тела до субфебрильных и фебрильных цифр отмечено у четырех больных.

Клинико-лабораторные показатели после повторной трансплантации аутологичных клеток костного мозга в динамике

Показатель	До аутотрансплантации	После аутотрансплантации		
		Через 3 мес.	Через 6 мес.	Через 12 мес.
Альбумин, г/л	38,0±1,3	43,4±2,2*	46,8±2,7*	41,6±1,5
Общий билирубин, мкмоль/л	46,0±3,6	25,5±3,1**	26,7±4,5*	24,8±3,9*
АлАТ, ммоль/ч х л	1,90±0,24	0,90±0,24*	1,30±0,33*	1,10±0,21*
АсАТ, ммоль/ч х л	1,20±0,14	0,68±0,16*	1,03±0,18	0,87±0,14
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	160±32	129±22	122±23	146±17
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	123±12	173±20*	168±17*	135±14
Диаметр воротной вены, мм	15,5±0,7	14,8±0,4	13,9±0,2	13,5±0,6
Диаметр селезеночной вены, мм	12,6±0,5	11,8±0,4	10,5±0,6	11,7±0,7
Размеры селезенки, мм	146х68	134х61	137х66	138х72
Астенический синдром, баллы	5,4±0,34	2,7±1,14*	1,6±0,61**	1,8±0,45**
Child-Pugh, баллы	7,2±0,31	6,3±0,28*	6,15±0,34*	6,0±0,21**

Примечание:

* < 0,05;

** < 0,01 по сравнению с состоянием до лечения

В двух случаях в раннем послеоперационном периоде был отмечен резкий подъем показателей билирубина, который продержался в течение двух недель и впоследствии получил обратное развитие до исходных цифр.

Результатом исследования больных с циррозом печени явилось улучшение клинических, лабораторных и инструментальных показателей, оцениваемых по шкале Child-Pugh. Наиболее стойкая ремиссия наблюдалась у пациентов преимущественно в группах А и В.

Наиболее выраженным клиническим эффектом являлось снижение астенического синдрома. К концу второй недели все больные отмечали субъективное улучшение самочувствия. У них улучшился аппетит, нормализовался сон, повысился эмоциональный тонус. Стойкая стабилизация состояния больных была подтверждена биохимическими

показателями, данными ультразвукового исследования печени. Не наблюдалось нарастания явлений печеночной недостаточности. Отмечалось снижение интенсивности развития асцита.

Динамика биохимических показателей в послеоперационном периоде характеризовалась снижением активности печеночных ферментов АСТ и АЛТ, щелочной фосфатазы, уровня билирубина, возрастанием уровня общего белка.

Таким образом, введение клеток костного мозга в портальную систему способствовало уменьшению лабораторных признаков печеночно-клеточной недостаточности и холестаза.

Достоверное сокращение размеров селезенки и печени, а также диаметров их сосудов мы наблюдали в 18 случаях после повторной аутотрансплантации клеточной культуры. При УЗИ брюшной полости мы наблюдали снижение объема свободной жидкости в брюшной полости у 7 пациентов и полное исчезновение в 2 случаях. Полученные данные свидетельствуют, что отмечается снижение признаков портальной гипертензии. Стабилизация состояния больных проявлялась значительным снижением частоты осложнений со стороны желудочно-кишечного тракта. Наблюдалось кровотечение из ВРВ у одного больного после аутотрансплантации клеточной культуры, гемостаз достигнут лигированием сосудов. У остальных больных эпизоды кровотечения не отмечены.

Необходимо отметить, что улучшение состояния у большинства больных носило временный характер и в среднем его продолжительность составила от 6 до 12 месяцев. Проведенные клинико-лабораторные данные свидетельствуют о том, что через 12 месяцев после повторной трансплантации показатели биохимических анализов крови у 28 (87,5%) больных возвращались к исходным данным. На настоящее время у 4 (12,5%) больных с алкогольным циррозом печени прогрессирование патологического процесса не отмечено, наблюдается регресс болезни.

Таким образом, результаты проведенного нами исследования позволяют утверждать о наличии явной клинической эффективности и перспективности этого высокотехнологичного направления в лечении цирроза печени и сделать соответствующие выводы:

1. Аутологичная клеточная терапия является одним из эффективных альтернативных методов лечения цирроза печени.
2. Результаты исследования свидетельствуют о воспроизводимости и безопасности процедуры мобилизации, лейкофереза и реинфузии моноклеарных клеток костного мозга в портальную систему у больных с тяжелыми стадиями цирроза печени.
3. Более эффективным является применение клеточной терапии в виде курсовых повторных аутотрансплантаций криоконсервированной фракции моноклеарных клеток.

4. Перспективной представляется разработка неинвазивного метода клеточной терапии путем пункционной трансплантации клеточной фракции в паренхиму печени под ультразвуковой навигацией.

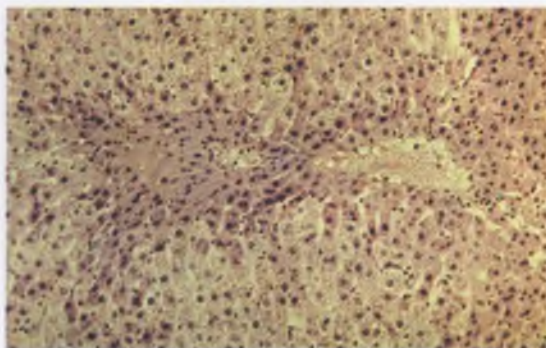


Рис. 3.1. Печень крысы. Распад гепатоцитов с образованием жиробелкового детрита. Через 10 дней после пересадки эмбриональных гепатоцитов (без модели цирроза). Окраска гематоксин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

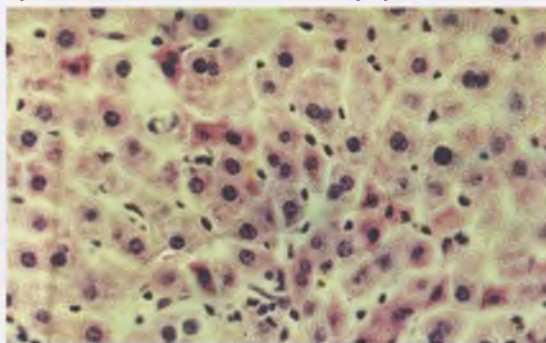


Рис. 3.2. Печень крысы. Интенсивно окрашенные гепатоциты. Через 20 дней после пересадки эмбриональных гепатоцитов (без модели цирроза). Окраска гематоксин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

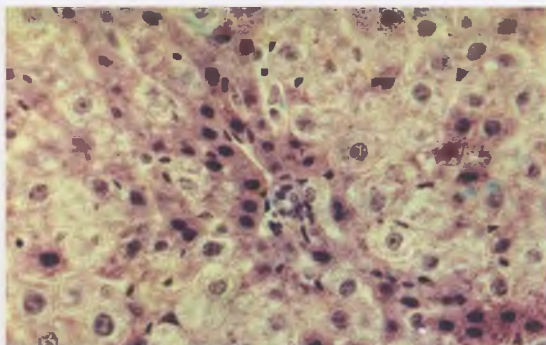


Рис. 3.3. Печень крысы. Кисточные тяжи с большей окрашиваемостью. Через 20 дней после пересадки эмбриональных гепатоцитов (без модели цирроза). Окраска гематоксин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

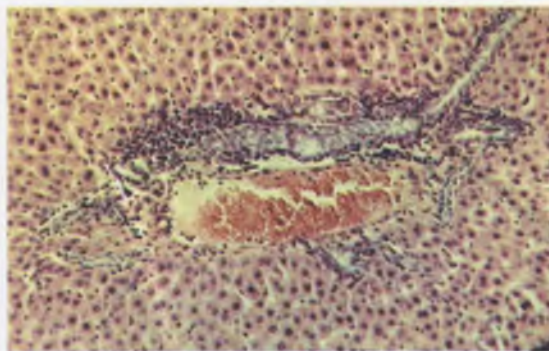


Рис. 3.4. Печень крысы. Небольшое скопление лимфоидной ткани в периваскулярной зоне триады печени. Через 20 дней после пересадки эмбриональных гепатоцитов (без модели цирроза). Окраска гематоксилин-эозин. Микрофото, ок. 10, об. 20

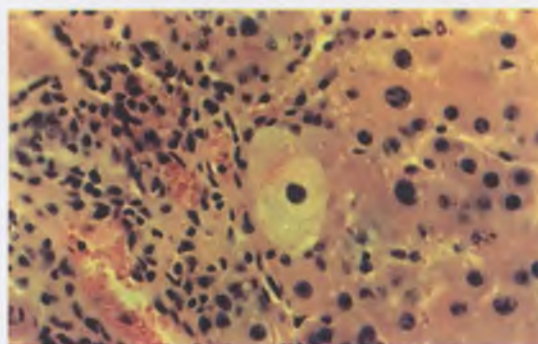


Рис. 3.5. Печень крысы. Модель цирроза (затравка CCl_4). Дистрофия гепатоцитов. Гематоксилин-эозин. Микрофото, ок. 10, об. 40

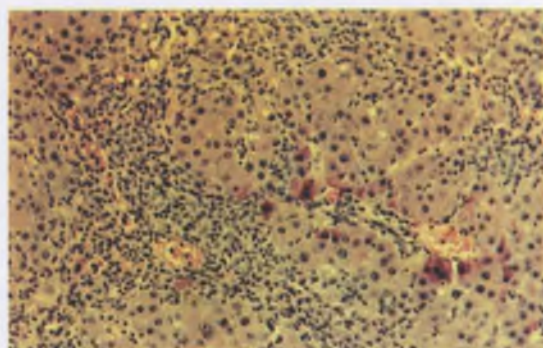


Рис. 3.6. Печень крысы с моделью цирроза. Очаги базофильных гепатоцитов через 10 дней после трансплантации гепатоцитов эмбриона. Гематоксилин-эозин. Микрофото, ок. 10, об. 20

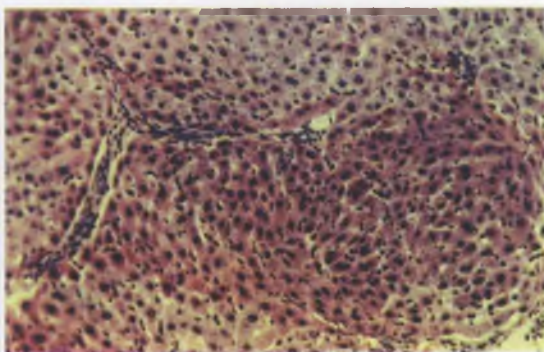


Рис. 3.7. Печень крысы с моделью цирроза. Большое скопление интенсивно окрашенных гепатоцитов в дольке печени через 20 дней после трансплантации гепатоцитов эмбриона. Гематоксилин-эозин. Микрофото, ок. 10, об. 20

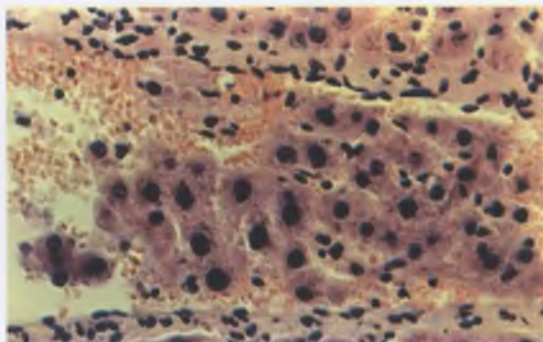


Рис. 3.8. Печень крысы с моделью цирроза. Изолированное расположение группы гепатоцитов в просвете кровеносного сосуда через 20 дней после трансплантации гепатоцитов эмбриона. Гематоксилин-эозин. Микрофото, ок. 10, об. 40

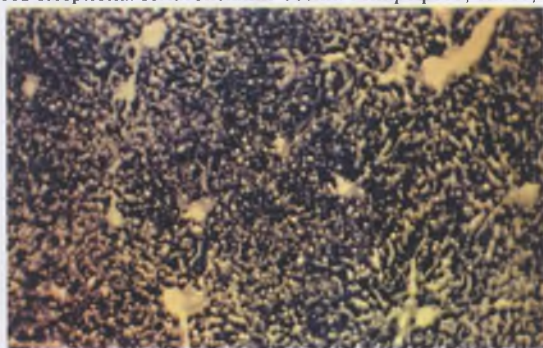


Рис. 3.9. Гистохимическое исследование. Печень крысы с моделью цирроза. Высокая активность сукцинатдегидрогеназы в гепатоцитах через 20 дней после трансплантации гепатоцитов эмбриона. Реакция Нахласа. Микрофото, ок. 10, об. 40

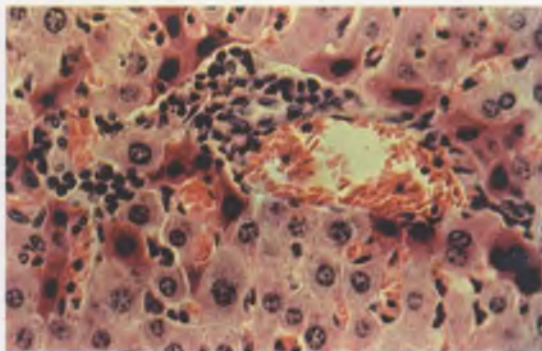


Рис. 3.10. Печень крысы с моделью цирроза. Полигональной формы гепатоциты вокруг междольковой вены печени через 30 дней после трансплантации гепатоцитов эмбриона. Гематоксилин-эозин. Микрофото, ок. 10, об. 40

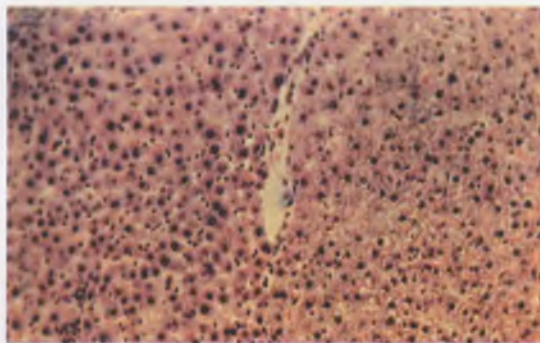


Рис. 3.11. Печень крысы с моделью цирроза. Большое скопление интенсивно окрашенных гепатоцитов, занимающих часть дольки печени, через 40 дней после трансплантации гепатоцитов эмбриона. Гематоксилин-эозин. Микрофото, ок. 10, об. 20

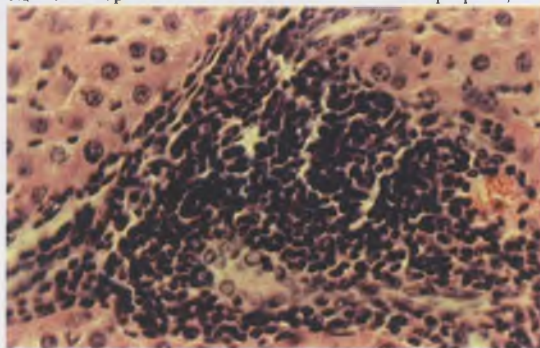


Рис. 3.12. Печень крысы с моделью цирроза. Скопление лимфоцитов вокруг триады печени через 50 дней после трансплантации гепатоцитов эмбриона. Гематоксилин-эозин. Микрофото, ок. 10, об. 40

Глава 4.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВЫХ ТРАВМ

4.1. Возможности использования стволовых клеток в неврологической и нейрохирургической практике: состояние вопроса

Нервные клетки не восстанавливаются — в течение многих десятилетий эта точка зрения считалась единственно правильной. Предполагалось, что человек умирает с таким же количеством нейронов, сколько у него было после рождения. За последние 40 лет взгляд на этот вопрос изменился кардинально. В настоящее время установлено, что нейрогенез в определенных зонах мозга продолжается в течение всей жизни человека, однако его интенсивность снижается с возрастом. Это показано в исследованиях, в ходе которых были обнаружены активные стволовые клетки в гиппокампе и субвентрикулярной зоне латеральных желудочков (Пальцев М.А., Суких Г.Т., 2009). Согласно существующей в настоящее время концепции, стволовые клетки обладают уникальными для человеческого организма свойствами: способностью к пролиферации, самоподдержанию собственного пула в результате асимметричного деления и дифференцировки в различные типы клеток. Кроме того, все стволовые клетки экспрессируют на поверхности плазматической мембраны специфические маркеры, которые помогают в определении типа клеток. В организме человека присутствуют стволовые клетки различных типов, которые, однако, обладают общими для всех стволовых клеток свойствами (Корочкин Л.И., 2003; Репин В.С., 2003). Исторически необходимость сохранения клеток пуповинной крови была продиктована желанием избежать трансплантации костного мозга при онкогематологических заболеваниях. К 2007 г. в мире проведено более 8 тыс. успешных трансплантаций пуповинной крови. Возникли государственные и частные компании, сохраняющие концентрат клеток пуповинной крови. Государственные банки клеток пуповинной крови аналогичны регистрам костного мозга, с той лишь разницей, что клетки заморожены и готовы к использованию в любой момент. Кроме того, пуповинная кровь как источник гемопоэтических клеток для трансплантации имеет ряд других преимуществ перед кост-

ным мозгом и стволовыми клетками периферической крови: допустимость неполного соответствия донора и реципиента по системе HLA и меньшая вероятность развития болезни «трансплантат против хозяина» (Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А., 1980; Онищенко Н.А., 2002; Волков А.В. с соавт., 2006). В настоящее время исследователями предпринимаются попытки расширить границы использования клеток пуповинной крови, в том числе применить их для лечения негематологических заболеваний. Это связано с тем, что пуповинная кровь является доступным материалом, из которого можно получить достаточное количество клеток за короткий период: только в России в год происходит более 1,5 млн родов, причем при рождении ребенка пуповину, а вместе с ней и пуповинную кровь уничтожают. Фактически пуповинная кровь является неисчерпаемым источником стволовых клеток. Технологичность получения образцов пуповинной крови также способствует расширению ее применения как наиболее оптимального источника клеток. Важным моментом является то, что клетки, полученные из пуповинной крови, не нужно культивировать: в любом образце пуповинной крови стволовых клеток достаточно для их внутривенного введения (Берсенов А.В. с соавт., 2006; Румянцев А.Г., Масчан А.А., 2002). Широкий регенеративный потенциал стволовых клеток пуповинной крови может быть обусловлен существованием в ней нескольких популяций клеток с различными спектрами плюрипотентных свойств. К ним помимо гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) относятся мезенхимальные стволовые клетки (МСК), неограниченно делящиеся соматические стволовые клетки (USSC), мультипотентные стволовые клетки (MPSC), мультипотентные взрослые клетки-предшественники (МАРС), эмбриональноподобные стволовые клетки (ES-like) и эндотелиальные клетки-предшественники (ЕРС). Рядом авторов на экспериментальных моделях установлено, что клетки пуповинной крови способны стимулировать регенерацию ткани мозга. В последние годы количество таких исследований значительно увеличилось. К настоящему моменту регенеративные свойства клеток пуповинной крови подтверждены в экспериментах на животных с моделями инсульта, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. Однако попытки использования клеток пуповинной крови с этой целью не предпринимались. В ходе экспериментальных исследований было показано, что положительный эффект клеток пуповинной крови при патологии нервной ткани связан с тремя основными механизмами. Во-первых, эти клетки способствуют повышению активности нейрогенеза; данный процесс включает активацию эндогенных стволовых клеток мозга. Во-вторых, под действием клеток пуповинной крови происходит активация ангиогенеза, что способствует восстановлению кровообращения и, следовательно, функции пораженного органа. В-третьих, большое значение имеет способность клеток пуповинной крови подавлять воспалительный процесс

в нервной ткани, что особенно важно, так как ее воспаление занимает одно из ведущих мест в патогенезе многих неврологических заболеваний. В ряде исследований на животных установлено, что введенные внутривенно меченые клетки пуповинной крови не проходят через гематоэнцефалический барьер. Их эффекты связаны с секрецией клетками паракринных трофических факторов, воздействующих на поврежденные структуры. К таким факторам относятся нейротрофические (нейромодуляторные) факторы: BDNF — мозговой нейротрофический фактор; NGF — фактор роста нервов; нейротрофины 3, 4, 5; GDNF — глиальный нейротрофический фактор и ряд других. Паракринные эффекты данных факторов включают активацию нейрогенеза в нервной ткани, способствуя возникновению новых нейронов, олигодендроцитов и астроцитов, подавление апоптоза нервных клеток, стимуляцию миграции эндогенных стволовых клеток мозга. Благодаря именно этим эффектам усиливается регенерация поврежденных структур и происходит восстановление утраченных функций. В экспериментах на животных моделях и клинических исследованиях показано, что развитие некоторых неврологических заболеваний напрямую связано с изменением активности нейрогенеза в гиппокампе. Значительное подавление нейрогенеза в гиппокампе наблюдается при болезни Альцгеймера, шизофрении, алкогольной зависимости и наркозависимости, депрессии. При нормальном старении головного мозга активность нейрогенеза в гиппокампе также снижается. К настоящему времени эффективность клеток пуповинной крови в неврологии доказана в экспериментах на животных с моделями инсульта, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. В предварительных клинических исследованиях подтверждена безопасность применения клеток пуповинной крови при лечении пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона, детским церебральным параличом, шизофренией и посттравматическими энцефалопатиями. Во всех случаях отмечались определенные положительные сдвиги в течении основного заболевания. Установлено, что на животных с моделью инсульта клетки пуповинной крови оказывают выраженное положительное действие и способствуют восстановлению утраченных функций (по результатам когнитивных и моторных тестов) и уменьшению зоны повреждения. Основываясь на этих данных, можно надеяться, что использование клеток пуповинной крови окажется эффективным при лечении пациентов с ишемическим инсультом. Кроме того, учитывая все вышеизложенное, можно считать целесообразным исследование эффективности и безопасности применения клеток пуповинной крови в лечении таких неврологических заболеваний, как рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, хроническая ишемия головного мозга, хронические вегетативные состояния, а также в лечении черепно-мозговых травм различной степени тяжести.

Черепно-мозговая травма продолжает оставаться в центре внимания исследователей в нашей стране и за рубежом. В настоящее время пациенты с черепно-мозговой травмой составляют 50,9–61,3% всех больных нейрохирургических отделений (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000; Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Nakenaka Y. et al., 1991; Waltregny A. et al., 1989). Несмотря на накопленный опыт лечения больных с тяжелыми черепно-мозговыми травмами, существующие в настоящее время методы лечения зачастую не дают желаемых результатов. Уровень летальности при данной патологии составляет, по данным литературы, от 20,4 до 32,9% (Зотов Ю.В. с соавт., 1999). Неполноценное восстановление функций центральной нервной системы приводит к инвалидизации 70,1% больных (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000; Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Palm D. et al., 1995; Peruche B. et al., 1993; Pomfy M. et al., 1995).

В литературе имеются работы, в которых в той или иной степени отражены вопросы диагностики и хирургического лечения травматических очагов ушиба-размозжения головного мозга. Накопленные к этому времени сведения по патоморфологии контузионных очагов и очагов размозжения свидетельствуют о расширении зоны некроза в первые часы и сутки после травмы (Низковолос В.Б. с соавт., 1999). Глубокие обменно-сосудистые и ферментативные нарушения в области очагов травматической деструкции приводят к общим ангиотрофическим нарушениям, генерализации перифокального отека и дислокации мозга (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000; Луцик А.А. с соавт., 1999). В современной литературе обоснована активная хирургическая тактика в отношении очагов ушиба-размозжения головного мозга (Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Луцик А.А. с соавт., 1999).

Существующие оперативные вмешательства включают в себя операции, направленные на устранение компрессии головного мозга, удаление мозгового детрита, дренирование желудочковой системы и активное дренирование зоны размозжения (Григорович К.А., 1977; Зотов Ю.В. с соавт., 1999).

Несмотря на столь активную тактику хирургического лечения, летальность при тяжелых черепно-мозговых травмах остается высокой (Гурвич А.М. с соавт., 1996; Зотов Ю.В. с соавт., 1999).

В последнее время началась интенсивная разработка и активное внедрение в клиническую практику нового метода реконструктивной нейрохирургии — трансплантации эмбриональной нервной ткани. Цель данного метода — найти возможные пути коррекции нарушенных функций центральной нервной системы, возникших в результате выраженных патологических изменений. Возможность приживления, роста и дифференцировки трансплантированного неокортекса доказали многие экспериментальные исследования как у нас в стране, так и за рубежом (Отеллин В.А., 1990, 1992, 1998, 1999; Sykорова J. et al., 1988; Subrt O. et al., 1991).

С 1985 г. в клиниках разных стран мира были предприняты первые попытки нейротрансплантации эмбриональной ткани при лечении больных паркинсонизмом. Полученные первые результаты позволили предположить положительный эффект после нейротрансплантации (Виноградова О.С., 1988; Малышев И.И., 1988; Отеллин В.А., 1990; Отеллин В.А. с соавт., 1990, 1995; Sykova J. et al., 1988). Нейробиологические исследования последних лет убедительно свидетельствуют о возможности восстановления нарушенных болезнью функций мозга посредством пересадок эмбриональной нервной ткани. В экспериментах доказано, что пересаженная эмбриональная нервная ткань способна развиваться в мозге реципиента, ее клеточные элементы пролиферируют, дифференцируются и интегрируют с мозгом реципиента (Бобрышев Ю.В. с соавт., 1989; Козлова Е.Н., 1990; Корзенев А.В. с соавт., 1991). Пересаженные нейроны способны реиннервировать ближайшие участки мозга, формируя синаптические и несинаптические контакты с нервными клетками реципиентов. Нейроны трансплантатов обнаруживают спонтанную активность, высвобождают присущие им медиаторы, трофические и ростовые факторы. Эти биологически активные вещества способны индуцировать активацию внутриклеточных процессов, экспрессию генов и возбуждение нейронов реципиентов (Виноградова О.С., 1988, 1993, 1995; Шрамка М. с соавт., 1994; Шустин В.А. с соавт., 1998). Все эти механизмы взаимодействия клеток трансплантата и реципиента делают возможным создание новых и реконструкцию поврежденных внутримозговых систем, способных возместить функциональный дефицит, и являются основанием для клинического использования метода.

В последние несколько лет находят развитие работы, направленные на расширение круга заболеваний, в лечении которых используется пересадка эмбриональной нервной ткани. В литературе есть сведения о применении нейротрансплантации при посттравматических и ишемических повреждениях ЦНС, детском церебральном параличе, ряде атрофических процессов, при наличии эписиндрома и генетических дефектов развития мозга (Бехтерева Н.П. с соавт., 1990; Воробьева Т.М., 1996; Савельев С.В. с соавт., 1994; Шабалов В.А. с соавт., 1995; Шрамка М. с соавт., 1993; Freeman T.B. et al., 1995; Marciano F.F. et al., 1989).

Практически все проведенные исследования, связанные с трансплантацией эмбриональной нервной ткани, основаны на регистрации электрофизиологических параметров мозга реципиента до и после трансплантации, а также наблюдении за динамикой восстановления поведенческих реакций, других функций мозга и уменьшением выраженности патологических проявлений. Выраженная положительная клиническая и электрофизиологическая динамика косвенно свидетельствует о приживлении и благотворном влиянии трансплантата на мозг реципиента (Шустин В.А. с соавт., 1998; Freed C.R. et al., 1990).

Сведения, касающиеся применения нейротрансплантации эмбриональных тканей в очаги травматической деструкции головного мозга, немногочисленны и не отвечают на ряд наиболее важных вопросов. В первую очередь практически не изучена динамика процесса приживания трансплантата на гистоморфологическом уровне. Мы не встретили в доступной в настоящее время литературе сведений о морфологических доказательствах формирования взаимодействий между клетками трансплантата и реципиента в очаге. Отсутствуют гистологические исследования, посвященные изучению судьбы пересаженных при трансплантации стволовых клеток нервной ткани. Установлено, что трансплантат способствует восстановлению утраченных функций мозга за счет стимуляции регенерации нейронов из зоны паранекроза (Овечко В.Н., 1995; Dunnett S.B., 1993). В то же время отсутствуют морфологические доказательства возможного участия дифференцирующихся клеток трансплантата в формировании новых систем. Практически не освещены в литературе возможности трансплантации криоконсервированных эмбриональных нервных тканей.

Актуальность проблемы поиска новых эффективных методов лечения тяжелых черепно-мозговых травм, многообещающие возможности нейротрансплантации эмбриональных тканей, множество нерешенных вопросов и отсутствие четких морфологических доказательств эффективности предложенной методики побудили нас заняться данным исследованием.

4.1.1. Актуальность проблемы лечения тяжелой черепно-мозговой травмы

Черепно-мозговая травма в настоящее время остается в центре внимания исследователей в нашей стране и за рубежом. Доля больных с тяжелой черепно-мозговой травмой среди пациентов нейрохирургических отделений неуклонно растет и составляет в настоящее время, по литературным данным, 50,9–61,3% (Зотов Ю.В. с соавт., 1999). Большинство больных с ЧМТ — лица трудоспособного возраста. Уровень летальности при данной патологии составляет, по данным литературы, от 20,4 до 32,9% (Рябов Г.А., 1994). Неполноценное восстановление функций центральной нервной системы приводит к инвалидизации 70,1% больных (Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Рябов Г.А., 1994).

Несмотря на накопленный опыт лечения больных с тяжелыми черепно-мозговыми травмами, существующие в настоящее время методы лечения зачастую не дают желаемых результатов (Гурвич А.М., 1987; Гурвич А.М. с соавт., 1996, 1999; Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Пермяков Н.К. с соавт., 1986, 1998). Прогноз для больных с тяжелой черепно-мозговой травмой зависит от множества факторов. В первую очередь имеет значение локализация и объем травматического повреждения го-

лового мозга (Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Рябов Г.А., 1994). Существенное влияние на исход лечения оказывают особенности течения острого периода (в первые часы и сутки после травмы), когда происходит расширение зоны некроза (Аничков А.Д. с соавт., 1999; Релин В.С. с соавт., 1998; Рябов Г.А., 1994). Тяжелая ЧМТ обуславливает существенное и продолжительное (до 6 месяцев) повышение активности ПОЛ в крови и тканях головного мозга (Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Kil H.Y. et al., 1996; Mitsuo Y. et al., 1993; Richmond T.S., 1997; Rosemary M.L., 1997; Takenaka Y. et al., 1991; Yokota M. et al., 1999; Yoshimoto T. et al., 1999). При этом наблюдается несколько максимумов активации этого процесса: через 1, 7 и 120 суток. Глубокие обменно-сосудистые и ферментативные нарушения в области очагов травматической деструкции приводят к общим ангиотрофическим нарушениям, генерализации перифокального отека и дислокации мозга (Алексеева Г.В. с соавт., 1997; Кармян А.И., 1990; Таюшев К.Г., 1993; Шустин В.А. с соавт., 1997; Шустин В.А. с соавт., 1998; Krack P. et al., 1998; Kumar K. et al., 1997).

В значительной степени исход ЧМТ зависит от выбора метода ее лечения. В современной литературе обоснована активная хирургическая тактика в отношении очагов ушиба-размозжения головного мозга. Существующие оперативные вмешательства включают в себя операции, направленные на устранение компрессии головного мозга, удаление мозгового детрита, дренирование желудочковой системы и активное дренирование зоны размозжения. Несмотря на столь активную тактику хирургического лечения, летальность в остром периоде тяжелых черепно-мозговых травм остается высокой (Алексеева Г.В., 1996; Алексеева Г.В. с соавт., 1996, 1999; Ризковолос В.Б. с соавт., 1999).

Не менее сложной является проблема профилактики и лечения отдаленных последствий тяжелой ЧМТ. В раннем послеоперационном периоде традиционно назначается комплексная дегидратационная, детоксикационная, инфузионная, противовоспалительная, гемостатическая, противосудорожная, седативная, симптоматическая терапия (Божков Ю.Г. с соавт., 1999; Неговский В.А. с соавт., 1999; Shin S.M. et al., 1994). Однако, несмотря на множество подходов, консервативное лечение некоторых состояний мозга, связанных с нейродеструкцией, выпадением функций, формированием устойчивых патологических систем (эпилептизация мозга), нельзя признать достаточно эффективным (Болякина Г.А. с соавт., 1997; Боттаев Н.А., 1999). Селективное повреждение определенных зон мозга приводит к необратимому выпадению значительного количества нейронов и выраженной реорганизации межнейронных взаимоотношений в сохранившихся нейронных сетях с появлением патологических систем мозга. Часто нейродеструктивный процесс прогрессирует и не может быть остановлен традиционными лекарственными средствами (Juurlink B.H. et al., 1997; Kihlstrom L. et al., 1995). Отсутствуют веские доказательства полной

коррекции патологических доминантных систем мозга под влиянием известных препаратов, высок процент рецидивов, особенно при неадекватном лечении больных (Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Madrazo I. et al., 1991; Marion D.W. et al., 1996). После формирования устойчивой патологической системы мозга с помощью обычных препаратов, очевидно, невозможно разорвать нейронные сети этой системы. Кроме того, при применении препаратов, стимулирующих пластичность нейронов, общность синаптических механизмов формирования функциональных и патологических систем мозга приводит к стабилизации и распространению патологических систем мозга (Алексеева Г.В. с соавт., 1997; Lippitz B.E. et al., 1999; Lundberg C. et al., 1996).

Статистика по лечению больных посттравматической эпилепсией свидетельствует о том, что на фоне приема противоэпилептических препаратов ремиссия (отсутствие припадков в течение пяти лет) наблюдается у 36% больных, рецидивы — у 20% (Алексеева М.А. с соавт., 1999). У 51% больных отмечается резистентность к противоэпилептическим препаратам (Зотов Ю.В. с соавт., 1999). Кроме того, длительный прием противоэпилептических препаратов приводит к нарушению пластических, биоэнергетических процессов, гипертрофии глии, патологическим изменениям нейронов в головном мозге, повреждению хромосом, изменениям иммунологического статуса, появлению тератогенных факторов (Зотов Ю.В. с соавт., 1999; Подачин В.П., 1974, 1990). Антиконвульсанты оказывают неблагоприятное влияние на мышление, эмоциональные и психомоторные реакции, а также на процессы восприятия. Хирургическое лечение эпилептических состояний касается в основном парциальной эпилепсии и неприменимо для постаноксической коррекции эпилептического синдрома (Peguche V. et al., 1993; Quinn N.P., 1990). Все это затрудняет реабилитацию больных с посттравматической и постаноксической энцефалопатией.

В некоторых работах подчеркиваются отрицательные стороны фармакологической профилактики посттравматической и постаноксической эпилептизации мозга, обусловленные нейротоксическим, тератогенным и даже эпилептогенным действием противоэпилептических препаратов, применение которых в ряде случаев само приводит к развитию энцефалопатии токсической природы (Берснев В.П. с соавт., 1997, 1999; Andrus P.A. et al., 1994; Gill R. et al., 1992; Gilland E. et al., 1994).

Таким образом, неудовлетворительные результаты традиционных методов лечения тяжелых ЧМТ, несовершенство фармакологической коррекции посттравматического выпадения нейронов, функций мозга и эпилептических состояний искусственными лекарственными препаратами требуют дальнейшего поиска естественных соединений организма, обладающих нейропротекторным и модулирующим эффектом.

4.1.2. Современные направления применения эмбриональной нервной ткани в лечении патологии центральной нервной системы

В последнее время проводится интенсивная разработка и активное внедрение в клиническую практику нового метода реконструктивной нейрохирургии — трансплантации эмбриональной нервной ткани. Цель данного метода — найти пути коррекции нарушенных функций центральной нервной системы, возникших в результате ее повреждения.

Возможность приживления, роста и дифференцировки трансплантированных фрагментов эмбриональной нервной ткани доказали многие экспериментальные исследования как у нас в стране, так и за рубежом (Отеллин В.А. с соавт., 1990, 1992, 1995, 1998; Савельев С.В., 1992; Subrt O. et al., 1991; Sykорова J. et al., 1988).

Важным направлением клеточной трансплантации, позволяющим использовать высокий потенциал естественных нейротрофакторов и нейротрофинов, является имплантация специально подготовленных для этих целей моно- или поликлеточных смесей и введение различных вытяжек эмбриональной нервной ткани, содержащих биологически активные вещества, в ткань мозга, желудочки, субарахноидальное пространство для осуществления общего и локального нейротрофического, нейротрофического, модулирующего эффекта (Журавлева З.Н., 1999; Шабалов В.А. с соавт., 1995; Cuevas P. et al., 1998; Ferrara N. et al., 1988; Kordower J.H. et al., 1995; Lindvall O., 1995).

Трансплантация нервных и других видов клеток, содержащих естественные анальгетики (катехоламины, опиоиды, нейротрофические факторы), в субарахноидальное пространство применяется для купирования хронической устойчивой боли (Ffench-Constant C. et al., 1994; Fischer F.J., 1997; Fisher L.J. et al., 1993; Foster G.A. et al., 1985).

С 1985 г. в клиниках разных стран мира были предприняты первые попытки нейротрансплантации эмбриональной ткани при лечении больных паркинсонизмом (Бехтерева Н.П. с соавт., 1990; Савельев С.В. с соавт., 1994; Шабалов В.А. с соавт., 1995; Шрамка М. с соавт., 1993, 1994). Полученные первые результаты позволили предположить положительный эффект после нейротрансплантации. Нейробиологические исследования последних лет убедительно свидетельствуют о возможности восстановления нарушенных болезнью функций мозга посредством пересадок эмбриональной нервной ткани. В экспериментах доказано, что пересаженная эмбриональная нервная ткань способна развиваться и функционировать в мозге реципиента, ее клеточные элементы пролиферируют, дифференцируются и интегрируются с мозгом реципиента, вызывая значительные улучшения в клиническом течении заболевания (Виноградова О.С., 1988, 1995; Виноградова И.Н., 1993; Шрамка М. с соавт., 1994; Шустин В.А. с соавт., 1998; Freed C.R. et al., 1990; Freed W.J., 1990).

В последние несколько лет находят развитие экспериментальные работы, направленные на расширение круга заболеваний, в лечении которых используется пересадка эмбриональной нервной ткани. В литературе есть сведения о применении нейротрансплантации при посттравматических и ишемических повреждениях ЦНС, сопровождающихся значительным дефицитом нейронов, детском церебральном параличе, ряде атрофических процессов, при наличии эписиндрома и генетических дефектов развития мозга (Благодатский М.Д. с соавт., 1994; Говенько Ф.С. с соавт., 1997; Кожурка В.Л., 1997, 1998; Кожурка В.Л. с соавт., 1999; Панченко Е.Л. с соавт., 1994).

Использование иммунодепрессантов и ретровирусов как проводников для введения генов при генной инженерии привело к тому, что многие нейродеструктивные заболевания мозга становятся объектом современной нейротрансплантологии (Gerszten P.C. et al., 1998). Несмотря на большое количество экспериментов при различной патологии ЦНС, клиническое использование нейротрансплантации ограничивается в настоящее время узким спектром заболеваний. Имеются сообщения об эффективном клиническом использовании нейротрансплантации для лечения болезни Гентингтона, синрингомиелии, наследственной атаксии Фридрейха, бокового амиотрофического склероза (Благодатский М.Д. с соавт., 1994; Воробьева Т.М., 1996; Freeman T.B. et al., 1991, 1995; Griffin W.S. et al., 1989; Marciano F.F. et al., 1989).

Трансплантация больших фрагментов и целого мозга считается весьма отдаленной перспективой. Однако достижения нейротрансплантологии позволили использовать для лечения ряда неврологических заболеваний пересадку отдельных фрагментов мозга эмбриона и плода (Вепринцев Б.Н. с соавт., 1988; Gaetz C.G., 1989; Gage F.H. et al., 1988; Lindvall O. et al., 1993).

Использование низкотемпературного метода длительного хранения эмбриональных нейронов позволяет систематизировать экспериментальные исследования и обеспечить создание банка трансплантационного материала (Зотов Ю.В. с соавт., 1999). Банк эмбриональных нервных тканей создает запас генетически нормального материала для экспериментальных исследований, клинического использования и промышленных технологий производства различных дериватов эмбриональных клеток мозга.

В связи с вышесказанным клеточная трансплантация в широком смысле рассматривается в настоящее время в качестве новой перспективной терапевтической стратегии для восстановления функций поврежденной центральной нервной системы человека при ее различных заболеваниях. Создаются специальные программы по дальнейшему изучению возможностей клеточной трансплантации и клинического использования этого метода.

4.1.3. Представления о механизмах влияния нейротрансплантации на восстановление нарушенных функций центральной нервной системы

В настоящее время существуют методы трансплантации фрагментов эмбриональных нервных тканей, моно- или поликлеточных суспензий и генетически модифицированных эмбриональных клеток головного мозга. Каждая методика находит свое применение в соответствии с механизмами взаимодействия с нервной системой реципиента.

В экспериментах доказано, что пересаженные эмбриональные нейроны способны реиннервировать ближайшие участки мозга, дифференцируясь и самостоятельно формируя синаптические и несинаптические контакты с нервными клетками реципиентов (Александрова М.А. с соавт., 1995; Оттелин В.А. с соавт., 1987, 1988; Bernstein J.J. et al., 1985; Dunnett S.B. et al., 1987). Нейроны трансплантатов обнаруживают спонтанную активность, высвобождают присущие им медиаторы, трофические и ростовые факторы (Витвицкий В.Н., 1987; Волин Р.Я. с соавт., 1991; Hunter K.E. et al., 1995). Эти биологически активные вещества способны индуцировать активацию внутриклеточных процессов, экспрессию генов и возбуждение нейронов реципиентов. В результате после нейротрансплантации отмечается значительное повышение в мозге реципиента специфических биологически активных веществ (нейротрансмиттеров, цитокинов, нейропептидов, нейрогормонов). Это способствует сохранению поврежденных нейронов, восстановлению нейронных сетей мозга и связанных с этим некоторых функций головного и спинного мозга в рамках существующих функциональных систем (Овечко В.Н., 1998; Оттелин В.А. с соавт., 1985; Ban T.A. et al., 1991; Barde V.A., 1989; Dunnett S.B., 1993).

Использование эмбриональных недифференцированных клеток-предшественников (глио-, нейробластов) в качестве трансплантатов в мозг взрослых животных в реальных условиях, вероятно, дополняется стимуляцией цитокинами трансплантата пролиферации, миграции, дифференцировки и роста стволовых клеток взрослого мозга (Anderlini P. et al., 1997; Bernstein J.J., 1989; Hussain E.S. et al., 1988). Роль этого пути восстановления поврежденного мозга мало изучена. Однако в ряде работ большие надежды в области лечения нейродеструктивных болезней мозга возлагаются именно на стимуляцию эмбриональными цитокинами пролиферации мультипотентных клеток-предшественников мозга реципиента, а не донора (Ban T.A. et al., 1991; Bejjani B. et al., 1997). Установлено, что биологически активные вещества нейротрансплантата ускоряют синтез ДНК и стимулируют митотическое деление близлежащих недифференцированных или дедифференцированных нейронов. При этом ключевую роль в активации транскрипционных механизмов нейронов имеют специфические ранние гены немедлен-

ного реагирования с-jun, grox-24 и c-fos поврежденного мозга и нейронов трансплантата. Однако в нейронах трансплантата активация с-jun выражена более значительно. Одновременно факторы, вызывающие апоптоз во взрослом мозге, могут индуцировать процесс дифференцировки нейро- и глиобластов эмбриональных трансплантатов (Новиков В.С., 1996; Berkowitz J.M., 1995; Migliaccio G. et al., 1996).

Эмбриональные трансплантаты прекращают деструктивные процессы после гипоксии, восстанавливают структуру дистрофически сморщенных нейронов мозга реципиента, повышают содержание фосфолипидов, снижают содержание холестерина и продуктов свободно-радикального окисления липидов в коре больших полушарий и сывортке крови (Зозуля Ю.А. с соавт., 1991; Козлова Е.Н., 1990; Корзев А.В. с соавт., 1991; Berman N.E. et al., 1997).

Структурно-функциональная интеграция нейронов трансплантата с окружающей нейронной сетью реципиента характерна для всех видов успешной нейротрансплантации. Степень этой интеграции зависит от многих факторов, но факт существования подобной интеграции в настоящий момент не вызывает сомнения.

Связи трансплантата с мозгом реципиента выявляются с 14-х суток. Имеется электрофизиологическое подтверждение наличия синаптических связей между трансплантатом и мозгом реципиента (Русинов В.С., 1973). Развитие связей резко возрастает при частичной денервации или повреждении мозга реципиента. Максимальной пластичностью обладают пересаженные норадренэргические нейроны, затем следуют холинэргические, дофаминэргические и серотонинэргические нейроны (Kordower J.H. et al., 1995; Lindvall O., 1995). До сих пор окончательно не известно, почему и как выживают пересаженные эмбриональные трансплантаты, почему сохраняется только незначительная часть (5–10%) нейронов, почему эти нейроны часто имеют измененные характеристики обмена, цито- и дендроархитектоники (Александрова М.А., 1999; Клешинов В.Н., 1989).

Успешное приживление нейротрансплантата зависит от множества факторов (размеров трансплантата, способа забора, возраста эмбриона), но наибольшее значение, вероятно, имеет иммунологическая гистосовместимость донора и реципиента. На ранних сроках после пересадки главную роль в отторжении аллотрансплантатов играет микроглия донора и реципиента, на более поздних — лимфоциты (Брагин А.Г. с соавт., 1991). Отторжение инициируется экспрессией в нейротрансплантатах антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов, а в дальнейшем связывается с инфильтрацией трансплантата лимфоцитами реципиента (Шевелев А.С., 1976). Первичной мишенью для иммунной системы реципиента оказываются астроциты донора. Экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости классов I и II проявляется на 1–4-й день после трансплантации,

достигает максимума на 6–10-й день и почти полностью исчезает к 30-му дню. В течение этого времени в крови и цереброспинальной жидкости определяются антитела к антигенам главного комплекса гистосовместимости донора (Гилерович Е.Г., 1990; Гилерович Е.Г. с соавт., 1990). Иммунные реакции менее выражены при внутрижелудочковых способах аллотрансплантации. При ксенотрансплантации у реципиентов без иммуносупрессии трансплантаты практически не функционируют (Ленков Д.Н. с соавт., 1988; Федорова Е.А. с соавт., 1992; Mauerhoff T. et al., 1998; Messner R.P. et al., 1997).

Приживаемость трансплантатов эмбрионального мозга зависит от степени зрелости его нейронов и находится в обратной зависимости от возраста эмбриона (Cosgrove G.R. et al., 1995; Hainlin B.E. et al., 1995). Чем моложе эмбриональный трансплантат, тем большего размера он достигает в мозге реципиента после пересадки. Таким образом, более значительный эффект функционального восстановления и структурно-функциональной интеграции ткани донора и реципиента выявляется при нейротрансплантации более молодых эмбриональных тканей (Hallas B.N. et al., 1980).

Сосудистая сеть при трансплантации культивированной эмбриональной нервной ткани формируется в течение первой недели. При аллотрансплантации ткани мозга сосуды происходят главным образом из донорской ткани, а при ксенотрансплантации и в трансплантатах диссоциированных клеток — из окружающей ткани реципиента. На границе трансплантата определяется непрерывный переход капиллярной сети донора и реципиента (Алексеева М.М. с соавт., 1988; Ishizak Y. et al., 1990; Madrazo J., 1988).

Таким образом, снабжение кровью нейронального трансплантата осуществляется преимущественно за счет образования анастомозов на поверхности раздела донор–реципиент между регенерирующими сосудами реципиента и внутренними сосудами трансплантата (Hodgkiss A.D. et al., 1995; Holtzman D.M. et al., 1993; Horvat J.C., 1994).

Наибольшего развития сосудистая сеть достигает во внутрижелудочковых трансплантатах. По данным различных авторов, восстановление гематоэнцефалического барьера реципиента после трансплантации происходит через 12–50 суток. Это зависит от многих факторов (вида животных, метода трансплантации, типа трансплантата) (Ганнушкина И.В. с соавт., 1988; Лыжин А.А. с соавт., 1990; Отеллин В.А. с соавт., 1988; Jankovski A. et al., 1996).

Таким образом, в процессе приживления и после установления связей трансплантата с реципиентом реализуются следующие основные направления воздействия нейротрансплантата на мозг реципиента:

- 1) острое влияние на поврежденный мозг цитокинов трансплантата;
- 2) хроническое диффузное выделение нейрогормонов или нейротрансмиттеров;

- 3) поддержание выживания поврежденных нейронов благодаря выделению нейротрофических факторов и нейромедиаторов;
- 4) устранение необратимо поврежденных клеток мозга благодаря запрограммированной макрофагальной активности трансплантата;
- 5) реиннервация мозга реципиента со стабильным выделением медиаторов на физиологическом уровне;
- 6) использование трансплантата в качестве матрикса для прорастания нейронов, соединяющих разобщенные участки поврежденного мозга;
- 7) инициация формирования микроциркуляторного русла при участии эндотелиальных трансплантированных клеток;
- 8) реципрокная иннервация и интеграция трансплантата с мозгом реципиента.

При этом возможно сочетание всех или нескольких механизмов воздействия трансплантата. В результате происходит полноценная структурно-функциональная регенерация поврежденных тканей головного мозга (Гирман С.В. с соавт., 1988; Кичигина В.Ф. с соавт., 1984; Bonni A. et al., 1997).

Новым направлением в нейротрансплантации является выделение и пересадка изолированных эмбриональных клеточных культур (Брагин А.Г. с соавт., 1992; Быстронь И.П. с соавт., 1992; Отеллин В.А. с соавт., 1989; Bjorklund A. et al., 1985). Трансплантация в стриатум дофамин- и адренэргических нейронов является эффективным методом восстановления некоторых функций двигательного анализатора, связанных с нигростриальной дофаминовой системой (Глебов Р.Н. с соавт., 1978). Вполне вероятно то, что в основе восстановления этих функций лежит реконструкция кортикострионигральных межнейронных взаимоотношений в результате трансплантации. Не исключается возможность установления межнейронных контактов между нейронами донора и реципиента (Отеллин В.А. с соавт., 1988; Brundin P. et al., 1985; Bystron I. et al., 1997). С помощью избирательной трансплантации суспензии дофаминэргических и норадренэргических нейронов эмбрионального мозга в денервированный гиппокамп можно восстанавливать в нем содержание дофамина и норадреналина (Брагин А.Г. с соавт., 1983; Bjorklund A. et al., 1977, 1979; Spangler W.J. et al., 1996; Spector D.H. et al., 1993). Септальные трансплантаты восстанавливают содержание ацетилхолина в гиппокампе, способность к обучению крыс с повреждением гиппокампа, а трансплантаты синего пятна уменьшают гиперреактивность животных (Bjorklund A. et al., 1983, 1984).

Трансплантация эмбриональной ткани гипоталамуса (преоптической зоны) в третий желудочек мозга старых животных восстанавливает некоторые нейроэндокринные функции и сексуальное поведение (Ким О.А. с соавт., 1990; Михайлов Н.Г. с соавт., 1991). Алкогольные нейродеструктивные изменения также могут устраняться с помощью

нейротрансплантации в сочетании с другими нейротропными препаратами (пирацетам, глиатилинганглиозиды, гаммааминомасляная кислота). Все это свидетельствует в пользу того, что существует возможность целенаправленного воздействия на поврежденный мозг реципиента с помощью нейронов различных эргических систем эмбрионального мозга (Василешникова И.П. с соавт., 1988). Аллотрансплантированные очищенные незрелые астроциты относительно быстро мигрируют вдоль мозолистого тела, внутренней капсулы, выстилки желудочков и структур гиппокампа, контактируют с кровеносными сосудами, активно продуцируют нейротрофические факторы, стимулируют регенерацию поврежденных нейронов, активируют метаболизм дистрофированных клеток, подавляют образование глиального рубца (Zerlin M. et al., 1997).

Обнаружено, что трансплантированные олигодендроциты экспрессируют основной белок миелина, восстанавливают острые очаги демиелинизации (Yokota M. et al., 1999).

Микроглия донора продуцирует щелочной фактор роста нервов, участвует в регуляции развития и регенерации нейронов (Zerlin M. et al., 1997; Marion D.W. et al., 1996).

Преинкубация предназначенной для нейротрансплантации эмбриональной ткани мозга с глиальными нейротрофическими факторами и предварительное введение этих факторов в место трансплантации или в ликвор обеспечивают оптимальный результат трансплантации (Зотов Ю.В. с соавт., 1999).

Использование микротрансплантаций суспензии очищенных шванновских клеток представляется многообещающей стратегией для осуществления структурной реконструкции поврежденных проекций центральной нервной системы (Виноградова О.С., 1988; Обухова Г.П. с соавт., 1987; Овечко В.Н., 1994).

Перспективным является создание моно- или поликлеточных протезов нервной ткани из астроцитов, шванновских клеток, нейронов на базе различных полимерных гидрогелей (например, М-[2-гидроксипропил]-метакриламид). Клетки эмбрионального мозга выживают, дифференцируются в этих гидрогелях и могут быть пересажены (Лыжин А.А. с соавт., 1988). Перспектива этого метода заключается в том, что можно целенаправленно подбирать клеточный состав протезов для достижения оптимального результата в конкретном случае (Балабанов Ю.В., 1992).

Особое внимание в настоящее время уделяется трансплантации генетически модифицированных эмбриональных нервных клеток. Перспективным является использование очищенных и модифицированных с помощью генетических методов астроцитов и других клеток мозга, экспрессирующих антиапоптозные гены *bcl-2* (Новиков В.С., 1996; Marion D.W. et al., 1996; Zerlin M. et al., 1997).

Для нейротрансплантации с помощью методов генной инженерии создаются ненервные клетки, способные обеспечивать высокий уровень биологически активных нейротрофических веществ, или в нервные клетки внедряются полезные гены (Snyder E.Y., Senut M.C., 1997). Однако использование генетически модифицированных миобластов для внедрения во взрослый мозг биологически активных веществ может обеспечить лишь кратковременный эффект (Lisovoski F., 1997). Поэтому для долгосрочных эффектов лучше использовать модифицированные астроциты. Кроме того, в ряде работ выявлена высокая эффективность модифицированных эндотелиальных клеток мозга в качестве потенциальных источников «генетически полезного» материала (Rousseau F. et al., 1995).

Таким образом, трансплантация эмбриональной нервной ткани оказывает положительный эффект при различных гено- и фенотипически детерминированных поражениях нервной системы, сопровождающихся деструктивным и атрофическим процессом в головном мозге. Имеется экспериментальное подтверждение положительного действия трансплантации эмбриональной ткани мозга практически на все стороны деятельности мозга. Уменьшается дефицит обучения, нормализуется поведение, предупреждается судорожная активность, активируются иммунные реакции мозгоспецифической направленности, восстанавливается высвобождение нейромедиаторов, нормализуется функция дистрофически измененных нейронов коры головного мозга.

4.1.4. Применение трансплантации эмбриональной нервной ткани при тяжелой травме центральной нервной системы

Доказано, что в посттравматическом периоде нейротрансплантация эмбриональной нервной ткани ускоряет восстановление гематоэнцефалического барьера, предотвращает дистрофию и гибель нейронов, нормализует их ультраструктуру, стимулирует синтез РНК, ДНК и митотическое деление нейронов реципиента, в течение 120 суток сохраняет синтез белка на высоком уровне, способствует нормализации поведения (Полежаев Л.В. с соавт., 1988; Рабинович С.С. с соавт., 1995; Das G.D., 1987; Dunnett S.B. et al., 1993; Soares H. et al., 1991; Sortwell C.T. et al., 1998). Существуют работы, свидетельствующие о возможности регулирования с помощью нейротрансплантации судорожной активности мозга (Берснев В.П. с соавт., 1995, 1997; Савченко Ю.Н. с соавт., 1993). В этих работах целенаправленное воздействие на нейроны гиппокампа и миндалины с помощью эмбриональных нейротрансплантатов, содержащих ГАМК-, катехоламин-, серотонинэргические нейроны, приводит к снижению уровня судорожной готовности нейронов (Александрова М.А. с соавт., 1995; Ашмарин И.П. с соавт., 1988; Зотов Ю.В. с соавт., 1999).

С.И.Ерениев (1997) провел сравнительный анализ влияния различных вариантов нейротрансплантации эмбрионального мозга (различные отделы) на судорожную готовность мозга взрослого реципиента у низко- и высокопороговых белых крыс (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000). Автором показано, что внутримозговая трансплантация эмбриональной нервной ткани предупреждает повышение судорожной готовности после очагового и диффузного повреждения мозга и снижает генетически детерминированную высокую судорожную готовность. Корригирующий эффект нейротрансплантации зависит от экзогенной и эндогенной обусловленности повышенной судорожной готовности, характера, места и объема повреждения мозга, сроков нейротрансплантации и нейромедиаторной специфичности трансплантированной ткани. Доказано, что в плане снижения судорожной готовности мозга более эффективна трансплантация эмбриональной нервной ткани на 7–14-е сутки после повреждения мозга, а также сочетанная трансплантация ткани эмбрионального гиппокампа и перегородки эмбрионального мозга. Снижение судорожной готовности мозга при нейротрансплантации сопровождается уменьшением выраженности дистрофических и некробиотических изменений нейронов, глиоцитов, кровеносных сосудов, реактивного глиоза, сохранением численной плотности синапсов в коре большого мозга, предупреждением гипертрофии и усложнения пространственной организации синапсов и дендритных шипиков, активацией неосинаптогенеза (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000). Внутримозговая трансплантация эмбриональной нервной ткани животным с повышенной судорожной готовностью мозга улучшает показатели долговременной памяти и способность к обучению (Подачин В.П., 1974, 1990; Полежаев Л.В. с соавт., 1986).

Лучшими сроками для нейротрансплантации после острого повреждения мозга считается период от одной до трех недель. Нейротрансплантация в более поздние сроки сопровождается некрозом и появлением глиальной капсулы вокруг трансплантата, малым количеством связей трансплантата с мозгом реципиента, незначительным нейрофизиологическим эффектом (Лисяный Н.И. с соавт., 1990; Луцки А.А. с соавт., 1999; Луцкина Е.А., 1990; Полежаев Л.В., 1988).

Использование эмбриональной нервной ткани для лечения больных, находящихся в тяжелом коматозном состоянии, оказывает выраженный положительный эффект на выход из комы и восстановление функций мозга в postanоксическом периоде (Цымбалюк В.И. с соавт., 1995). В условиях нейротравматологического реанимационного отделения Городской клинической больницы №1 Омска применена трансплантация эмбриональной нервной ткани для лечения травматической комы двум больным после тяжелой закрытой черепно-мозговой травмы. Для трансплантации использован материал, полученный согласно договору о сотрудничестве между Институтом клинической

иммунологии СО РАМН и омской Городской клинической больницы №1. Источником клеток нервной ткани явились плоды 15–20-недельного внутриутробного развития. Клеточная суспензия формировалась из мозга трех плодов и включала в себя клетки нервной ткани и клетки печени в соотношении 10:1. Материал хранился в жидком азоте при температуре -196°C (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000).

Трансплантацию проводили после стабилизации витальных функций организма и купирования отека мозга, что подтверждалось данными неврологического статуса, эхоэнцефалографии, исследованиями глазного дна, ликвора и крови, результатами компьютерной рентгеновской или магнитно-резонансной томографии. Живые клетки вводили больным субарахноидально через поясничный прокол в количестве 450–500 млн после предварительного разведения суспензии в 10 мл ликвора пациента (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000).

Больной Т., 35 лет, поступил в отделение нейрохирургии 08.11.98 г. Диагностирована тяжелая закрытая черепно-мозговая травма, ушиб головного мозга тяжелой степени, перелом костей свода черепа, коматозное состояние. Больному проводилась интенсивная терапия по стабилизации витальных функций организма, включавшая искусственную вентиляцию легких, дегидратацию, детоксикацию, инфузионную терапию. По данным магнитно-резонансной томографии головного мозга, имело место полиочаговое поражение мозга (контузионные очаги, субдуральная, эпидуральная гематомы). На 13-е сутки коматозного состояния больному произведена субарахноидальная трансплантация суспензии клеток фетальной нервной ткани. Через трое суток после трансплантации у больного восстанавливалось сознание, стал возможным словесный контакт. На 7-е сутки больной стал адекватным, активным и был переведен в отделение нейрохирургии. На 12-е сутки больной стал самостоятельно себя обслуживать, способным критически оценивать окружающую обстановку, читать. Через 15 суток после трансплантации пострадавший выписан домой в удовлетворительном состоянии (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000).

Аналогичная тактика проводилась в отношении больной Н., 36 лет, поступившей в коматозном состоянии после тяжелой черепно-мозговой травмы, перелома бедра и ушиба грудной клетки, где также получен положительный результат.

Первый опыт лечения коматозных состояний методом субарахноидальной аллотрансплантации фетальной нервной ткани дает основание надеяться на существенное снижение летальности, сокращение сроков лечения и уменьшение количества случаев инвалидизации при использовании данного метода в комплексном лечении неврологических и нейрохирургических больных (Зозуля Ю.А. с соавт., 2000).

Таким образом, имеются все предпосылки использования трансплантации эмбриональной нервной ткани для коррекции устойчивых

патологических посттравматических состояний мозга. Общие принципы лечения нейродеструктивных заболеваний мозга, базирующегося на использовании трофических факторов и трансплантационной техники, заключаются в следующем: если процесс деструкции нейронов уже имеет место, необходимо использовать аллотрансплантацию нервной ткани в место повреждения нейронов; если существует только угроза повреждения нейронов, лучше использовать различные нейротрофические факторы. В последнее время в связи с новыми технологиями появилась возможность внедрения в неделящиеся клетки центральной нервной системы генов, специализированных на производстве биологически активных веществ. Дальнейшее внедрение метода в клинику требует хорошо разработанных и критически оцененных фундаментальных научных исследований, создания специализированных отделений, банка данных. Следовательно, результаты изучения последствий нейротрансплантации, ее терапевтического воздействия дают надежды на внедрение этого метода в практическое здравоохранение. Наиболее вероятно то, что с появлением новых технологий очистки, концентрации и стабилизации биологически активных веществ, клеточных суспензий и ткани эмбрионального мозга в целом будут использоваться различные (подобранные строго индивидуально) варианты замещения и протезирования функций мозга реципиента путем использования живых клеток эмбриона и их отдельных, наиболее эффективных компонентов. Кроме протезирования утерянных функций мозга эмбриональная нервная ткань и ее дериваты будут использоваться в качестве эффективного нейропротекторного средства в посттравматическом периоде. В современной литературе мы практически не встретили сведений о морфологических доказательствах эффективности трансплантации эмбриональной нервной ткани в зону травматической деструкции при тяжелых черепно-мозговых травмах. Большинство опубликованных материалов содержит нейрофизиологические доказательства положительного влияния трансплантата на мозг реципиента. Однако клиническое применение методики требует четких гистоморфологических обоснований, что побудило нас заняться данным исследованием.

4.2. Изучение гистоморфологических изменений структуры головного мозга при моделировании тяжелой черепно-мозговой травмы в эксперименте

В эксперимент были включены две группы белых крыс линии Вистар со средней массой тела $230 \pm 11,3$ г. Первая группа (группа сравнения) состояла из 80 животных, которым наносили ЧМТ и проводили

хирургическую обработку очага ушиба мозга по традиционной методике. Вторая (основная) группа состояла из 108 животных, которым после ЧМТ проводили хирургическую обработку очага и трансплантацию эмбриональной нервной ткани. Черепно-мозговая травма наносилась животным с помощью разработанного нами устройства (рис. 4.1, см. цв. вклейку), состоявшего из стальной трубки длиной 20 см, имеющей отверстия через каждый 1 см (для устранения действия воздушной волны), и грузика массой 5 г. Операции проводились под эфирным наркозом с использованием специальной маски и дозиметра эфира. Хирургическое вмешательство включало в себя обработку операционного поля антисептиками, введение подкожно 3 мл 0,5% раствора новокаина, рассечение мягких тканей головы животного, наложение трепанационного отверстия в левой теменно-височной области по диаметру, соответствующему диаметру трубки. Трубка устанавливалась строго вертикально, после чего груз с постоянной массой 5 г роняли с высоты 20 см. Таким образом, наносилась травма стандартной силы удара, равной произведению массы груза на высоту падения, т. е. 100 г/см. Критерием достаточности наносимого удара было визуально наблюдаемое формирование контузионного очага. При проведении хирургического вмешательства использовался нейрохирургический налобный осветитель (ЛОМО). Затем проводились аспирация мозгового детрита, гемостаз и ушивание мягких тканей у животных группы сравнения. Объем разрушения коры составлял 10–15 мм³. В отличие от животных первой группы, после аспирации мозгового детрита и гемостаза животным основной группы проводилась интрапаренхимальная трансплантация эмбриональной нервной ткани головного мозга в боковые стенки образовавшегося кратера. Малотравматичная и целенаправленная интрапаренхимальная имплантация фрагментов ЭНТ в мозг реципиента осуществлялась с использованием микрохирургического инструмента для имплантации фрагментов ЭНТ, разработанного в РНХИ им. проф. А.Л.Поленова (Берснев В.П., Овечко В.Н., 1994). Инструмент для имплантации ЭНТ нами приспособлен для работы с крысами. Донорами служили 15-суточные эмбрионы крыс линии Вистар, у которых выделяли дорсолатеральную стенку переднего мозгового пузыря, содержащую закладку неокортекса, и помещали ее в питательную среду №199 (Москва) с добавлением сульфата стрептомицина (0,01 г на 10 мл среды). При осуществлении забора фрагментов ЭНТ соблюдали следующие условия:

1. Фрагменты ЭНТ выделяли из мозга эмбриона не позднее пяти минут после его извлечения.
2. Для обеспечения питания клеток фрагменты ЭНТ сразу помещали в контейнеры со стерильным питательным раствором (№199).
3. При заборе трансплантатов ЭНТ соблюдали все правила асептики и антисептики.

При имплантации фрагментов ЭНТ выполнялись условия, необходимые для успешного приживления трансплантатов:

1. Фрагменты ЭНТ оберегали от возможной травматизации.
2. Имплантацию фрагментов ЭНТ производили минимально травматично для мозга реципиента после тщательного гемостаза.
3. Трансплантаты имплантировали в четырех направлениях с захватом здоровой ткани, чтобы обеспечить их адекватное питание.

Каждой крысе имплантировали в зону травмы по четыре фрагмента ЭНТ в среднем объеме 2–3 мм³ с использованием устройства для имплантации, разработанного РНХИ им. проф. А.Л. Поленова. Подопытные животные находились в условиях вивария НИИ профзаболеваний. Проводилось динамическое наблюдение за поведением животных и клиническими проявлениями после травмы.

Подопытных животных обеих групп забивали через 1, 3, 7, 10, 15, 20 и 30 дней после произведенного эксперимента.

После вскрытия черепа головной мозг животных обеих групп вылушывали и из зоны травмы брали серое и белое вещество головного мозга размерами 0,5 x 1,0 см, включая здоровую зону по краям травмы (раны). Взятые кусочки фиксировали в 10% формалине и после парафиновой проводки изготовили 1900 микропрепаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. В дальнейшем проводилось гистологическое исследование приготовленных препаратов.

С целью изучения гистоморфологических изменений структуры головного мозга при тяжелой черепно-мозговой травме нами применена указанная в главе 2 модель нарушений ЦНС у экспериментальных животных, являющаяся аналогом патологических изменений, наблюдаемых у больных с тяжелой ЧМТ.

Основой для изучения патоморфологических процессов при тяжелой ЧМТ явилась первая группа подопытных животных, состоявшая из 80 белых крыс линии Вистар средней массой тела $232 \pm 9,2$ г. Животным наносили ЧМТ и проводили хирургическую обработку очага ухаиба мозга. В ходе эксперимента умерло:

от передозировки эфира	9
от нанесенной ЧМТ (в том числе от массивного кровотечения)	5 (3)
в послеоперационном периоде	14
Всего:	28

Остальных подопытных крыс забивали через 1, 3, 7, 10, 15, 20 и 30 дней после произведенной ЧМТ. Было изготовлено 640 микропрепаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. При гистологическом исследовании через день после ЧМТ в зоне контузионного очага визуально отмечается кровяной сгусток размерами 3 x 3 мм, выступающий над поверхностью головного мозга. В гистологических препаратах в зо-

мы головного мозга подопытных животных формируется нейроглиально-соединительнотканый рубец. В центральной части рубца все еще отмечается инфильтрация эритроцитами из кровеносных сосудов (продолжается кровоизлияния). В краевой части формирующегося рубца определяется соединительнотканная оболочка с однослойными плоскими нейроглиальными клетками (рис. 4.10, 4.11, см. цв. вклейку).

Через 15 дней после черепно-мозговой травмы вокруг формирующегося нейроглиально-соединительнотканного рубца мы видим небольшие очаги лимфоидной ткани. Иногда лимфоидные клетки могут располагаться в один слой вокруг капилляров или артериол серого и белого вещества головного мозга. В зоне травмы определяется отечность вещества головного мозга, при этом глиальные и нервные клетки располагаются друг от друга изолированно и все еще отмечается диффузное расположение лимфоидной ткани. Осколок костной ткани, расположенный в зоне травмы головного мозга, подвергается интенсивному разрушению благодаря нейтрофильным лейкоцитам и макрофагам-остеокластам. В центральной части травмы еще видим выпячивание рубцовой ткани над корковой частью головного мозга. В толще рубцовой ткани клеточных элементов мало, вокруг рубца кроме нейроглиальных клеток встречаются лимфоидные клетки, особенно вокруг капилляров с застойными явлениями (рис. 4.12, 4.13, см. цв. вклейку).

Через 20 дней после эксперимента продолжается пролиферация соединительнотканых элементов, клеток нейроглии с образованием коллагеновых волокон в зоне рубцовой ткани. При этом сохраняется умеренная лимфоидная инфильтрация вокруг рубца. Кровеносные капилляры, расположенные как вокруг рубцовой ткани, так и в толще рубца, характеризуются явлениями воспалительного процесса. Отмечаются застойные явления, признаки периваскулярного отека. Соединительнотканная оболочка на границе с корковой частью головного мозга имеет ровную поверхность с выраженными кровеносными сосудами (рис. 4.14, см. цв. вклейку).

Через 30 дней после опыта тканевые образования рубца приобретают более плотное строение. Клеточные элементы соединительной ткани (фибробласты, фиброциты), а также межклеточное вещество (коллагеновые, эластические волокна и аморфное вещество) и глиальные клетки располагаются достаточно плотно друг к другу. Кровеносные капилляры, расположенные вокруг рубцовой ткани, а также в толще ее, — без морфологических изменений. Кровенаполнение умеренное. Однако соединительнотканная оболочка мозга утолщена, отмечаются обилие кровеносных сосудов и инфильтрация лимфоидной ткани как вокруг кровеносных сосудов, так и в соединительнотканной основе. Между соединительнотканной капсулой и тканями мозга располагает-

ся глиальная мембрана. Следовательно, оболочка мозга в зоне формирования рубцовой ткани и в зоне травмы все еще остается с признаками воспалительного процесса (рис. 4.15, см. цв. вклейку).

Таким образом, в результате произведенной черепно-мозговой травмы в зоне дефекта серого и белого вещества головного мозга развивается кровоизлияние с последующим застоем и тромбозом кровеносных сосудов оболочки головного мозга, а также нейротканевых структур вокруг контузионного очага. Фаза альтерации характеризуется разрушением ткани головного мозга и развитием в дальнейшем воспалительной реакции. Далее следует сосудистая реакция с резким увеличением проницаемости стенок кровеносных капилляров. Одновременно отмечается усиленная экссудация плазмы крови, приводящая к отеку вещества мозга. По мере замедления кровотока в результате расширения капилляров нарушается их проницаемость, что и приводит к выходу форменных элементов крови в зону травмы головного мозга. Через 24 часа наиболее активная клеточная экссудация наблюдается со стороны нейтрофильных лейкоцитов, одновременно определяются макрофаги и лимфоциты, которые постепенно замещаются фибробластическими клетками, синтезирующими межклеточное вещество. Одновременно происходит быстрое размножение нейроглиальных клеток в зоне травмы головного мозга. Следовательно, при гибели участка головного мозга в результате травмы рыхлая соединительная ткань и клетки нейроглии заполняют этот участок, тем самым обеспечивается неполная, т. е. заместительная регенерация, не обеспечивающая компенсацию утраченной функции. В то же время наличие рубцовой ткани, состоящей из соединительнотканно-нейроглиальной структуры, для головного мозга являлось раздражающим фактором. Внешне это проявлялось увеличением числа умерших животных, грубым неврологическим дефицитом, длительным восстановлением пищевых реакций и поведенческих рефлексов.

4.3. Изучение гистоморфологических изменений структуры головного мозга после трансплантации эмбриональной нервной ткани при моделировании тяжелой черепно-мозговой травмы в эксперименте

Результаты исследований, приведенные в главе 2, свидетельствуют о неудовлетворительных результатах применения традиционной активной хирургической тактики лечения тяжелых черепно-мозговых травм. Нейробиологические исследования последних лет свидетельствуют о возможности восстановления нарушенных болезнью или трав-

мой функций головного мозга посредством пересадок эмбриональной нервной ткани. В экспериментах доказано, что пересаженная эмбриональная нервная ткань способна развиваться в мозге реципиента, ее клеточные элементы пролиферируют, дифференцируются и интегрируются с мозгом реципиента. Пересаженные нейроны способны реиннервировать ближайшие участки мозга, формируя синаптические и несинаптические контакты с нервными клетками реципиентов. Нейроны трансплантатов обнаруживают спонтанную активность, высвобождают присущие им медиаторы, трофические и ростовые факторы. Эти биологически активные вещества способны индуцировать активацию внутриклеточных процессов, экспрессию генов и возбуждение нейронов реципиентов. Указанные процессы делают возможным создание новых и реконструкцию поврежденных внутримозговых систем, способных возместить функциональный дефицит, и являются основанием для клинического использования метода.

Целями проведенных нами экспериментов были изучение воздействия эмбриональной нервной ткани на зону повреждения головного мозга, оценка состояния и функциональных способностей трансплантированной эмбриональной нервной ткани и возможности ее применения для коррекции нарушений, вызванных экспериментальной тяжелой черепно-мозговой травмой.

Основой для изучения гистоморфологических процессов при тяжелой ЧМТ явилась вторая группа подопытных животных, состоявшая из 108 белых крыс линии Вистар со средней массой тела $23,1 \pm 9,1$ г.

Животным наносили ЧМТ в стандартных условиях в левую теменно-височную область. Параметры наносимого удара были идентичны использованным у животных первой группы. После нанесения травмы проводили хирургическую обработку очага ушиба мозга по методике, представленной в главе 2. В отличие от животных первой группы, после аспирации мозгового детрита и гемостаза крысам проводилась интрапаренхимальная трансплантация эмбриональной нервной ткани головного мозга в боковые стенки образовавшегося кратера. При этом 80 животным производилась трансплантация свежезаготовленной ЭНТ, 28 — криоконсервированной. Малотравматичная и целенаправленная интрапаренхимальная имплантация фрагментов ЭНТ в мозг реципиента осуществлялась с использованием микрохирургического инструмента для имплантации фрагментов ЭНТ, разработанного в РНХИ им. проф. А.Л.Поленова (Берснев В.П., Овечко В.Н., 1994). Инструмент для имплантации ЭНТ нами приспособлен для работы с крысами. Донорами служили 15-суточные эмбрионы крыс линии Вистар, у которых выделяли дорсолатеральную стенку переднего мозгового пузыря, содержащую закладку неокортекса, и помещали ее в питательную среду №199 (Москва) с добавлением сульфата стрептомицина (0,01 г на 10 мл среды).

Каждой крысе имплантировали в зону травмы по четыре фрагмента ЭНТ в среднем объеме 2–3 мм³ с использованием устройства для имплантации, разработанного РНХИ им. проф. А.Л.Поленова. Подопытных животных забивали через 1, 3, 7, 10, 15, 20 и 30 дней после произведенной ЧМТ и трансплантации фрагментов ЭНТ. Гистологическому исследованию подлежали кусочки серого и белого вещества головного мозга размерами 0,5 x 1,0 см из зоны травмы, включая здоровую зону. Взятые кусочки фиксировали в 10% формалине и после парафиновой проводки изготовили 920 микропрепаратов, окрашенных гематоксилин-эозином.

В ходе эксперимента умерли 18 животных, в том числе: во время операции от передозировки эфира — 6 крыс, от нанесенной ЧМТ — 3 (в том числе от массивного кровотечения — 2), в послеоперационном периоде — 9 животных.

В ходе эксперимента умерло:	Основная группа	Контрольная группа
от передозировки эфира	6	9
от нанесенной ЧМТ (в том числе от массивного кровотечения)	5 (3)	5 (3)
в послеоперационном периоде	7	14
Всего:	18	28

При гистологическом исследовании через сутки после эксперимента в зоне гибели тканей головного мозга определяется кровоизлияние. Форменные элементы крови заполняют зону разрушения серого и белого вещества, среди клеток крови располагаются довольно крупные, округлой формы клетки трансплантата со светлой цитоплазмой, округлым большим ядром, расположенным у большинства клеток в центре, у части — эксцентрично. Хроматин гомогенный, определяется одно или два ядрышка. Среди округлой или овальной формы клеток трансплантата встречаются клетки с признаками формирования отростков. Часть трансплантированных клеток располагается свободно в зоне дефекта головного мозга. Кровеносные капилляры и артериолы в непосредственной близости от зоны травмы расширены, что приводит к затруднению оттока крови с последующей экссудацией жидкой части крови. В просвете капилляров и артериол увеличивается количество нейтрофильных лейкоцитов. Наряду с диapedезом эритроцитов за пределы сосудистого русла идет интенсивное выселение лейкоцитов через межклеточные промежутки стенки кровеносных сосудов (рис. 4.16–4.21, см. цв. вклейку).

Через трое суток после эксперимента в зоне гибели серого и белого вещества головного мозга среди эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, особенно в непосредственной близости от края травмы, определяется большое количество эмбриональных клеток трансплантата

(рис. 4.22, см. цв. вклейку), имеющих округлую или овальную форму. Все эти клетки довольно крупного размера, вокруг округлой формы ядра цитоплазма в форме узкой полоски, тогда как у некоторых медуллобластов цитоплазма увеличена и содержит очень тонкие белковые нити, имеющие извилистый ход, что указывает на начало формирования нейрофибрилл. По-видимому, тонкие фибриллярные нити в цитоплазме медуллобластов являются показателями их дифференцировки с образованием нейробластов (рис. 4.23, см. цв. вклейку). Трансплантированные эмбриональные медуллобласты делятся митозом, что приводит к более компактному их расположению, однако митотически делящихся клеток не так уж много. У делящихся клеток на стадии профазы в ядре появляются темные глыбки и нитевидные структуры, указывающие на начало конденсации хромосом (рис. 4.24, см. цв. вклейку). В начальном периоде митоза клеток ядерная оболочка сохраняется, однако ядрышко не определяется. В целом делящаяся клетка имеет округлую форму, цитоплазма без видимых изменений. Следующая фаза деления медуллобластов — образование экваториальной (метафазной) пластинки, когда максимально конденсированные хромосомы выстраиваются в области экватора митотического веретена, образуя материнскую звезду. Далее следует движение дочерних хромосом к противоположным полюсам делящейся клетки, формируя стадию дочерних звезд с последующим образованием клеточной перетяжки. И, наконец, наступает телофаза, характеризующаяся реконструкцией дочерних клеток, завершающая их разделение. Вновь образованные клетки по размеру меньше, чем материнская. Медуллобласты увеличиваются в размерах, постепенно приобретают более крупные ядра, появляются цитоплазматические выросты (отростки), т. е. идет дифференцировка в направлении нервных клеток. В зоне гибели ткани головного мозга наряду с медуллобластами определяются клетки меньшего размера, образующие глиальные элементы с нежными отростками. Форма и характер отростков клеток различны. При дифференцировке нейрона из медуллобластов важнейшим структурным образованием является возникновение ядрышка в ядре. С образованием ядрышка происходит формирование в их цитоплазме нитевидных структур и появление отростков клеток, устанавливающих межнейрональные связи (рис. 4.25—4.29, см. цв. вклейку).

Оболочка головного мозга, расположенная вокруг зоны травмы, со всеми признаками воспалительного процесса. Застой крови, адгезия и выделение лейкоцитов за пределы кровеносных сосудов различного калибра, особенно сильно расширенных капилляров, охватывают довольно обширные зоны вокруг травмы головного мозга. Отек мозговой ткани все еще определяется. На 15—20-е сутки после трансплантации эмбриональной нервной ткани в зоне повреждения головного мозга взрослых крыс обнаруживается резкое уменьшение признаков

воспалительной реакции. Об этом свидетельствует уменьшение количества лейкоцитов в зоне пересадки ткани (рис. 4.30–4.33, см. цв. вклейку). Небольшое количество лейкоцитов встречается только в соединительнотканых оболочках мозга, однако единичные лимфоидные клетки определяются в зоне трансплантата. Они могут располагаться среди нейробластов и спонгиобластов или в нервной ткани мозга реципиента. В зоне трансплантата хорошо развита сеть кровеносных капилляров, все они умеренного кровенаполнения и без периваскулярного отека или миграции лейкоцитов через стенку кровеносных сосудов. Основное количество клеток трансплантата располагается свободно, они имеют округлую или овальную форму. Ядра большинства клеток смещены в одну сторону, хроматин ядра мелкозернистый, выявляется одно, два или даже три ядрышка. Определяется дифференцировка клеточных структур трансплантата. При дифференцировке нейробластов основную площадь клетки занимает ядро, цитоплазма вокруг него образует небольшую ободок, однако у некоторых клеток цитоплазма увеличена. В ней появляются тонкие белковые нити, и именно на этом участке вырастают цитоплазматические отростки разной длины. Цитоплазма дифференцирующихся клеток окрашивается более базофильно. Спонгиобласты, расположенные среди нейробластов, имеют большие размеры, но с малым количеством отростков. Дифференцирующиеся спонгиобласты уменьшаются в размерах, но число отростков увеличивается. Как нейробласты, так и спонгиобласты проявляют высокую функциональную активность, о чем свидетельствует базофилия цитоплазмы. Среди клеточных элементов трансплантата довольно часто встречается клеточное деление. Если в средней зоне трансплантата клетки располагаются довольно свободно, то на границе с головным мозгом взрослых крыс мы видим линейное расположение трансплантированных клеток. Клеточные тяжи могут располагаться изолированно, однако основное их количество расположено плотно друг к другу. При этом клеточные тяжи трансплантата тесно связаны с нервной тканью реципиента. В каждом клеточном тяже — трабекуле — количество клеток от трех до пяти. Клетки, расположенные в непосредственной близости от нервной ткани реципиента, имеют кубическую или цилиндрическую форму и расположены плотно друг к другу, а также к клеткам смежных клеточных тяжей. По мере перемещения по ходу клеточного столбика в сторону свободно расположенных клеток трансплантата клетки увеличиваются в размерах, приобретают округлую или овальную форму, и часть из них отрывается, приобретая свободное расположение. Некоторые из них включаются в митотическое деление. В зону трансплантата прорастают крупные кровеносные сосуды с капиллярами. В просвете крупных сосудов — артериол — могут встречаться скопления лейкоцитов. Однако миграция лейкоцитов через стенку кровеносных сосудов не опре-

деляется. Клеточные столбики (тяги) или свободно расположенные клетки трансплантата прилегают к кровеносным сосудам. Мы видим поперечное сечение артериолы, состоящей из эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток, к такому сосуду прилегают клетки трансплантата. Образовавшиеся в зоне трансплантации кровеносные сосуды, прежде всего вновь образованные кровеносные капилляры, состоящие только из эндотелиоцитов, умеренного кровенаполнения и также тесно соприкасаются с клетками трансплантата округлой или полигональной формы. Периваскулярный отек и миграция лейкоцитов через сосудистую стенку не определяются. Кровеносные капилляры, прорастающие в зону трансплантата, разветвляются и занимают более тесное расположение с размножающимися клетками трансплантата. При этом вновь образованные при делении клетки трансплантата имеют более тесное соприкосновение с кровеносными сосудами. Более того, клетки трансплантата приобретают плотное расположение с нервными тканями головного мозга взрослых крыс и устанавливают контакты с развивающейся сосудистой системой (рис. 4.34–4.39, см. цв. вклейку).

Через 30 дней после эксперимента исследование показало дальнейшую дифференцировку клеток трансплантата. Часть клеток все еще остается на стадии нейробластов и спонгиобластов, однако встречаются отростчатые нервные клетки. Нервные клетки достигают больших размеров, ядро располагается эксцентрично, четко определяются 2–3 ядрышка, хроматин ядра мелкозернистый. Цитоплазма нервных клеток базофильна, от тела клеток отходит несколько отростков, образующих нервные волокна. Отростки нервных клеток обеспечивают межклеточные связи. В непосредственной близости от тел нервных клеток расположены нейроглиальные клетки, прежде всего дифференцирующаяся астроцитарная глия. Однако основная масса дифференцирующихся нервных клеток остается с небольшим количеством отростков. Глиальные клетки продолжают делиться митозом, однако делящиеся клетки встречаются редко. В зоне трансплантации ЭНТ определяется хорошо развитая сеть кровеносных сосудов, обеспечивающих трофику всех тканевых структур. Таким образом, исследование трансплантатов ЭНТ в области травмы головного мозга подопытных животных показывает, что на 3-и сутки после эксперимента начинаются деление и дифференцировка медуллобластов с последующим образованием нейробластов и спонгиобластов. Параллельно отмечается уменьшение признаков воспалительного процесса в зоне травмы и начинается замещение дефекта (зоны гибели) головного мозга вновь образованной нервной тканью (нервной и нейроглиальной).

Нами установлено, что на 10-е сутки после трансплантации ЭНГ начинается процесс формирования гемокапилляров в трансплантате, источником которого являются эндотелиоциты, оказавшиеся среди кле-

ток трансплантата. Этот эффект очень наглядно продемонстрирован на рис. 4.39–4.41 (см. цв. вклейку). Одновременно отмечается подрастание кровеносных капилляров и артериол из тканей мозга реципиента. Клеточные элементы трансплантата продолжают активно делиться митозом и проявляют признаки дальнейшей дифференцировки. На 30-е сутки после трансплантации практически отсутствуют признаки воспалительного процесса в зоне травмы. Все кровеносные сосуды умеренного кровенаполнения, без периваскулярного отека и миграции лейкоцитов через сосудистую стенку (рис. 4.42–4.47, см. цв. вклейку).

Активный ангиогенез за счет новообразования сосудов в трансплантате и подрастания сосудов из окружающих тканей мозга реципиента, а также пролиферация с последующей дифференцировкой клеток трансплантата тормозят формирование глиально-фиброзной рубцовой ткани.

Организм взрослых животных не проявляет реакции отторжения трансплантата по отношению к эмбриональным клеткам головного мозга 15-дневных зародышей крыс. Через 30 дней после трансплантации медуллобластов в головной мозг взрослых крыс определяется их полное приживание с последующей дифференцировкой в нервные и глиальные клетки и восстановлением их кровоснабжения и функций. Трансплантат постепенно замещает дефект мозга, образовавшийся после травмы.

Иными словами, основными преимуществами применения трансплантации ЭНТ в посттравматическом периоде, в отличие от традиционной хирургической обработки очага повреждения головного мозга, являются:

- быстрое стихание воспалительной реакции в зоне травмы после трансплантации;
- восстановление кровообращения в зоне повреждения головного мозга;
- полноценная структурно-функциональная регенерация поврежденной нервной ткани без формирования соединительнотканно-глиального рубца.

4.4. Трансплантация фрагментов эмбриональной коры головного мозга, подвергшейся глубокому замораживанию, в зону травматической деструкции коры головного мозга взрослых крыс

С целью оценки возможности трансплантации криоконсервированной ЭНТ нами проведена серия экспериментов с имплантацией фрагментов эмбриональной коры после глубокого замораживания в кору головного мозга взрослых крыс.

Технология операции.

Для криоконсервирования фрагментов ЭНТ использована модернизированная нами методика, предложенная Институтом гриппа (Методические рекомендации по культивированию клеток, Санкт-Петербург, 1985 г.). Криоконсервирование осуществлялось в условиях лаборатории ГЛПС ГУП НПП «Иммунопрепараты».

Кусочек головного мозга 15-дневных эмбрионов белых крыс цилиндрической формы объемом 1–1,5 мм³ после глубокого замораживания на 10 дней помещали в жидкий азот (Т – 195°С). В дальнейшем трансплантат размораживали в воде при температуре +42°С в течение пяти минут. Оценку жизнеспособности размороженных фрагментов ЭНТ проводили в определенные сроки согласно тесту на исключение суправитального красителя. С этой целью в определенный срок брали фрагменты эмбрионального головного мозга, получали суспензию клеток путем механической диссоциации ЭНТ щадящим пипетированием с помощью пастеровской пипетки. Данная суспензия диссоциированных эмбриональных нервных клеток окрашивалась 0,1% раствором трипанового синего. Наносилось 2–3 капли красителя, окрашивание проводилось в термостате при температуре +37°С в течение 20 минут. Степень окрашивания контролировалась под микроскопом. Подсчет числа живых клеток производился в камере Горяева под световым микроскопом. Гибнущие клетки с поврежденной мембраной имели синюю окраску цитоплазмы. Результаты исследований регистрировались и сравнивались между собой. Под микроскопом подсчитывалось общее количество клеток, в том числе окрашенных клеток в 25 «пустых» квадратах камеры Горяева. Дальнейший подсчет клеток проводился по формуле:

$$X = N \times S \times 10\,000,$$

где X — количество клеток в 1 см³ суспензии, N — количество клеток в 25 больших квадратах, S — кратность разведения суспензии красителем.

Процентное содержание живых клеток подсчитывалось по формуле:

$$K = \frac{(\text{общее количество клеток} - \text{количество мертвых клеток})}{(\text{общее количество клеток})} \times 100\%.$$

При использовании предложенной нами методики мы получили 60,4% живых клеток после размораживания.

После трепанации кости черепа взрослых крыс в височной области под необходимым наркозом в стандартных условиях по методике, представленной в главе 2, наносилась ЧМТ. В дальнейшем проводилась интрапа-

ренхимальная трансплантация фрагментов ЭНТ по той же методике, что и в главе 3. В ходе эксперимента было произведено 28 подобных операций. Одну группу животных забивали через 10, другую — через 15 дней после опыта. Было приготовлено 340 гистологических микропрепаратов из зоны трансплантации, окрашенных гематоксилин-эозином.

Через 10 дней после проведенного эксперимента в толще коры головного мозга определяется кусочек трансплантированной ЭНТ. Трансплантат плотно прилегает к тканевым структурам коры головного мозга (рис. 4.48, см. цв. вклейку). На границе трансплантированной ткани со стороны головного мозга взрослых крыс определяется небольшое скопление лимфоидных клеток, а также слой нейроглиальных клеток, имеющих уплощенную форму (рис. 4.49, см. цв. вклейку). Со стороны оболочек головного мозга отмечается увеличение количества астроцитарной глии и небольшое количество лимфоидных клеток. Капилляры, артериолы и более крупные кровеносные сосуды, расположенные на границе трансплантата, характеризуются умеренным полнокровием, однако периваскулярного отека и миграции лейкоцитов не определяется. Между оболочкой головного мозга и трансплантатом довольно много нейроглиальных клеток, многие из них отростчатой формы, и с помощью отростков они образуют сетевидную структуру. Между нейроглиальными клетками встречаются округлой формы клетки лимфоидных структур. Среди нейроглиоцитов находятся артериолы, разветвляющиеся на капиллярную сеть, пронизывающую мозговую ткань.

Трансплантированный небольшой фрагмент эмбрионального мозга состоит из нейробластов и нервных клеток мультиполярной формы, а также астроцитарных глиальных клеток, преобладающих над количеством нервных клеток. Ядро мультиполярных нервных клеток имеет форму светлого пузырька с одним или двумя ядрышками, хроматин ядра мелкозернистый. Цитоплазма нервных клеток окрашивается базофильно, определяются нейрофибриллы и гранулы. Вокруг нервных клеток, а также их отростков выявляются нейроглиальные клетки.

Небольшой трансплантат эмбрионального головного мозга через 15 дней после эксперимента также вплотную прилегает к мозгу реципиента. Между трансплантатом и головным мозгом реципиента определяются полоска плотно расположенных глиальных клеток и единично расположенные лимфоидные клетки. В непосредственной близости от мозговой оболочки много глиальных клеток с единично расположенными нервными клетками, которые характеризуются светлым ядром, базофильной цитоплазмой и отростчатостью. Среди рыхло расположенных глиальных клеток проходят артериолы и капилляры. Кровеносные капилляры умеренного кровенаполнения, застой крови и инфильтрация лейкоцитов не определяются. Однако кровеносные сосуды, расположенные в непосредственной близости от оболочек

Рис. 4.1. Устройство для нанесения черепно-мозговой травмы в экспериментальных условиях



Рис. 4.2. Обширное кровоизлияние в зоне травмы головного мозга через день после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

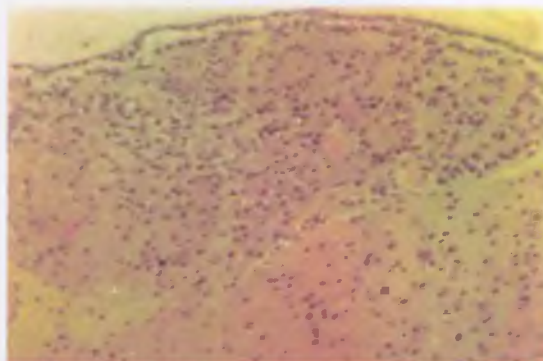


Рис. 4.3. Микроскопический осколок кости черепа и лейкоциты в зоне травмы головного мозга через день после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

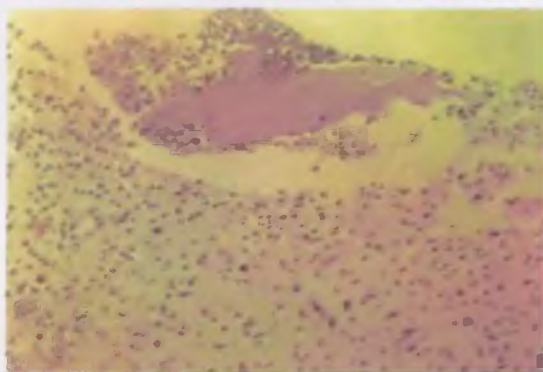
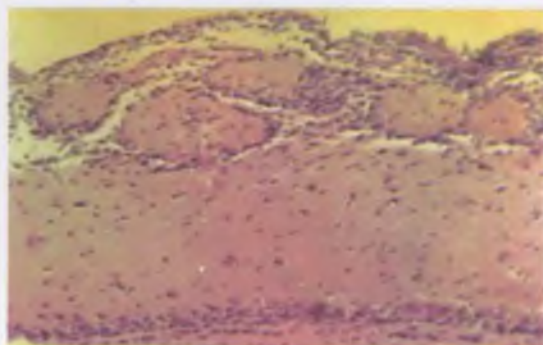


Рис. 4.4. Кровоизлияние и лейкоциты в зоне травмы через 3 дня после опыта.

Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20



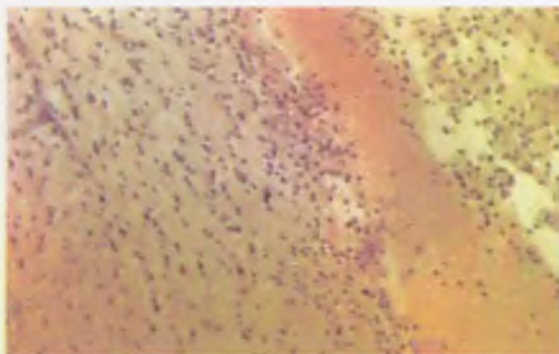


Рис. 4.5. Лейкоциты вдоль кровеносных сосудов через 3 дня после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

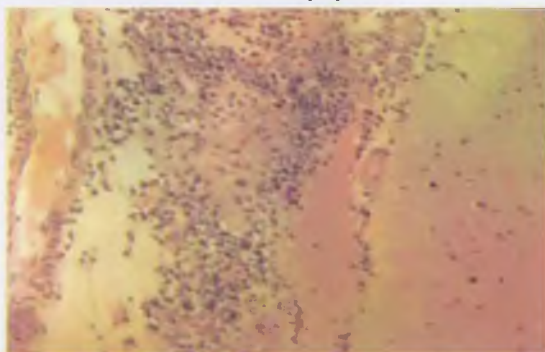


Рис. 4.6. Разрастание нейроглиальных и фибропластических клеток в зоне травмы головного мозга через 7 суток после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 7, об. 20

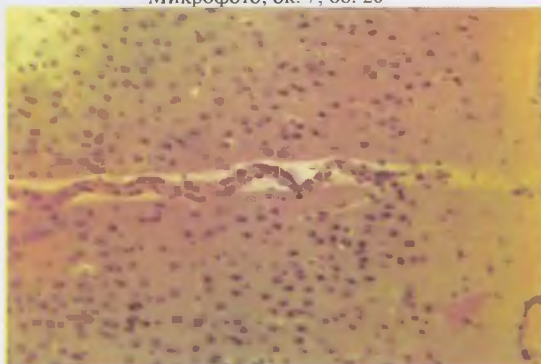


Рис. 4.7. Кровеносные капилляры в непосредственной близости от зоны травмы головного мозга через 7 суток после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

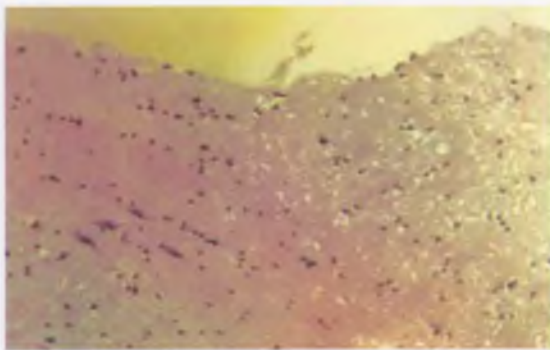


Рис. 4.8. Проплиферация нейроглиальных и фибробластических клеток в зоне травмы головного мозга. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

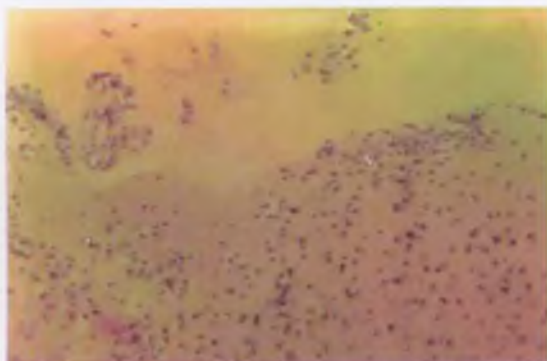


Рис. 4.9. Глиальные и лимфоидные клетки через 10 суток после травмы головного мозга. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

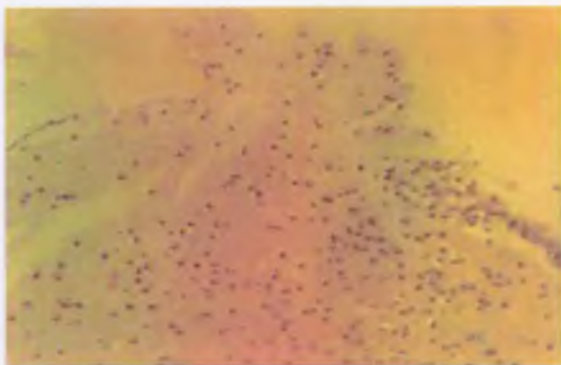


Рис. 4.10. Соединительнотканно-глиальный рубец в зоне травмы головного мозга через 10 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

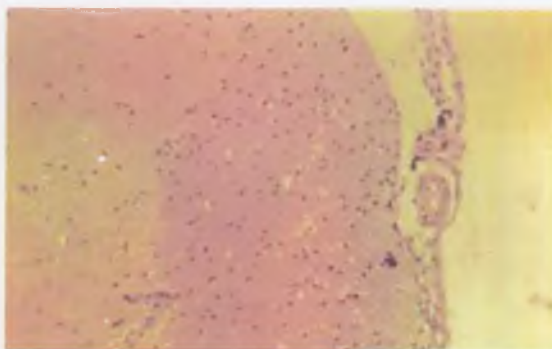


Рис. 4.11. Оболочка головного мозга с небольшой инфильтрацией лимфоидной ткани в зоне травмы головного мозга через 10 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

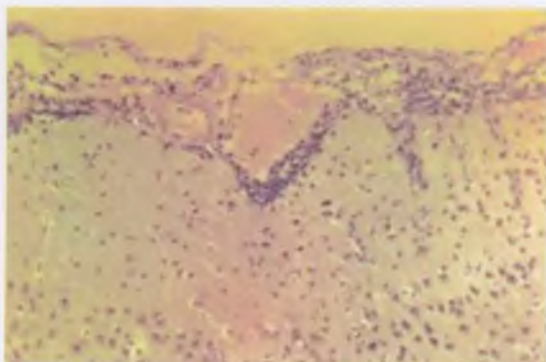


Рис. 4.12. Зона травмы головного мозга через 15 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

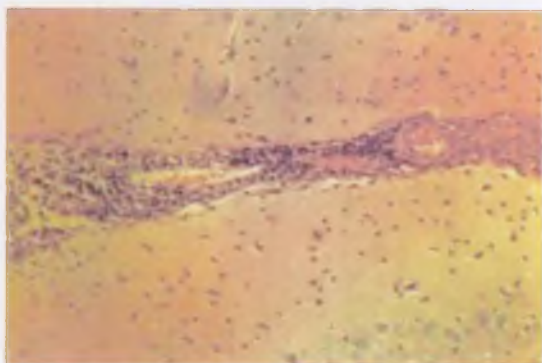


Рис. 4.13. Остеокласты и лейкоциты у осколка кости черепа в зоне травмы головного мозга через 15 дней после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90

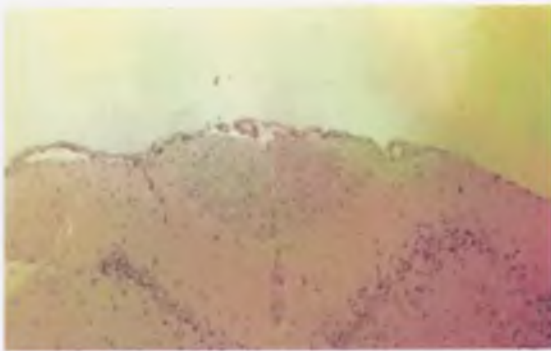


Рис. 4.14. Соединительнотканно-глиальный рубец через 20 дней после травмы головного мозга. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

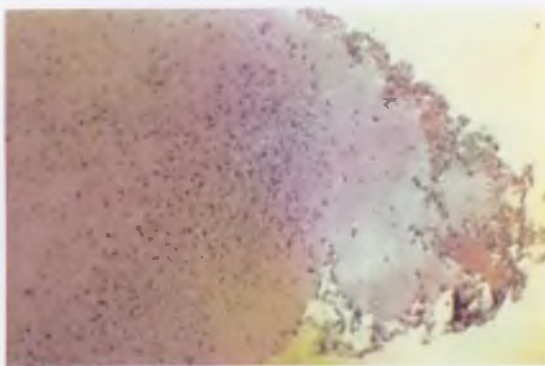


Рис. 4.15. Рубцовое образование на поверхности головного мозга через 30 дней после травмы. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

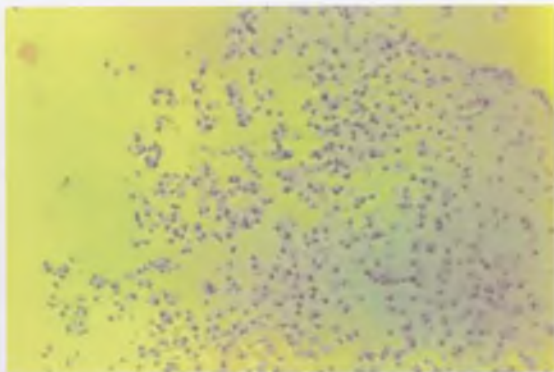


Рис. 4.16. Медуллобласты в зоне травмы головного мозга через день после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 7, об. 20

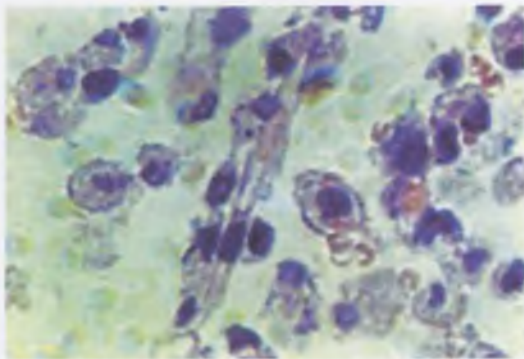


Рис. 4.20. Свободное расположение трансплантированных эмбриональных клеток в зоне травмы через сутки после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

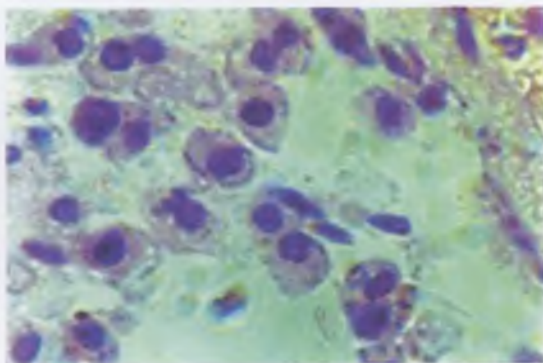


Рис. 4.21. Застой крови в капиллярах около травмы головного мозга. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

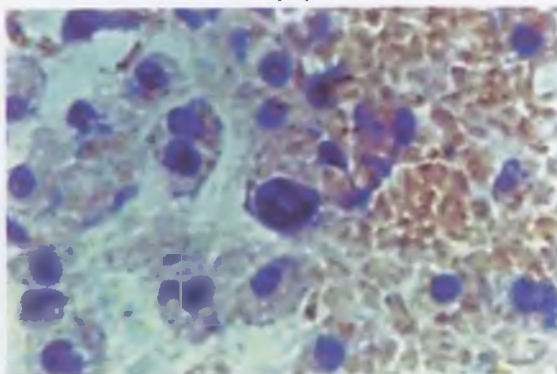


Рис. 4.22. Эмбриональные клетки трансплантата через 3 дня после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

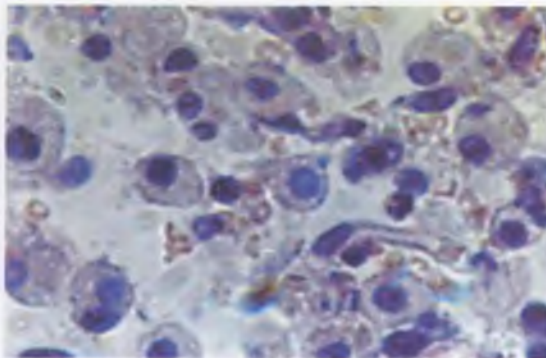


Рис. 4.23. Медуллобласты после трансплантации в зоне травмы головного мозга через 3 дня. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

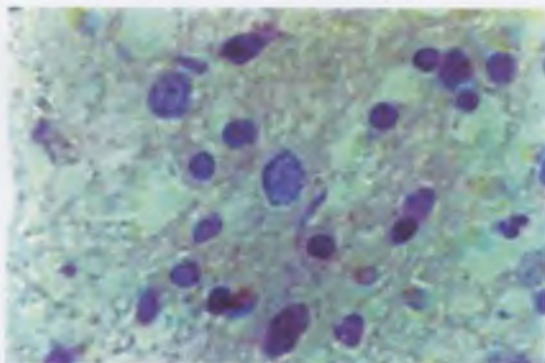


Рис. 4.24. Профаза митоза медуллобластов в трансплантате через 3 дня после трансплантации. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

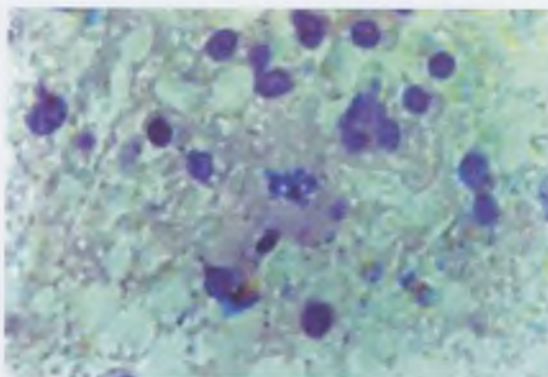


Рис. 4.25. Метафаза медуллобластов в трансплантате через 3 дня после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

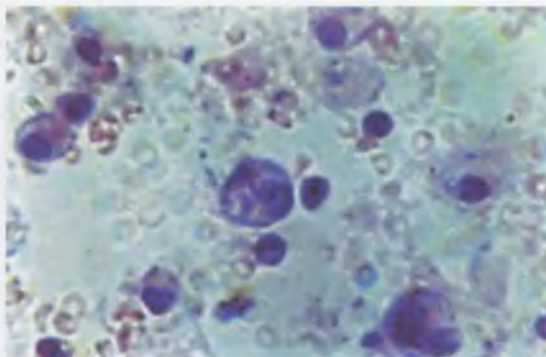


Рис. 4.26. Анафаза медуллобластов через 3 дня после трансплантации. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

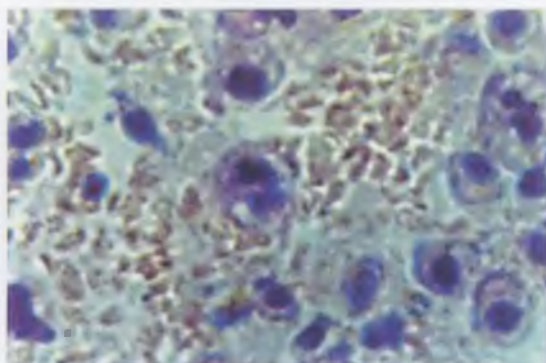


Рис. 4.27. Анафаза медуллобластов через 3 дня после эксперимента в зоне травмы. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

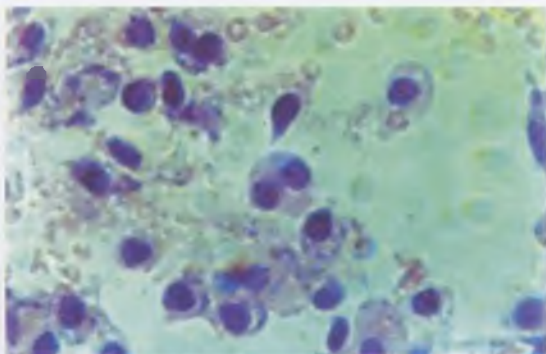


Рис. 4.28. Телофаза медуллобластов через 3 дня после трансплантации эмбриональной нервной ткани в зону травмы головного мозга. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

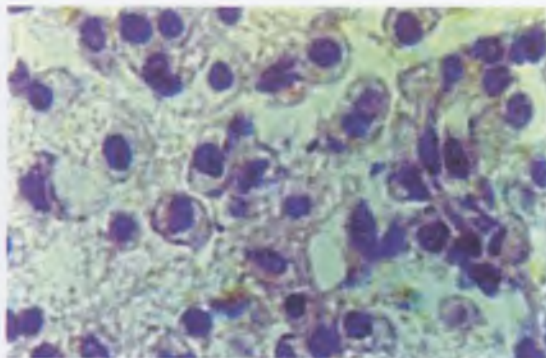


Рис. 4.29. Плотное расположение делящихся медуллобластов в непосредственной близости от кровеносного капилляра через 3 дня после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

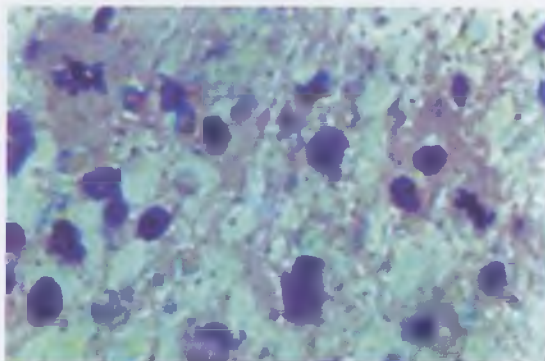


Рис. 4.30. Митоз медуллобластов трансплантата через 7 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

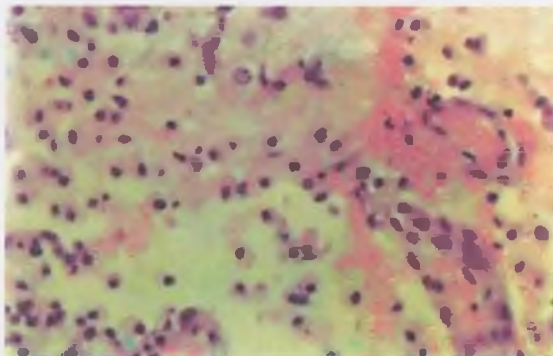


Рис. 4.31. Медуллобласты трансплантата с признаками дифференцировки и кровеносные сосуды реципиента через 7 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

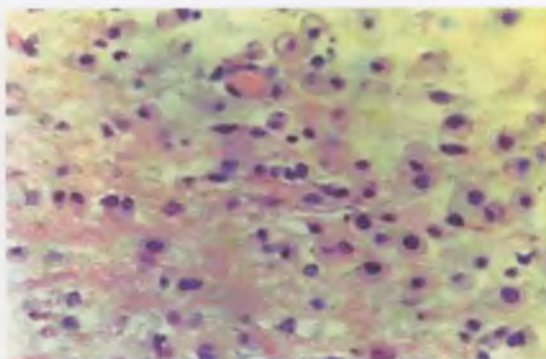


Рис. 4.32. Плотное расположение медуллобластов и кровеносных сосудов на границе с мозгом реципиента через 10 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

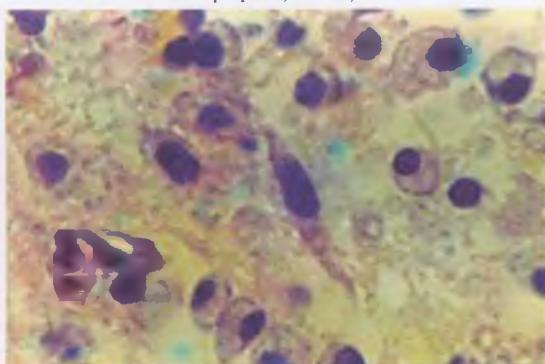


Рис. 4.33. Веретеновидные клетки в трансплантате мозга через 7 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

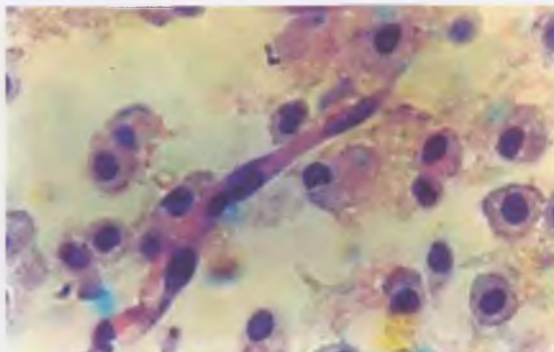


Рис. 4.34. Слияние веретеновидных клеток между собой в трансплантате эмбриональной нервной ткани через 10 дней. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

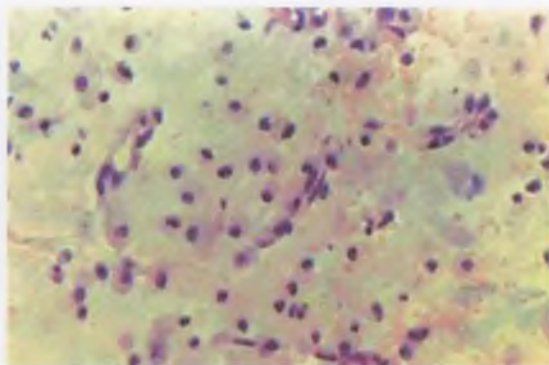


Рис. 4.35. Образование новых капилляров в трансплантате через 10 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

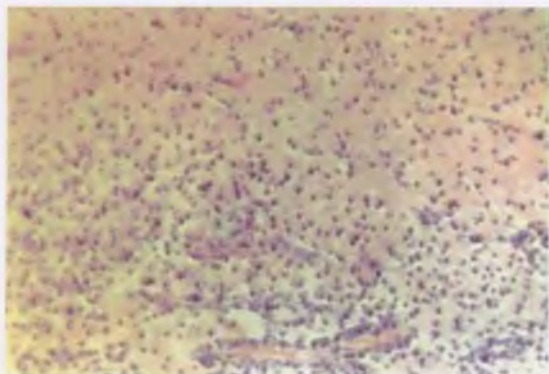


Рис. 4.36. Подрастание кровеносных капилляров из мозга реципиента в сторону трансплантата. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

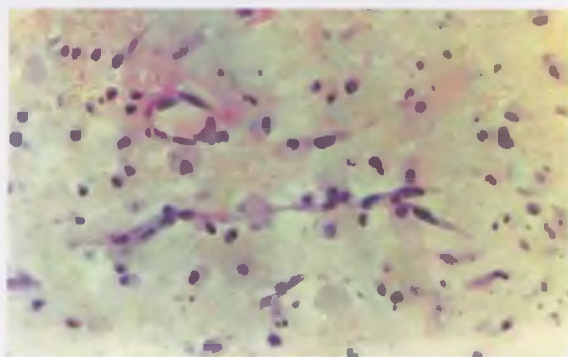


Рис. 4.37. Формирующаяся артериола и зачатки капилляров в трансплантате через 10 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

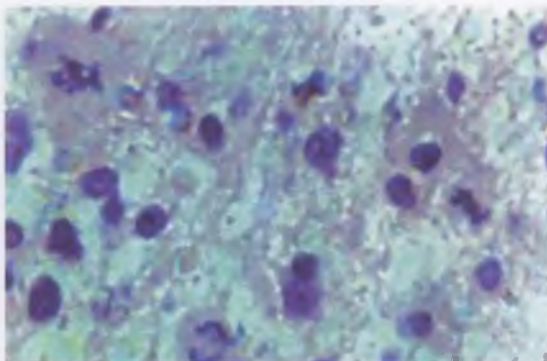


Рис. 4.38. Митоз медуллобластов трансплантата через 7 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

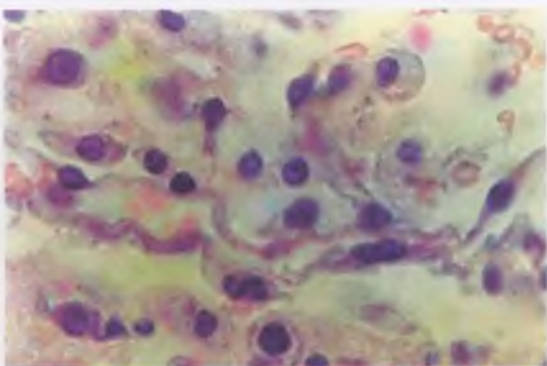


Рис. 4.39. Дифференцировка клеток и формирование кровеносных капилляров трансплантата через 10 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

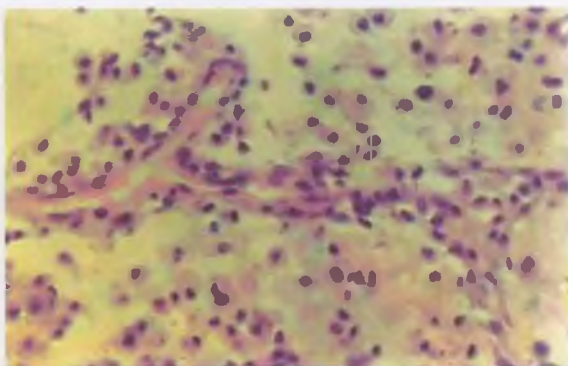


Рис. 4.40. Кровеносные сосуды трансплантата через 15 дней после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

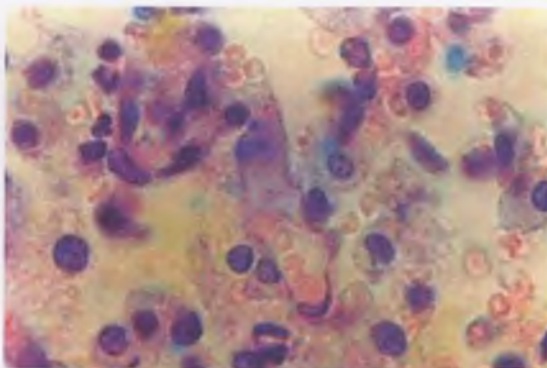


Рис. 4.41. Кровеносные капилляры трансплантата через 15 дней после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90

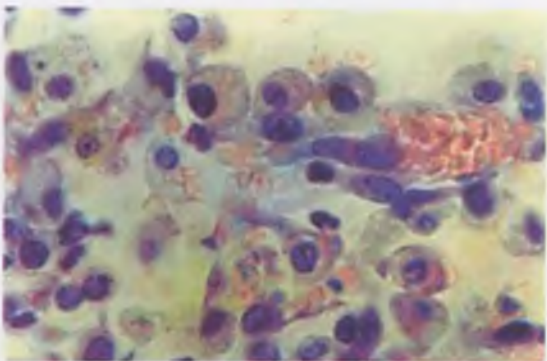


Рис. 4.42. Дифференцирующиеся клетки трансплантата через 20 дней после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90

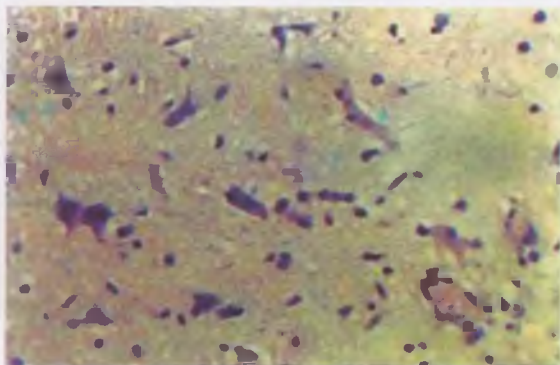


Рис. 4.43. Дифференцировка нейробластов и нейроглии в зоне расположения трансплантата через 20 дней после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 7, об. 20

Рис. 4.44. Образование клеточных тяжей в зоне трансплантата через 20 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 20

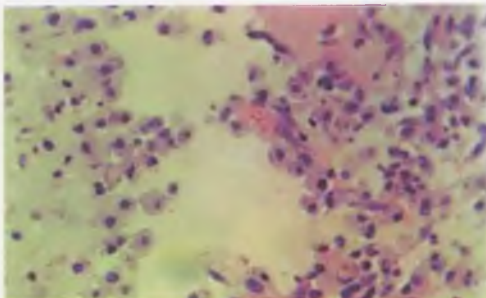


Рис. 4.45. Клеточные тяжи трансплантата через 20 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90

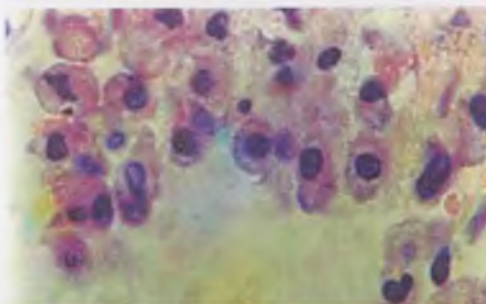


Рис. 4.46. Артериола среди клеток трансплантата через 20 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

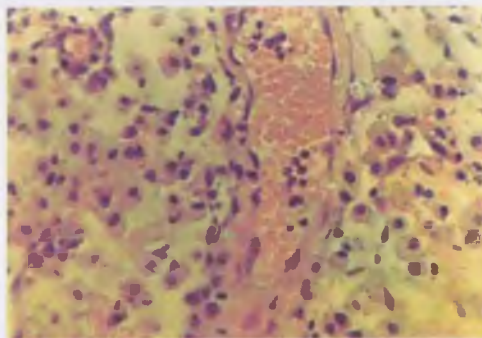
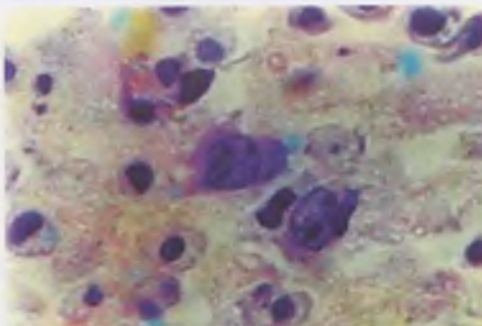


Рис. 4.47. Нервные клетки и астроциты трансплантата через 30 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 90



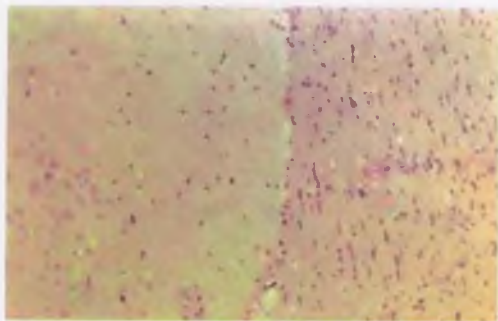


Рис. 4.48. Трансплантат (слева) эмбрионального мозга через 10 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 7, об. 20

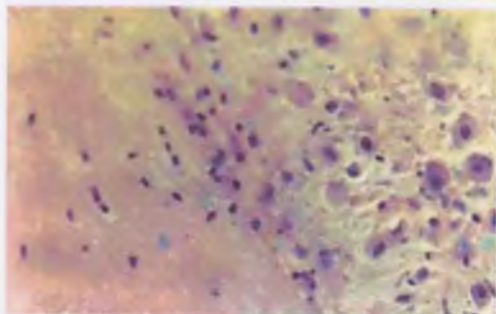


Рис. 4.49. Небольшое количество лимфоидных и нейроглиальных клеток на границе трансплантата через 10 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

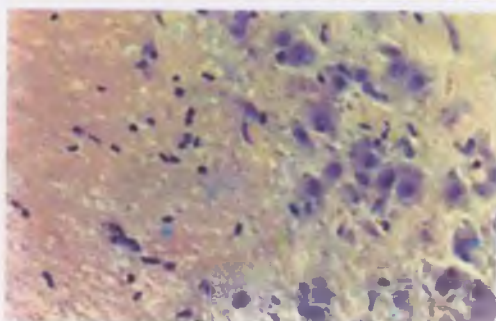


Рис. 4.50. Трансплантат (слева) эмбрионального мозга и мозг взрослого животного через 15 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

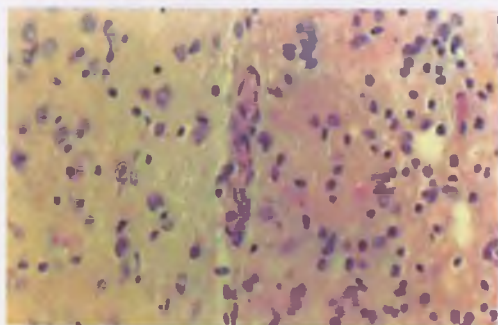


Рис. 4.51. Дифференцировка нервных клеток и нейроглии трансплантата (слева) через 15 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото, ок. 10, об. 40

мозга, характеризуются небольшими застойными явлениями. Трансплантат состоит из нейробластов, нервных клеток и нейроглии. Нервные клетки трансплантата располагаются достаточно плотно, все они отростчатой формы, как цитоплазма, так и ядро окрашиваются базофильно, ядро имеет округлую или овальную форму. С помощью отростков нервные клетки соединены между собой, среди нервных клеток расположены нейроглиальные структуры, участвующие в образовании синаптических контактов (рис. 4.50, 4.51, см. цв. вклейку).

Таким образом, при трансплантации кусочков эмбриональной ткани, подвергнутых глубокому длительному замораживанию с последующим их размораживанием, определяется полная жизнеспособность тканевых структур. Эмбриональные нейробласты и нервные клетки, в отличие от нейронов взрослых крыс, характеризуются более выраженной базофилией цитоплазмы и ядра, указывающей на их жизнеспособность и постепенное восстановление жизнедеятельности. Как нейробласты и нервные клетки, так и нейроглия трансплантата характеризуются отчетливым определением мембранных структур клеток. Хроматин ядра крупнозернистый, окрашивается базофильно, определяется ядрышко. Цитоплазма нервных клеток также красится базофильно, что указывает на высокое содержание рибосомальных РНК. В трансплантате определяется прорастание кровеносных сосудов из окружающих тканевых структур головного мозга, прежде всего со стороны мозговых оболочек, где количество кровеносных капилляров больше, чем в других участках трансплантата. Прорастающие кровеносные капилляры проходят между нервными и глиальными клетками, часть из них образует разветвления. Все эти морфологические особенности указывают на то, что в трансплантированном кусочке головного мозга восстанавливается кровообращение, а следовательно, и функциональная деятельность.

Включение трансплантата в общее кровообращение головного мозга является первым этапом его приживания. Ведь за формированием общего кровообращения следует активизация функциональной деятельности всех клеточных структур пересаженной ткани, о чем свидетельствует четкость морфологического строения и высокая базофилия нейробластов и нервных клеток, т. е. их готовность к делению митозом и дифференцировке.

Таким образом, при повреждениях головного мозга создаются вполне благоприятные условия для трансплантации ЭНТ. Трансплантат не только восстанавливает утраченную часть головного мозга, но и препятствует разрастанию соединительнотканно-глиальной рубцовой ткани.

Из проведенных исследований можно сделать вывод о том, что все морфологические признаки трансплантата после глубокого замораживания, включая восстановление общего кровообращения, указывают на жизнеспособность всех его клеточных структур.

Предложенная методика криоконсервирования, хранения и размораживания трансплантата может быть рекомендована для создания банка эмбриональной нервной ткани при клинической апробации.

Таким образом, экспериментальное исследование показало:

1. Предложенная методика экспериментальной модели тяжелой черепно-мозговой травмы позволяет с высокой точностью в стандартных условиях воспроизводить повреждения, сходные с таковыми при тяжелой черепно-мозговой травме.
2. При использовании традиционной активной хирургической тактики лечения тяжелых черепно-мозговых травм длительно сохраняется воспалительная реакция, происходит неполная заместительная регенерация в зоне повреждения головного мозга с формированием соединительнотканно-глиального рубца.
3. После трансплантации эмбриональной нервной ткани в зону повреждения головного мозга при тяжелой черепно-мозговой травме наблюдаются быстрое стихание воспалительной реакции, восстановление кровообращения за счет новообразования сосудов трансплантата и подрастания сосудов мозга реципиента, полноценная структурно-функциональная регенерация поврежденного мозга без формирования соединительнотканно-глиального рубца. Происходят приживление, пролиферация и дифференцировка клеток трансплантата и репарация поврежденных клеток мозга реципиента.
4. Трансплантация криоконсервированной эмбриональной нервной ткани при тяжелой черепно-мозговой травме не уступает использованию свежеизолированного донорского материала по полноте приживления и влиянию на течение процессов регенерации. Предложенная методика криоконсервирования, хранения и размораживания фрагментов эмбриональной нервной ткани позволяет создать банк донорского материала для дальнейших исследований и клинической апробации.
5. Трансплантация эмбриональной нервной ткани в очаг размозжения головного мозга при тяжелой черепно-мозговой травме в эксперименте имеет значительные преимущества перед традиционной хирургической тактикой лечения данной категории больных и может быть предложена для клинического применения.

Глава 5.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

5.1. Лечение хронических сосудистых заболеваний нижних конечностей: состояние проблемы

Актуальность рассматриваемой темы обусловлена тем, что, несмотря на успехи медицинской науки последних лет, в том числе сосудистой хирургии, вследствие старения населения количество пациентов с хронической ишемией нижних конечностей увеличивается с каждым годом, что является одной из главных проблем здравоохранения всех экономически развитых стран мира. Атеросклероз как одна из основных причин развития заболеваний системы кровообращения поражает в той или иной степени все артериальные бассейны. В России не менее 3% населения страдает атеросклерозом, на долю болезней системы кровообращения приходится до 55% всех случаев смерти; следовательно, проблема лечения облитерирующих заболеваний артерий важна с медицинской, социальной и экономической точек зрения (Белов Ю.В. с соавт., 2002). Обращает на себя внимание то, что в Российской Федерации ежегодно выполняется не менее 20 тыс. ампутаций (Золотов Г.К., 2004). По поводу критической ишемии в США каждый год проводится до 28 ампутаций на 100 тыс. населения, причем после реконструктивных операций на сосудах их количество увеличивается. По прогнозам американских ученых, в стране будет продолжаться неуклонный рост числа больных с хронической ишемией нижних конечностей, и к 2050 г. в США уже будет более 10 млн таких больных (Mark A. Robbins, Eric A., 1998). Наиболее серьезным осложнением данной патологии является некроз тканей в зоне поражения сосудистого русла, ведущий к ампутации конечностей. Несмотря на развитие и усовершенствование хирургического лечения данной категории больных, результаты проведенного лечения нельзя назвать обнадеживающими. Положение усугубляется тем, что основным контингентом являются пациенты старше 50 лет с тяжелой сопутствующей соматической патологией. Становится очевидным, что необходимо искать другие варианты лечения данной патологии для получения клинического эффекта. Увеличение частоты развития хронической ишемии нижних конечностей в человеческой популяции, неудовлетворительные результаты хирургического лечения заставляют специалистов разрабатывать принципиально новые, доступные и эффективные методы лечения данной патологии.

Другой не менее важной проблемой являются трофические язвы (ТЯ) венозной этиологии в сочетании с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей, что также является важнейшей медико-социальной проблемой современного общества в связи с большим распространением этой патологии (Протопопов С.П., 1950; Гостищев В.К. с соавт., 1991; Burton C.S., 1993). Имеющиеся на сегодня методики лечения венозных язв не могут быть применены у данной группы пациентов.

Анализ причин показывает, что среди этиологических факторов развития язв большой процент приходится именно на хроническую венозную недостаточность нижних конечностей (Nemes F., 1986), которой, по данным разных авторов, страдает от 2 до 15–60% взрослого населения высокоразвитых стран мира (Иванов В.В., 1992; Сашикова В.Г., 1995; Гавриленко А.В., 1999; Магомедов А.Г. с соавт., 2000; Wrigt D. et al., 1988; Trabucchi E. et al., 1994; Bello Y.M., 1998). В стадии декомпенсации венозного кровообращения в дистальных отделах конечностей у 60–70% нелеченных больных возникают ТЯ (Иванов В.В., 1992; Джитава И.Г., 1994; Cornwall J.V. et al., 1986). Несмотря на очевидный прогресс в диагностике и лечении заболеваний вен нижних конечностей, распространенность ТЯ сосудистого генеза остается своего рода константой (1–2% взрослого населения), выявляемой в результате многочисленных исследований на протяжении последних 30 лет (Вин Ф., 1998; Савельев В.С. с соавт., 2000). В 10–67% случаев пациенты данной группы становятся инвалидами и на длительное время теряют трудоспособность (Аскерханов Р.П., 1975; Юпатов С.И. с соавт., 1990; Хохлов А.М., 1998; Wrigt D. et al., 1988; Cornwall J.V. et al., 1986). Вместе с тем наличие ТЯ у 81% больных этой группы приводит к нарушению качества жизни, которое проявляется в наличии постоянных или периодически возникающих болевых ощущений, ограничении подвижности, органических и косметических нарушениях (Phillips T. et al., 1994; Krasner D., 1998). Безуспешное, изнуряющее и нередко нерациональное лечение приводит к развитию таких осложнений, как экзема и дерматит, которые встречаются у 43,4–48% больных (Васютков В.Я., 1993). Кроме того, длительное, иногда годами протекающее лечение приводит к значительным финансовым затратам, которые превращают проблему лечения ТЯ в социально-экономическую (Benbow M., 1995).

Независимо от формы ХВН в ее основе лежит венозная гипертензия, обусловленная клапанной недостаточностью перфорантных, глубоких и поверхностных вен. Венозная гипертензия приводит к нарушению микроциркуляции, тканевой гипоксии и активации лейкоцитов с выбросом ими лизосомальных ферментов. В результате значительно страдают трофика и защитные свойства кожи. При ее повреждении развивается некроз с массивным экссудативным процессом. В дальнейшем происходит быстрая бактериальная контаминация возникшей трофи-

ческой язвы с прогрессированием воспаления и некротических процессов не только в коже, но и в глубже лежащих тканях (Бауэрзакс Ж., 1998; Dormandy J.A., 1997; Nelzen O., 1996). С учетом патогенеза ХВН в основе лечения трофических язв должны быть действия, направленные на устранение или максимальное снижение флебогипертензии. Наиболее радикальными из них являются хирургические вмешательства, направленные на устранение горизонтального и вертикального рефлюксов и, в ряде случаев, на ликвидацию клапанной несостоятельности глубоких вен (Masuda E.M., 1994; Raju S., 1997).

Однако операции при активной трофической язве в условиях отека, индурации и воспаления кожи и подкожной клетчатки, близости инфицированной раны, во-первых, сложны технически, сопровождаются значительной операционной травмой, а во-вторых, чреваты гнойными осложнениями и несостоятельностью швов, и, что самое главное, обязательная эластичная компрессия нижних конечностей в раннем послеоперационном периоде не может быть применена у данной группы пациентов. Появление видеоэндохирургической технологии ликвидации горизонтального рефлюкса (SEPS — Subfascial Endoscopic Perforant Surgery), к сожалению, также не решило проблему окончательно — частота рецидивов посттромботических трофических язв после SEPS высока (Glovinczki P. et al., 1999). Выполнение оперативного вмешательства после заживления трофических язв предпочтительно, но часто оказывается противопоказанным в связи с сопутствующим атеросклеротическим поражением артериального русла. Поэтому актуальной следует считать задачу разработки эффективных технологий в местном лечении трофических язв. К таковым можно отнести клеточную терапию, которая с успехом использовалась в лечении ожогов (Глушенко Е.В., 1994; Парамонов Б.А., 2000).

Согласно современным представлениям, физиологическая регенерация тканей взрослого организма и их репарация в случае повреждения осуществляются при участии низкодифференцированных клеток-предшественников или стволовых клеток. Основными источниками стволовых клеток являются костный мозг и селезенка, способные, в дополнение к своим основным гемопоэтическим функциям, генерировать клетки-предшественники большого числа тканей организма.

В связи с полученными данными возникло предположение о возможности клеточной терапии критической ишемии конечностей у больных, которым невозможно выполнить реконструктивную операцию. В последнее время такие исследования проводятся по всему миру, первые результаты которых опубликованы в 2002 г. японскими учеными. Полученные ими данные показали высокую эффективность данного метода лечения. Инструментальные показатели улучшились в той или иной степени у всех пациентов, получавших трансплантацию клеток костного мозга, в отличие от «контрольных конечностей»,

где сохранялись исходные цифры. Основными критериями терапии были перфузионный индекс, чрескожное давление кислорода и боли в покое. Боли в покое уменьшились у 80% пациентов после трансплантации клеток костного мозга (Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T. et al., 2002). Однако в Российской Федерации публикации по данной теме единичны, больше затрагивая проблему использования аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда (Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онищенко Н.А. и др., 2003). Также нам не встречались публикации об использовании стволовых клеток селезеночной ткани, которые могут явиться альтернативой клеткам костного мозга в качестве возможного источника стволовых клеток, на что указывают публикации ряда авторов (Тимербулатов В.М., Фаязов Р.Р., 2003). Кроме того, на данном этапе не установлены оптимальные виды клеток-предшественников, способствующие более выраженному ангиогенезу и менее опасные в плане развития опухолевых заболеваний. Как известно, фибробласты представляют систему клеток, отличающихся по степени дифференцировки, морфологическим и функциональным характеристикам. Фибробласты оказывают регулирующее влияние не только на другие клетки соединительной ткани, но и на другие ткани организма, в том числе на скелетную мускулатуру. Мало-дифференцированные фибробласты, в том числе миофибробласты, способны к пролиферации путем стимулирования функциональной активности дифферона фибробластов, в том числе эндотелиоцитов как производных мезенхимных клеток. В последние годы разрабатываются методы стимуляции восстановления структуры поврежденных скелетных мышц путем введения в них миосателлитоцитов. Пролиферация миосателлитоцитов при травмах мышечных волокон происходит под влиянием митогенных факторов, выделяемых поврежденными волокнами. К активации системы миосателлитоцитов, а следовательно, к стимулированию регенерации скелетной мышечной ткани самое непосредственное отношение имеют фибробластические клетки, сопровождающие очень тонкие кровеносные капилляры, расположенные между мышечными волокнами. Тогда как пролиферация и стимуляция синтетической активности фибробластов приводит к активации образования и роста кровеносных капилляров (ангиогенезу).

5.2. Моделирование вариантов клеточной терапии при ишемии нижних конечностей в эксперименте

Экспериментальное исследование выполнено в специально оборудованной операционной (виварий БГМУ) на 200 белых половозрелых крысах линии Вистар с массой от 150 до 200 г. Операции на животных производились под эфирным наркозом при строгом соблюдении пра-

вил асептики и антисептики, с использованием методов эвтаназии в соответствии с Правилами проведения работ с экспериментальными животными. Материал исследования был подразделен на четыре группы. В 1-й и 2-й группах исследование проводилось с достижением критической ишемии нижних конечностей у крыс путем перевязки подвздошной и подколенной артерий с их пересечением (рис. 5.1, см. цв. вклейку).

Лабораторные животные были поделены на группы следующим образом: 1-я группа ($n = 30$), которой не проводили лечения, и 2-я группа ($n = 70$), которая была разделена на две подгруппы *A* и *B* по 35 половозрелых крыс в каждой. **2А группе** животных на 30-е сутки после начала эксперимента была выполнена аллотрансплантация клеточных культур селезеночной ткани взрослой особи. **2В группе** была выполнена аллотрансплантация клеточных культур селезеночной ткани зародышей, извлеченных у беременной крысы, сроком в 18–20 дней. Введение выращенных клеточных культур селезеночной ткани в область ишемии проводилось путем внутримышечного обкалывания (объемом 2 мл). Летальных исходов среди лабораторных животных, подвергшихся хроническому опыту, не было. Биоптаты на гистологию были взяты через 30 суток после проведенного эксперимента во всех группах.

В 1-й группе на 30-е сутки после перевязки артерий у животных наблюдалось снижение двигательной активности, на ощупь температура пораженной конечности отличалась от здоровой; при ходьбе крысы волокли конечность, некоторые хромали. По истечении 60-х суток явления ишемии сохранялись у 50% животных, после 90-х суток явления ишемии купировались у основной части лабораторных животных.

Во 2-й группе (*A* и *B*) на 30-е сутки после перевязки артерий и проведенной клеточной терапии у животных наблюдалась противоположная контрольной группе картина. Лабораторные животные стали более подвижны, при ходьбе стали сгибать ишемизированную конечность. К 90-м суткам ишемизированная конечность практически не отличалась от здоровой.

В 3-й и 4-й группах животных (по 50 белых крыс) было выполнено оперативное вмешательство в виде перевязки подвздошных артерий и вены с иссечением кожного лоскута на нижней конечности с целью вызвать изменения кожных покровов в виде трофической язвы нижних конечностей. В 3-й группе после проведенного вмешательства была выполнена аллотрансплантация культуры тканей зрелых фибробластов в зону вызванной ишемии, в контрольной группе данное вмешательство не выполнялось. В связи с тем что в мировой литературе все чаще появляются данные о развитии злокачественных новообразований при проведении клеточной терапии, особенно при проведении нескольких пассажей клеточных культур вне организма (в связи с изменением структуры ДНК), нами проводилась трансплантация алло-

женных культур клеток зрелых фибробластов после однократного пассажа. Каждая из групп была разделена на две части (А и В). Через 30 суток после проведения оперативного вмешательства был взят кусочек скелетной мышечной ткани из нижних конечностей (контрольная группа 4А). У 3-й группы животных также на 30-е сутки после перевязки сосудистого пучка и трансплантации фибробластов была взята гистология (основная группа А). Животные 3-й группы В и 4-й группы В после эксперимента были забиты на 60-е сутки.

Кусочки исследованной ткани были размерами 0,5 x 0,5 см, фиксировались в 10% растворе формалина, и после соответствующей гистологической проводки готовились срезы толщиной 7 мкм и окрашивались гематоксилин-эозином.

5.3. Морфологическая характеристика клеточной терапии при экспериментальной ишемии нижних конечностей

У первой экспериментальной группы животных среди мышечных волокон скелетного типа встречаются крупные клетки с выраженной цитоплазмой по сравнению с объемом ядра, т. е. отклонение ядерно-цитоплазматического соотношения в сторону цитоплазмы (рис. 5.1.в, см. цв. вклейку). Цитоплазма характеризуется базофильным оттенком и равномерным расположением вакуолеподобных структур (более светлая зона цитоплазмы). Ядро округлой или овальной формы с гомогенным расположением хроматина.

Такие клетки могут располагаться одиночно или небольшими группами вдоль кровеносных капилляров поперечно-полосатых мышечных волокон. В непосредственной близости от таких клеток могут быть единичные лейкоциты. Клетки с базофильной цитоплазмой встречаются по ходу кровеносных капилляров, расположенных поперек мышечных волокон (рис. 5.2, см. цв. вклейку).

При этом клетки плотно прилегают к поверхности кровеносных капилляров. Однако полнокровие мелких кровеносных сосудов остается умеренным. Подобные клетки выявляются не только среди адвентициальных клеток эндомизия, но и в составе перимизия и даже эндомизия. Количество овальной или округлой формы клеток с базофильной цитоплазмой в составе мышечной ткани увеличивается, они плотно прилегают к эндотелиоцитам или образуют клеточный тяж, создавая продолжение капилляров (рис. 5.3, 5.4, см. цв. вклейку).

Во многих случаях крупные, овальной или округлой формы клетки, тесно прилегающие к кровеносным капиллярам, формируют клеточные тяжи, составляя продолжение новообразованных капилляров (рис. 5.5, 5.6, см. цв. вклейку).

Клетки трансплантата встраиваются в цепь и составляют общий с эндотелиоцитами внутренний слой капилляра, при этом клетки приобретают уплощенную форму и плотно прилегают к эндотелиоцитам. Отмечается образование новых кровеносных сосудов при активном участии эндотелиоцитов и стволовых клеток, расположенных по ходу кровеносных капилляров. Это подтверждается делением эндотелиоцитов и трансплантированных клеток. Образование новых капилляров происходит со стороны имеющихся капилляров путем формирования почкообразных выступов в результате митотического деления как эндотелиоцитов, так и клеток трансплантата (рис. 5.7, 5.8, см. цв. вклейку).

По ходу кровеносных капилляров, особенно в зоне расположения артериол, определяется небольшое количество лимфоидных клеток, они располагаются в периваскулярной зоне и достаточно плотно прилегают к поверхности крупных сосудов (рис. 5.9, 5.10, см. цв. вклейку).

Следовательно, при трансплантации культуры эмбриональных клеток в мышечную ткань нижних конечностей через 30 дней после проведенного эксперимента определяется появление культуральных клеток между мышечными волокнами. Они могут располагаться отдельными клетками или небольшими группами и непременно вдоль кровеносных капилляров. При этом клетки с базофильной цитоплазмой тесно контактируют с эндотелиоцитами кровеносных сосудов. Взаимоcontactирующие клетки активно делятся митозом и формируют почкообразные выросты, являющиеся продолжением кровеносных капилляров. По мере роста эндотелиальной почки в цитоплазме появляются полости различного размера. Они, постепенно сливаясь, образуют просвет новых капилляров. Рост и образование новых капилляров осуществляется путем тесного контакта эндотелиоцитов с клетками трансплантата. Во многих случаях стволовые клетки располагаются в периваскулярном пространстве, однако они начинают встраиваться в клеточные тяжи и могут составить продолжение новых кровеносных капилляров. Такие слепо заканчивающиеся трубочки встречаются довольно часто между мышечными волокнами, иногда они растут навстречу друг другу и смыкаются концами. Кровеносные сосуды различного калибра, включая капилляры, сопровождаются ацидофильными клетками, однако они в небольшом количестве. Все виды кровеносных сосудов умеренного кровенаполнения.

У 2-й группы животных, забитых через 30 дней после проведенного эксперимента, также выявляются трансплантированные клетки между мышечными волокнами по ходу кровеносных сосудов (рис. 5.11, см. цв. вклейку).

Овальной или округлой формы клетки характеризуются базофильной цитоплазмой, четкой границей клетки, на фоне гомогенного хроматина всегда присутствует одно или два ядрышка. Такого рода клетки

сопровождают кровеносные капилляры, идущие поперек мышечного волокна, при этом они тесно контактируют с эндотелиоцитами кровеносных сосудов. Рыхлая соединительная ткань, сопровождающая кровеносные капилляры, содержит разнообразные клеточные структуры, включая лимфоидные клетки (рис. 5.12, 5.13, см. цв. вклейку).

Вместе с тем встречаются участки поперечно-полосатой мышечной ткани с большим количеством клеток культуры, сопровождающие как поперечно расположенные по отношению к мышечным волокнам кровеносные сосуды (рис. 5.14, 5.15, см. цв. вклейку), так и кровеносные сосуды, расположенные вдоль мышечных волокон (рис. 5.16, 5.17, см. цв. вклейку).

Во всех случаях кровеносные сосуды и скопления клеток трансплантата сопровождаются лимфоидными клетками умеренного количества.

У 2-й группы животных заметно увеличивается количество развивающихся кровеносных капилляров (рис. 5.18, 5.19, см. цв. вклейку).

Прежде всего образование новых сосудов происходит путем выпячивания стенки имеющихся капилляров или посткапиллярных венул либо даже артериол. При этом отмечается набухание цитоплазмы эндотелиоцитов, в толще выступа цитоплазмы появляются полости, которые сливаются и формируют просвет, увеличивающийся в направлении от просвета капилляров к периферии. Образование новых кровеносных капилляров является результатом митотического деления эндотелиоцитов. Вполне допустимо, что клетки трансплантации способствуют стимуляции деления эндотелиоцитов и тем самым активно участвуют в ангиогенезе мышечной ткани. Не исключается возможность участия клеток трансплантации в развитии и росте капилляров кровеносных сосудов путем клеточной индукции.

В зоне образования и формирования кровеносных капилляров поперечно-полосатой мышечной ткани на 30-е сутки эксперимента выявляются небольшие скопления клеток (рис. 5.20, см. цв. вклейку), в то же время встречаются участки мышечной ткани со значительным скоплением трансплантированных клеток, расположенных по ходу кровеносных сосудов (рис. 5.21, см. цв. вклейку), однако количество лимфоидных клеток как среди клеток трансплантата, так и по ходу кровеносных сосудов в умеренном количестве.

Тем не менее встречаются отдельные участки скелетной мускулатуры с умеренным количеством лимфоидных клеток по ходу кровеносных капилляров (рис. 5.22, см. цв. вклейку), они располагаются диффузно.

Вдоль крупных кровеносных сосудов мускулатуры скелетного типа существенного изменения определить не удалось, однако между мышечными волокнами встречаются отдельные клетки трансплантата (рис. 5.23, см. цв. вклейку).

Вдоль крупных венозных кровеносных сосудов мускулатуры скелетного типа встречаются разнообразные клеточные элементы и среди них небольшое количество лимфоидных клеток (рис. 5.24, см. цв. вклейку).

Сеть кровеносных сосудов различного калибра поперечно-полосатой мышечной ткани скелетного типа на 30-е сутки эксперимента остается без существенных изменений, кровеносные сосуды умеренно полнокровны, периваскулярная зона также без изменений (рис. 5.25, см. цв. вклейку).

Вместе с тем в окружающей рыхлой соединительной ткани кровеносные сосуды могут иметь определенное скопление лимфоидных клеток, однако они расположены диффузно и не прилегают к кровеносным сосудам (рис. 5.26, см. цв. вклейку).

Небольшое скопление лимфоидных клеток выявляется и в жировой ткани, прилегающей к мускулатуре скелетного типа (рис. 5.27, см. цв. вклейку), тем не менее в жировой клетчатке также наблюдается новообразование капилляров путем набухания цитоплазмы эндотелиоцитов в виде почки, и по мере роста эндотелиоцитарной почки в ней появляется полость, образование новых капилляров происходит везде со стороны существующих капилляров (рис. 5.28, см. цв. вклейку).

В соединительнотканной оболочке мышечной ткани скелетного типа встречаются небольшие группы клеток, очень напоминающие сидеробласты (рис. 5.29, см. цв. вклейку), при этом мышечные волокна — симпласт — остаются без существенных изменений.

Таким образом, при трансплантации стволовых клеток подопытным животным через 30 дней после эксперимента отмечается выраженный ангиогенез поперечно-полосатой мышечной ткани скелетного типа. Прежде всего новообразование капилляров обеспечивается за счет активного деления эндотелиоцитов. Этому способствуют трансплантированные эмбриональные (стволовые) клетки, расположенные вдоль кровеносных капилляров. Несомненно, появление полипотентных камбиальных клеток вдоль кровеносных капилляров способствует росту и развитию мелких кровеносных сосудов. По-видимому, в образовании мелких кровеносных капилляров мышечной ткани непосредственное участие принимают и клетки трансплантата. Во 2-й группе животных через 30 дней после проведенной операции отмечается особенно много новых кровеносных капилляров, расположенных в толще мышечной ткани. При этом заметно увеличивается количество клеток с базофильной цитоплазмой. Вполне вероятно, клетки трансплантата не только стимулируют рост и развитие новых кровеносных капилляров, но и сами активно специализируются и дифференцируются в эндотелиоциты. И в данном случае образование новых кровеносных капилляров происходит таким же путем, т. е. путем выпячивания цитоплазмы клеток с образованием полости в цитоплазме, их

слияния на протяжении клеточного выпячивания, выстраивания клеток друг за другом с последующей циркуляцией крови в полости новообразованных капилляров. Во всех исследованных группах как в крупных, так и в мелких кровеносных сосудах отмечалось умеренное полнокровие. На трансплантацию стволовых клеток реакции иммунокомпетентных клеток организма не отмечалось, за исключением появления незначительного количества лимфоидных клеток в мышечной ткани.

Скелетная мышечная ткань 4-й группы животных (30-е сутки, контрольная группа А) образована пучками поперечно-полосатых мышечных волокон. Они имеют цилиндрическую форму и располагаются пучками, окруженными рыхлой волокнистой соединительной тканью. В прослойках рыхлой волокнистой соединительной ткани располагаются кровеносные капилляры и нервные волокна. Миосимпластическая часть мышечного волокна образована ядрами, лежащими на периферии под сарколеммой, саркоплазма занимает центральную часть. Ядра симпласта овальной формы, светлые, определяются ядрышки. Миофибриллы располагаются продольно мышечному волокну в центральной части саркоплазмы. Миофибриллы каждого мышечного волокна имеют поперечную исчерченность, т. е. чередование светлых и темных дисков. Капиллярная сеть проходит в эндомизии вдоль волокон, соединяясь перемичками и формируя густую сеть капилляров. Кровеносные капилляры очень тонкие и с непрерывной эндотелиальной выстилкой, расположенной на базальной мембране, она также непрерывна. К кровеносным капиллярам с наружной стороны прилегают адвентициальные клетки. Вместе с тем у данной группы животных отмечается спазм кровеносных сосудов в силу нарушения кровообращения в результате перевязки брюшного отдела аорты. В подавляющем большинстве случаев капилляры не содержат форменных элементов крови. При этом эндотелиоциты имеют сильно вытянутую форму, ядра клеток веретенообразной формы. Микрососуды не имеют периваскулярного пространства, и, соответственно, мышечные волокна полностью прилегают друг к другу (рис. 5.30, см. цв. вклейку). Каких-либо деструктивно измененных структур в мышечной ткани не определяется. Каждые мышечные волокна покрыты базальной мембраной, между мышечными волокнами и базальной мембраной располагаются миосателлиты. У основной группы А после трансплантации культуры клеток зрелых фибробластов в область бедра через 30 суток определяются изменения гистологической структуры поперечно-полосатой мышечной ткани скелетного типа (рис. 5.31, см. цв. вклейку).

В целом мышечная ткань имеет такие же характерные особенности, что и у контрольной группы животных. Структурно-функциональные единицы образованы мышечными волокнами, где различают сарко-

лемму, многочисленные ядра, саркоплазму, миофибриллы, а также базальную мембрану. Ядра мышечных волокон имеют овальную форму с мелко распыленным хроматином, иногда определяется ядрышко. Мышечные волокна объединяются рыхлой волокнистой соединительной тканью, заложенной в виде тонких прослоек между отдельными мышечными волокнами. Рыхлая волокнистая соединительная ткань является местом расположения кровеносных капилляров и нервных волокон. Мышечное волокно имеет выраженную оболочку-сарколемму. Ядра симпласта всегда лежат в саркоплазме и занимают поверхностное положение, они имеют удлинённую форму и сравнительно бедны хроматином. Он расположен мелкими глыбками, на этом фоне ядрышки выделяются хорошо. Важной частью мышечного волокна являются миофибриллы, проходящие в продольном направлении — от одного конца к другому.

Исчерченность мышечного волокна обусловлена наличием изотропных и анизотропных дисков в самих миофибриллах. Толщина мышечных волокон имеет различный диаметр. Между сарколеммой и базальной мембраной мышечного волокна, состоящей из гликозаминогликанов и белков, располагаются миосателлиты, являющиеся источником регенерации скелетной мышечной ткани подопытных групп животных, в зоне введения фибробластов отмечается наличие небольшого количества лимфоидных клеток, вероятно, это ответная реакция на травму мышечного волокна (рис. 5.32, см. цв. вклейку). Здесь же определяется некоторое полнокровие и застой кровообращения в мелких кровеносных сосудах (рис. 5.33, см. цв. вклейку).

Клетки имеют веретенообразную или овальную форму с небольшим числом отростков. Характерной особенностью этих трансплантированных клеток является то, что они способны мигрировать по ходу кровеносных капилляров, особенно в большом количестве они появляются вокруг кровеносных капилляров, расположенных в поперечном направлении по отношению продольно расположенных мелких кровеносных сосудов (рис. 5.34, 5.35, см. цв. вклейку).

Миграция фибробластов, вероятно, осуществляется благодаря наличию в их цитоплазме сократимых микрофиламентов. Они способны к пролиферации, юные фибробласты оказывают митогенное действие на эндотелиальные клетки кровеносных капилляров и их функциональную активность (рис. 5.36, 5.37, см. цв. вклейку).

Регуляторное влияние трансплантата на другие клетки обеспечивается благодаря выработке гуморальных факторов, активно воздействующих на рост и функциональную активность эндотелиальных клеток кровеносных капилляров и миосателлитов (рис. 5.38, 5.39, см. цв. вклейку).

Таким образом, трансплантированные фибробласты оказывают локальное регуляторное воздействие. На пролиферацию миогенных кле-

ток-предшественников указывает увеличение количества ядер в саркоплазме мышечных волокон (рис. 5.40, см. цв. вклейку). Активированные миосателлитocyты концентрируются в непосредственной близости от кровеносных капилляров (рис. 5.41, см. цв. вклейку). Ядра миосателлитocyтов овальной формы, они светлые, хроматин мелкозернистый, встречаются делящиеся ядра.

Ядра малодифференцированных клеток, расположенных в саркоплазме мышечных волокон, могут иметь разное направление, но в большинстве случаев они ориентированы вдоль кровеносных сосудов независимо от того, в каком направлении идут кровеносные капилляры, вдоль или поперек мышечного волокна (рис. 5.42, см. цв. вклейку). Следовательно, отмечается физиологическая регенерация волокон скелетной мышечной ткани в нормальных условиях, т. е. без травмы мышечного волокна. Трансплантация фибробластов способствует самообновлению мышечных волокон, тем самым обеспечивает поддержание баланса между процессами пролиферации и возрастной деструкции скелетной мускулатуры. Не менее результативными являются пролиферативные процессы кровеносных капилляров скелетной мускулатуры. Прежде всего эндотелиocyты являются барьером, регулирующим обмен между кровью и мышечной тканью, проводящим различные вещества для трофики. Кровеносные капилляры всегда сопровождаются адвентициальными клетками, и среди них определяются фибробластические клетки с достаточно крупными и светлыми ядрами. Наличие юных фибробластов способствует образованию новых капилляров. При этом эндотелиocyты путем клеточного деления формируют тяж клеток конической формы. Рост капилляров всегда идет со стороны кровеносного капилляра. Вполне допустимо, что в образовании новых капилляров активное участие принимают и сами юные фибробластические клетки совместно с адвентициальными клетками. Аналогичным же образом эти клетки формируют клеточные тяжи, отходящие от имеющихся капилляров, с образованием просвета и превращением их в эндотелиocyты (рис. 5.43, см. цв. вклейку).

Регуляция деятельности фибробластов осуществляется факторами, вырабатываемыми эндотелиocyтами, форменными элементами крови, а также различными гормонами, все эти факторы взаимовлияния направлены на поддержание структурной организации скелетной мышечной ткани.

Через 60 суток (контрольная группа животных) после перевязки брюшного отдела аорты определяются изменения гистологической структуры скелетной мышечной ткани. В основной массе скелетная мышечная ткань имеет типичное строение. Поперечно-полосатая скелетная мышечная ткань имеет пучковое строение, различают пучки 1-го, 2-го и 3-го порядков, окруженные эндомизием, перимизием и эпимизием. В соединительной ткани проходят кровеносные капил-

ляры и нервные волокна. Следовательно, скелетная мышечная ткань состоит из мышечных волокон и соединительной ткани с кровеносными сосудами и нервными волокнами. Структурной единицей скелетной мышечной ткани также является мышечное волокно, состоящее из миосимпласта и миосателлитов, они покрыты общей базальной мембраной. Мышечное волокно покрыто сарколеммой, в саркоплазме под сарколеммой располагаются ядра. Миофибриллы имеют продольное расположение по ходу мышечного волокна и заполняют основную часть миосимпласта. Каждая миофибрилла имеет поперечные светлые и темные диски с неодинаковым лучепреломлением (изотропные и анизотропные). В очень тонкой рыхлой соединительной ткани, окружающей мышечные волокна, проходят кровеносные капилляры и нервные волокна. По ходу кровеносных капилляров определяются небольшие участки с лимфоидными клетками (рис. 5.44, см. цв. вклейку), которые имеют чаще всего овальную форму, хроматин плотный, цитоплазма слабо выражена. Они наиболее отчетливо выделяются по ходу кровеносных капилляров, расположенных под углом или в поперечном направлении по отношению к мышечным волокнам (рис. 5.45, см. цв. вклейку).

У 4-й группы животных на 60-е сутки после перевязки и трансплантации юных фибробластов поперечно-полосатая мышечная ткань скелетного типа в целом остается без выраженных морфологических изменений. Однако остаются отдельные очаги воспалительного процесса, проявляющегося в виде небольшого скопления лимфоидных клеток между мышечными волокнами или в непосредственной близости от более крупных кровеносных сосудов. Поперечно-полосатые волокна состоят из сарколеммы, саркоплазмы и многочисленных ядер, расположенных под сарколеммой. В саркоплазме определяются миофибриллы, расположенные по ходу мышечного волокна с поперечной исчерченностью. Между базальной мембраной и плазмолеммой, в углублениях мышечного волокна — в виде вытянутой формы и небольшого размера миосателлиты. Каждое мышечное волокно окружено очень тонкой рыхлой волокнистой соединительной тканью — эндомизием.

Трансплантированные фибробласты перемещаются по ходу кровеносных сосудов, среди трансплантированных фибробластических клеток выделяются лимфоидные ткани (рис. 5.46, см. цв. вклейку). С одновременным застоем крови в мелких кровеносных сосудах юные фибробласты оказывают стимулирующее действие на пролиферативные процессы как на миосателлиты, так и на эндотелициты (рис. 5.47, см. цв. вклейку).

В результате стимулирующего воздействия трансплантированных клеток на миосателлиты определяется митоз и увеличение ядер на органном участке саркоплазмы (рис. 5.48, см. цв. вклейку).

По-видимому, стимуляция дифференцированных клеток мышечных волокон способствует полному формированию новых мышечных волокон с малым диаметром. Вновь образованные мышечные волокна характеризуются увеличением количества ядер, расположенных друг за другом. Ядра таких мышечных волокон с плотным хроматином и, соответственно, окрашиваются интенсивно, они мало чем отличаются от ядер других, рядом расположенных симпластов. Кровеносные капилляры, расположенные в эндомизии, характеризуются очень малым просветом, где располагаются вытянутой формы эритроциты. Эндотелиоциты микрососудов также отличаются вытянутой формой. Ядра клеток имеют овальную форму, хроматин плотный, окрашивается интенсивно, базофильно. Сеть кровеносных капилляров, окружающих мышечные волокна, сопровождается как адвентициальными клетками, так и одиночными лимфоцитами, а также фибробластами и фиброцитами. В отдельных участках можно было определить все признаки формирования новых капилляров, когда со стороны капилляров формировались клеточные тяжы, преобразующиеся во вновь открывающиеся капилляры. Однако таких структур мало.

Вполне вероятно, что возникновение небольших очагов концентрации ядра мышечных волокон, а также признаков формирования новых кровеносных капилляров является результатом спазма ишемизированной мышечной ткани после прижатия брюшной части аорты подопытных животных даже на 60-е сутки эксперимента. В гистологических строениях мышечных волокон не определяется деструктивных процессов. В некоторой степени небольшое разрастание рыхлой соединительной ткани между мышечными волокнами может являться результатом недостаточного кровообращения скелетной мускулатуры. Вместе с тем отмечается увеличение количества более тонких мышечных волокон наряду со стандартного размера по толщине мышечных волокон, что является результатом ослабления метаболических процессов после спазма крупного сосуда.

Гистохимическое исследование гликогена в мышечной ткани 4-й подгруппы животных отмечает слабую реакцию в мышечных волокнах и несколько выше в эндомизии (рис. 5.49, см. цв. вклейку), в том числе в стенке кровеносных сосудов.

У 3-й подгруппы животных после трансплантации культуры фибробластов с перевязкой подвздошных артерии и вены реакция на гликоген в соединительнотканых прослойках умеренная (рис. 5.50, см. цв. вклейку). Гликоген определяется как в межклеточном веществе, так и в клеточных элементах, включая кровеносные сосуды различного калибра. Тем не менее гликоген распределяется неравномерно. Тонкая соединительнотканная прослойка с кровеносными капиллярами между мышечными волокнами имеет слабую гистохимическую реакцию.

Тогда как участки со значительно выраженными прослойками рыхлой соединительной ткани и открытыми (функционирующими) кровеносными капиллярами проявляют умеренную реакцию (рис. 5.51, см. цв. вклейку).

В 4-й группе животных по истечении 60 суток после оперативного вмешательства (контрольная группа) также сохраняется неравномерная гистохимическая реакция на гликоген. Участки со слабой реакцией на гликоген чередуются с участками с умеренной гистохимической реакцией (рис. 5.52, см. цв. вклейку).

У 3-й группы животных, получавших культуру фибробластов после перевязки подвздошных артерии и вены, в скелетной мышечной ткани определяется значительно высокая гистохимическая реакция на гликоген (рис. 5.53, см. цв. вклейку). Высокая реакция отмечается в зоне скопления ядер мышечных волокон (рис. 5.54, см. цв. вклейку), а также в местах расположения кровеносных капилляров, окруженных юными фибробластами. В целом гистохимическая реакция на гликоген остается неравномерной. Тонкая прослойка соединительной ткани между мышечными волокнами проявляет слабую реакцию на гликоген.

Таким образом, экспериментальные исследования с трансплантацией культуры фибробластов через 30 и 60 суток показали, что фибробласты оказывают стимулирующее влияние на камбиальную клетку (миосателлитоциты) мышечных волокон, а также на рост и развитие кровеносных капилляров (ангиогенез). В результате пролиферации юных фибробластов в трансплантируемой мышечной ткани, а также стимулирования и роста мелких кровеносных сосудов создаются все предпосылки для повышения процесса физиологической регенерации скелетной мышечной ткани. В результате трансплантации юных фибробластов, их усиленной пролиферации и активной деятельности различных клеточных структур создаются благоприятные условия для стимуляции митоза миобластических клеток (миосателлитоцитов), а также эндотелиоцитов кровеносных капилляров.

Проведенные измерения показателей микроциркуляции на стопе экспериментального животного с использованием лазерного доплерофлуометра ЛАКК 02 показали, что измеренные непосредственно до (рис. 5.55) и после (рис. 5.56) проведенного оперативного вмешательства показатели микроциркуляции резко снижаются, практически отсутствует движение эритроцитов в капиллярном русле. Через два месяца после проведенного оперативного вмешательства наблюдается восстановление показателей микроциркуляции, которые, однако, не достигают исходного уровня (рис. 5.57). В то же время в основной группе происходит более интенсивное восстановление показателей микроциркуляции по сравнению с контрольной группой (рис. 5.58).

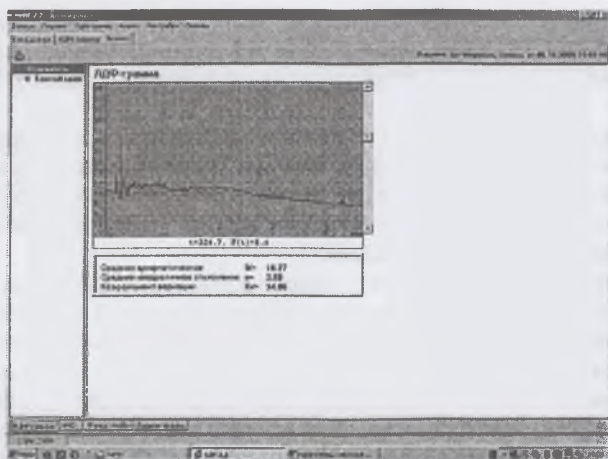
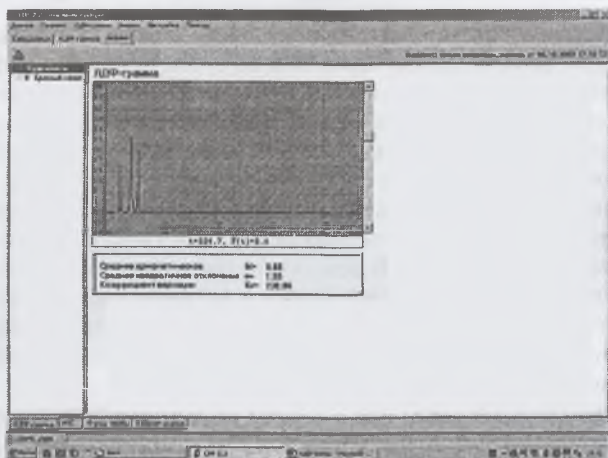


Рис. 5.55. Показатели микроциркуляции конечности при экспериментальной модели ишемии



ис. 5.56. Показатели микроциркуляции конечности при экспериментальной модели ишемии в ранние сроки после клеточной трансплантации

Таким образом, проведенное исследование показывает:

1. Предложенные модели критической ишемии нижних конечностей у крыс в настоящее время являются удобными моделями критической ишемии нижних конечностей у человека и могут быть индикаторами эффективности проводимой терапии.

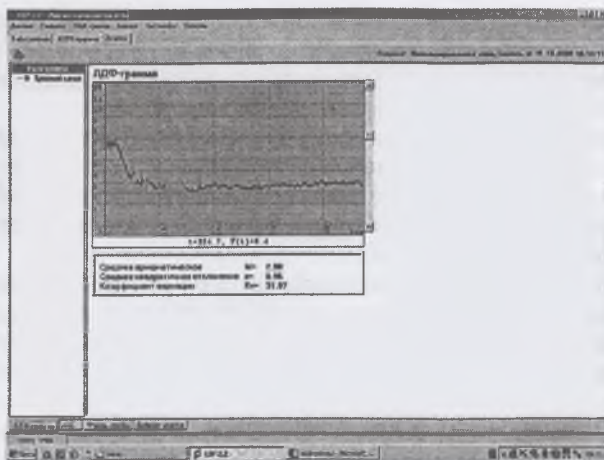


Рис. 5.57. Показатели микроциркуляции конечности при экспериментальной модели ишемии через два месяца после клеточной трансплантации

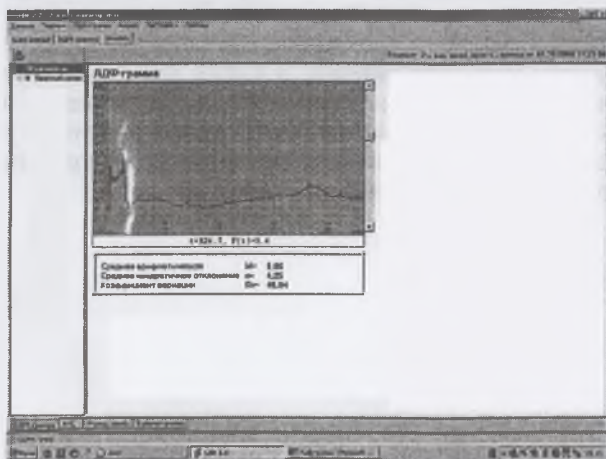


Рис. 5.58. Показатели микроциркуляции конечности при экспериментальной модели ишемии в отдаленные сроки после клеточной трансплантации

2. Экспериментальное и гистологическое исследование показало возможность терапии критической ишемии нижних конечностей у лабораторных животных путем введения клеточных культур аллогенной зрелой и фетальной селезеночной ткани. Трансплантация стволовых клеток подопытным животным способствует но-

вообразованию кровеносных капилляров путем активного деления эндотелиоцитов мелких кровеносных сосудов. По-видимому, в развитии новых кровеносных капилляров принимают участие и сами трансплантированные клетки.

3. Трансплантация культуры фибробластов в скелетную мышечную ткань в экспериментальных условиях не вызывает каких-либо деструктивных процессов, а также в отдаленные сроки (до 60 суток) не были отмечены возможные негативные влияния на клеточные и неклеточные структуры.
4. В исследованные сроки эксперимента в мышечной ткани не выявлено признаков деструктивного процесса в ответ на трансплантацию стволовых клеток в организм подопытных животных.
5. Экспериментальное исследование показало, что большая стимуляция ангиогенеза в условиях ишемии происходит при аллотрансплантации культур клеток-фибробластов по сравнению с трансплантацией культуры клеток селезеночной ткани.
6. Экспериментальные исследования показали, что трансплантация клеточной культуры фибробластов может быть использована и в клинической практике для стимуляции процессов репаративной регенерации скелетной мускулатуры при различных травмах, а также при атрофии мышечных волокон, возникших вследствие денервации или гипокинезии, а также при голодании. Значительное возрастание гистохимических показателей поперечно-полосатой мышечной ткани 4-й группы животных указывает на возрастание метаболического статуса после трансплантации фибробластических клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В средствах массовой информации в последние годы опубликованы тысячи статей о стволовых клетках. Данные публикации не дают читателям полного представления об уникальных свойствах этих клеток, их роли в жизни человека и реальной картине их клинического применения. Для понимания и объективной оценки этих публикаций даже не всегда достаточно наличия медицинского образования, требуются специальные знания по цитологии, генетике и молекулярной биологии.

Сегодня становится очевидным тот факт, что стволовые клетки могут превращаться в практически любые клетки организма. Исследователи ведут поиск веществ, под действием которых в лабораторных условиях можно вызвать эти превращения, и изучают молекулярные механизмы, лежащие в их основе. Однако наряду с этим искусственным путем дифференцировки возможен и уже успешно применяется альтернативный подход, когда эмбриональные клетки превращаются в клетки различных органов непосредственно в организме. Достигнуты значительные успехи в применении эмбриональных стволовых клеток при лечении болезней Паркинсона, Альцгеймера, сахарного диабета I и II типа, лейкемии и многих других заболеваний. Стволовые клетки из костного мозга успешно используются специалистами США, Европы, Японии в кардиологии, нефрологии, гепатологии, хирургии и онкологии.

Однако у данного перспективного направления имеются очень серьезные оппоненты, относящиеся к терапии стволовыми клетками скептически, ставящие под сомнение его возможности или, хуже того, безопасность его применения. Они бездоказательно называют клеточную терапию стволовыми клетками самой большой «аферой XX века». Среди них есть как приверженцы старых методов, так и представители фарминдустрии, которые объективно усматривают серьезную угрозу сбыту их продукции в результате внедрения новейших высокоэффективных методов биомедицины.

Целью представленной монографии явилось на основе собственных экспериментальных исследований характеризовать уникальные терапевтические возможности клеточных технологий в лечении ряда тяжелых, практически неизлечимых на сегодня заболеваний.

При этом мы подчеркиваем, что ни в коей мере не считаем возможным противопоставлять клеточную терапию и традиционные направления медицинской науки. Напротив, по нашему глубокому убеждению, только адекватное сочетание различных подходов может дать максимальный терапевтический эффект для пациента.

При обзоре современной отечественной и зарубежной литературы можно выделить основные моменты, определяющие суть клеточной терапии СК.

Как известно, под термином «клеточная терапия» может обозначаться как терапия клетками, так и терапия собственно клеток. При использовании СК в терапевтических целях мы в первую очередь подразумеваем воздействие на больную клетку.

Каковы возможности современной медицины в использовании стволовых клеток и в лечении с их помощью больных клеток организма? Клеточная терапия стволовыми клетками — это самый передовой фронт современной биотехнологии и медицины, перед которым стоят трудные проблемы не только биологического и медицинского плана, но и законодательства, морально-этические, экономические и прочие. Существуют, помимо одержимости ученых и решимости врачей в желании помочь страждущим, влиятельные группы, движимые как вековым непониманием процессов развития науки, так и простым корыстным умыслом. Это оказывает серьезное противодействие данному процессу. Вместе с тем незыблемые права больного человека на получение адекватной помощи, стареющего человека на продление жизни и улучшение ее качества, поддержанные миллионами их родственников и близких, постепенно меняют общественное сознание в большинстве стран. Во многих странах, таких как Великобритания и Австралия, уже разрешены не только научные исследования, но и клиническое применение эмбриональных стволовых клеток. Получает широкое распространение применение стволовых клеток из пуповинной крови. Появились уникальные возможности применения взрослых стволовых клеток с предварительной дифференцировкой в различные виды специализированных клеток.

Организм человека представляет собой сложнейшую саморегулирующуюся (самообновляющуюся) систему. Миллиарды клеток отмирают и возобновляются, находясь в постоянном динамическом равновесии. В последнее время стало очевидным, что огромная роль в этом процессе принадлежит стволовым клеткам. Общее их количество в тканях относительно невелико, но они играют ведущую роль в поддержании постоянства состава и свойств организма.

Различают стромальные стволовые клетки, создающие структурные образования организма, и стволовые клетки, создающие собственно функциональные ткани (паренхиму органа). Нарушение баланса между этими клонами стволовых клеток считается одной из ведущих причин возникновения наиболее частых заболеваний современности: атеросклероза, цирроза печени, возрастных изменений в нервной системе.

Стволовые клетки не входят в какую-либо тканевую структуру и сами непосредственно не выполняют каких-либо функций. Вместе с тем они решают суперзадачу, являясь источником всех специализированных клеток: сердечной мышцы, нервных клеток, клеток крови, иммунной системы и т. д. Обладая невиданной пластичностью, т. е. по-

тенциальными способностями превращения в любые ткани и органы, стволовые клетки открывают перед медициной безграничные возможности по восстановлению органов и тканей и излечению от наиболее тяжелых заболеваний.

Стволовые клетки способны к бесконечному делению и возобновлению. В лабораторных условиях стволовая клетка способна делиться в течение многих месяцев и лет, не превращаясь в какую-то специализированную клетку. Только при создании особых лабораторных условий или по запросу организма неспециализированные стволовые клетки могут превращаться в специализированные клетки различных тканей. Этот процесс называется дифференциацией. Толчком к дифференциации служат внутренние и внешние сигналы. Внутренние сигналы контролируются генной структурой клетки. Внешние сигналы генерируются организмом или учеными в лабораторных условиях. Внешние сигналы могут иметь химическую или физическую природу и зависят от микроокружения и контактов с другими клетками. Очевидно, что внешние и внутренние сигналы для различных видов стволовых клеток могут быть различны.

Установлены некоторые механизмы воздействия стволовых клеток на процессы оздоровления больных тканей. Показано, что стволовые клетки достаточно свободно мигрируют в тканях и органах. Даже в сложных структурных образованиях головного мозга скорость их продвижения может достигать нескольких миллиметров в неделю. Они обладают способностью различать поврежденные ткани и мигрируют в их направлении. В области очага поражения стволовые клетки могут дифференцироваться в необходимые организму клетки с определенной функцией. Введенные в спинномозговой канал стволовые клетки могут мигрировать к зоне поражения спинного мозга, дифференцироваться в нервные клетки и восстанавливать нарушенные связи.

Также установлено, что образовавшиеся в результате дифференцировки новые клетки могут вырабатывать вещества, способствующие процессам заживления. Так, нервные стволовые клетки могут превращаться в глиальные клетки, которые вырабатывают миелин, необходимый для восстановления проводимости нервных волокон в зонах демиелинизации. Таким образом, стволовые клетки не только замещают погибшие клетки нервной ткани, но и восстанавливают миелиновую оболочку нервов.

Сегодня еще много вопросов о причинах, механизмах и способностях стволовых клеток к дифференциации. Ученые находятся только в начале сложного пути познания этих процессов. Но даже первые работы в этом направлении породили обоснованную надежду получения мощных биотехнологических препаратов, способных восстанавливать поврежденные клеточные структуры.

Различают следующие виды СК.

1. *Эмбриональные стволовые клетки* являются тотипотентными, т. е. всемогущими. После оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом образуется клетка с полным набором хромосом, называемая зиготой. Многие ученые считают эту клетку прообразом стволовой клетки по ее уникальным возможностям превращения в любую клетку, ткань или орган будущего организма и околоплодных образований (плацента и пр.). Через 30 часов после оплодотворения она начинает делиться и на 3–4-й день из 16 и более вновь образованных клеток формируется компактный шарик, обозначенный как морула. Через 4–5 дней, еще после нескольких делений, клетки морулы начинают дифференциацию. Создается пузырек из клеток — бластоцист, наружные клетки которого в дальнейшем превращаются в околоплодные образования. Клетки, находящиеся внутри бластоциста, за свою возможность развиваться в любые клетки, ткани и органы плода называются мультипотентными стволовыми клетками. Не все стволовые клетки дифференцируются в клетки тканей эмбриона. Часть из них накапливается в этот период в желточном мешке, а к 6-й неделе развития — в печени. Начиная с 12-й недели большое количество стволовых клеток перемещается в селезенку и позже в костный мозг и другие ткани. По своим свойствам эти клетки отличаются от стволовых клеток, находящихся в бластоцисте. Они частично утрачивают возможность дифференциации в клетки и ткани организма. Требуются определенные факторы для восстановления их способности к дифференциации в необходимом направлении. Считается, что до 12-недельного срока развития эти клетки имеют одно замечательное свойство: они неиммуногенны, т. е. при пересадке таких клеток не возникают реакции отторжения, в связи с чем они могут использоваться без предварительной проверки совместимости донора и реципиента. Гипоаллергичность клеток также объясняет редкость возникновения побочных эффектов при их пересадке.

2. *Стволовые клетки пуповинной крови.* К моменту рождения некоторое количество стволовых клеток находится в крови новорожденного. После рождения ребенка в плаценте и пупочном канатике остается до 100 мл крови, которая содержит значительное количество стволовых клеток. По своим возможностям они близки к стволовым клеткам взрослого человека.

Этот источник стволовых клеток начинает в наши дни широко использоваться, хотя он не лишен некоторых недостатков: заморозка цельной крови, а не стволовых клеток; трудности выделения и дифференциации стволовых клеток; небольшое количество стволовых клеток; невозможность получить фракцию чистых стволовых клеток; преобладание в полученной фракции кроветворных стволовых клеток (способны превращаться только в клетки крови).

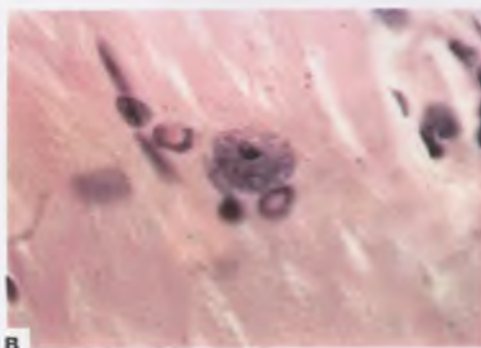


Рис. 5.1. а — выделенные подвздошные артерия и вена экспериментального животного (крыса), вид до пересечения; б — подвздошные артерия и вена экспериментального животного (крыса), вид после перевязки и пересечения; в — крупные клетки с базофильным оттенком цитоплазмы среди мышечных волокон. Трансплантация клеточной культуры зрелой селезеночной ткани подопытным животным. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 90

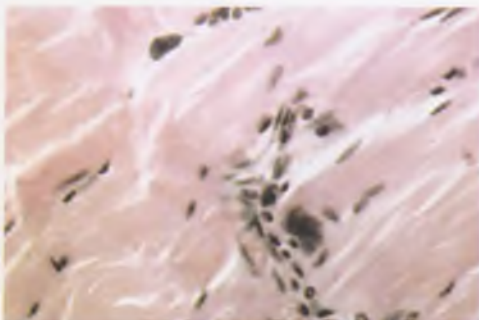


Рис. 5.2. Полигональные формы клеток с базофильной цитоплазмой по ходу кровеносных капилляров поперечно-полосатой мышечной ткани. После трансплантации культуры фетальных клеток. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

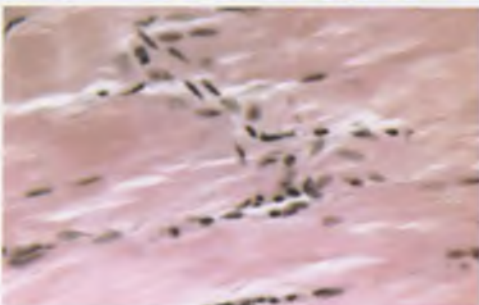


Рис. 5.3. Увеличение количества клеток с базофильной цитоплазмой, расположенных по ходу кровеносных капилляров подопытных животных, через 30 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

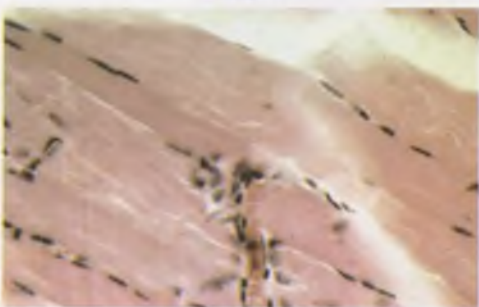


Рис. 5.4. Группа клеток с базофильной цитоплазмой вдоль кровеносного капилляра через 30 дней после трансплантации клеточных культур зрелой селезенки подопытным животным. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

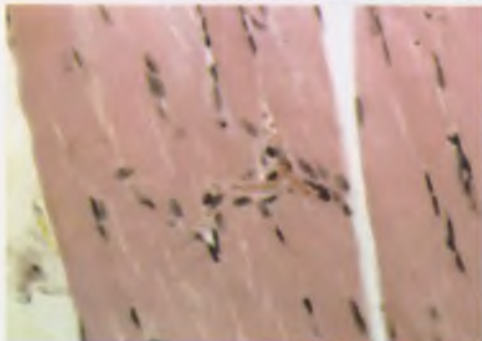


Рис. 5.5. Овальной или округлой формы клетки плотно окружают кровеносные капилляры скелетной мускулатуры при трансплантации клеток первой группы подопытных животных. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

Рис. 5.6. Клетки базофильной цитоплазмы по ходу кровеносных капилляров поперечно-полосатой мускулатуры после трансплантации стволовых клеток. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

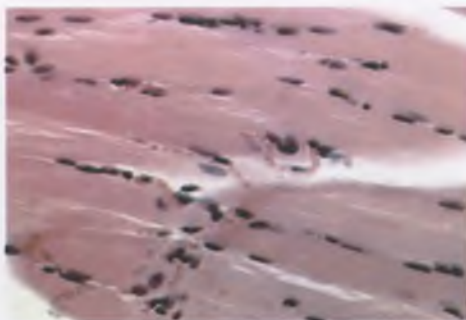


Рис. 5.7. Скопление делящихся клеток трансплантата между мышечными волокнами поперечно-полосатой мускулатуры на 30-й день эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40



Рис. 5.8. Почковидная концентрация делящихся эндотелиоцитов и клеток трансплантата между мышечными волокнами животных через 30 дней эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

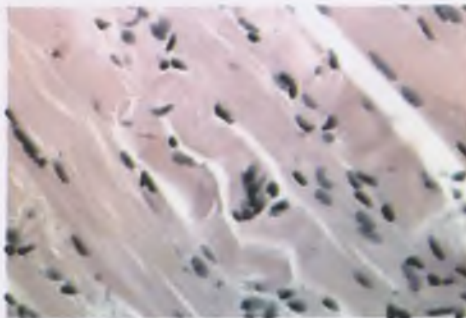


Рис. 5.9. Единичные лимфоидные клетки по ходу кровеносных капилляров поперечно-полосатой мышечной ткани через 30 дней после трансплантации стволовых клеток культуры. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40





Рис. 5.10. Лимфоидные клетки вокруг капилляров и артериол поперечно-полосатой мышечной ткани на 30-е сутки после трансплантации культуры клеток селезеночной ткани. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40



Рис. 5.11. Трансплантированные клетки фетальной селезенки по ходу кровеносных капилляров на 30-е сутки после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

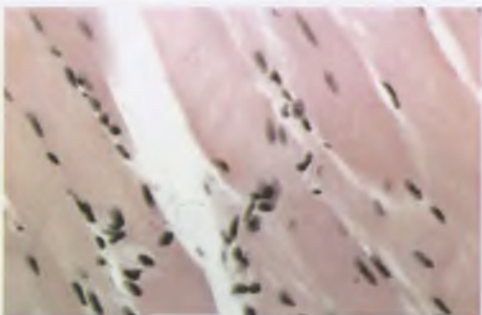


Рис. 5.12. Небольшая группа клеток трансплантации в поперечно-полосатой мышечной ткани подопытных животных через 30 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

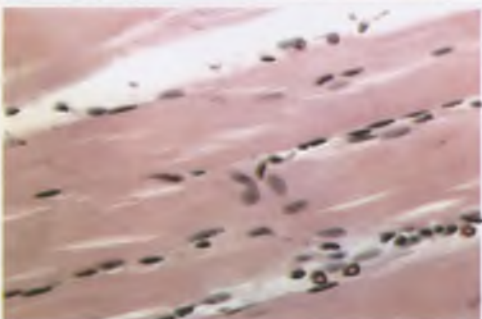


Рис. 5.13. Группа стволовых клеток на фоне мышечного волокна и лимфоидные клетки между мышечными волокнами на 30-й день после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

Рис. 5.14. Трансплантированные клетки культуры по ходу кровеносного капилляра скелетной мускулатуры через 30 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

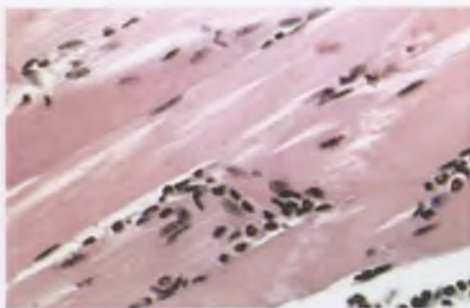


Рис. 5.15. Скопление трансплантированных клеток в скелетной мускулатуре с лимфоидными клетками на 30-е сутки после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

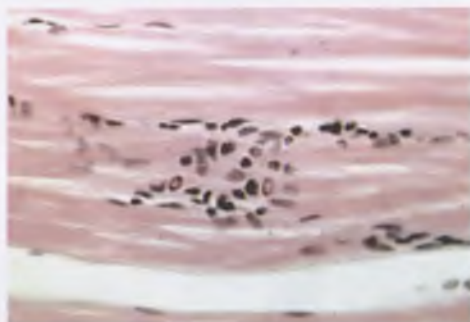
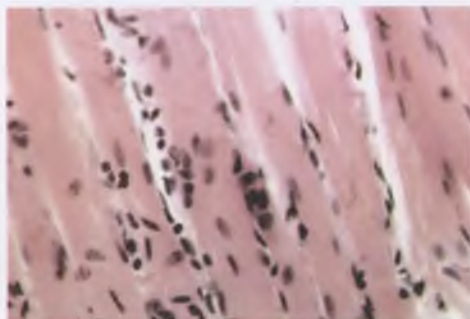


Рис. 5.16. Скопление клеток трансплантата вдоль мышечных волокон через 30 дней после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40



Рис. 5.17. Концентрация клеток культуры на 30-й день эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40



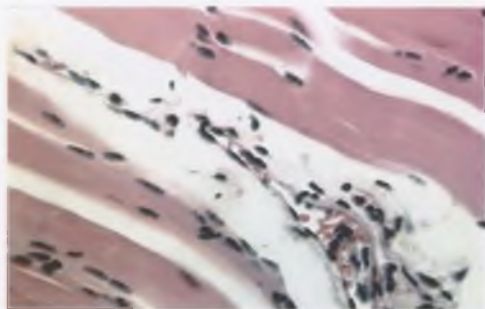


Рис. 5.18. Образование новых кровеносных капилляров на 30-е сутки после трансплантации клеточных культур клеток фетальной селезенки. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

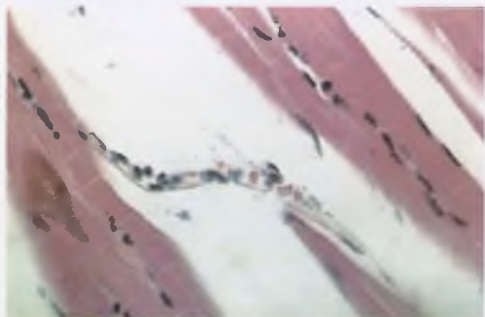


Рис. 5.19. Рост и развитие новых кровеносных капилляров на 30-е сутки после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

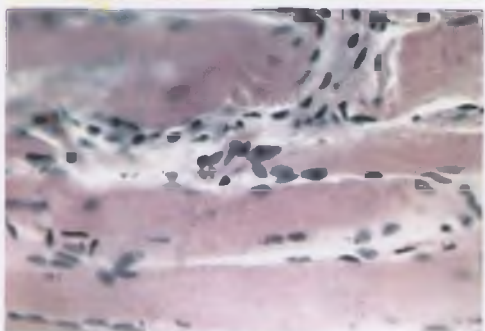


Рис. 5.20. Единичные клетки трансплантата в мышечной ткани на 30-е сутки после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

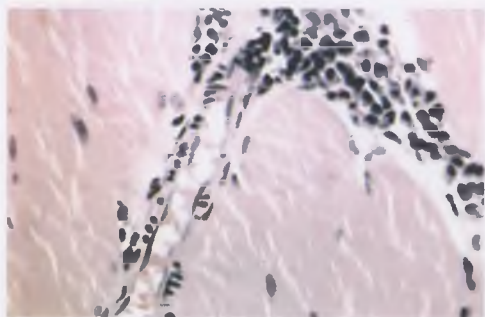


Рис. 5.21. Значительное количество клеток трансплантата на 30-е сутки после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

Рис. 5.22. Диффузное расположение лимфоидных клеток вдоль кровеносных сосудов и между мышечными волокнами на 30-е сутки после трансплантации стволовых клеток. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40



Рис. 5.23. Зона расположения крупных кровеносных сосудов мышечной ткани животных на 30-е сутки после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

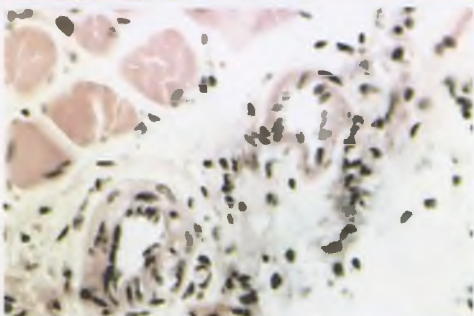
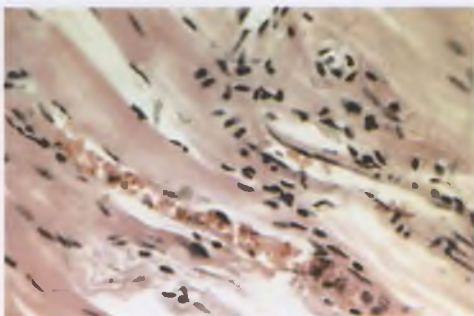


Рис. 5.24. Венозный кровеносный сосуд поперечно-полосатой мышечной ткани скелетного типа с небольшим количеством лимфоидных клеток у подопытных животных на 30-е сутки после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40



Рис. 5.25. Сеть кровеносных сосудов различного калибра в мышечной ткани скелетного типа подопытных животных на 30-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40



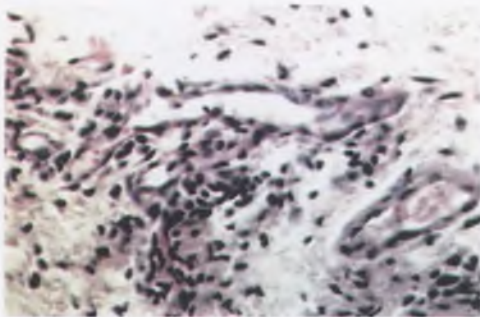


Рис. 5.26. Диффузное расположение небольшого количества лимфоидных клеток в непосредственной близости кровеносных сосудов, расположенных в рыхлой соединительной ткани мышц 2-й группы подопытных животных. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40



Рис. 5.27. Небольшое количество лимфоидных клеток в жировой ткани вокруг поперечно-полосатой мышечной ткани скелетного типа 2-й группы животных на 30-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

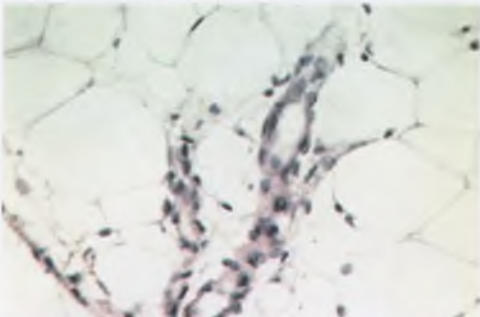


Рис. 5.28. Новообразование капилляров путем почкования цитоплазмы эндотелиоцитов в жировой клетчатке подопытных животных на 20-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

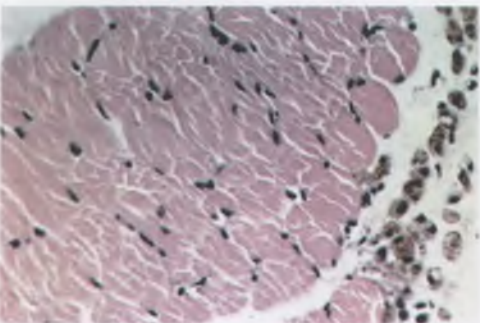


Рис. 5.29. В соединительнотканной оболочке (эпимизий) мышечной ткани скелетного типа встречается небольшая группа клеток с «пигментными» включениями у животных 2-й группы. Окраска гематоксилин-эозином. Ок. 10, об. 40

Рис. 5.30. Поперечный срез мышечных волокон 1-й группы подопытных животных через 30 суток после эксперимента. Окраска гематоксин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

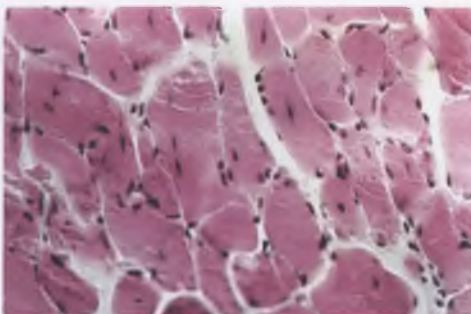


Рис. 5.31. Зона инъекции (трансплантации) фибробластов в мышечной ткани. Окраска гематоксин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

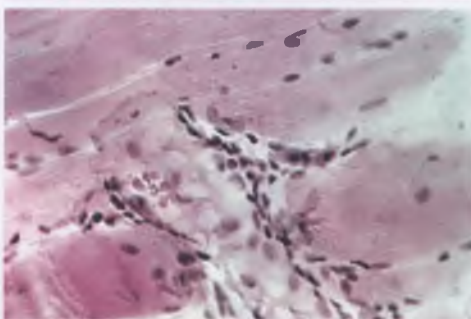


Рис. 5.32. Культура фибробластов в скелетной мышечной ткани 2-й группы животных через 30 суток после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

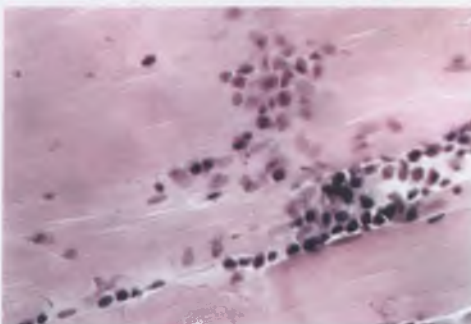


Рис. 5.33. Небольшое полнокровие сосудов в трансплантации фибробластов 2-й группы животных через 30 суток после эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

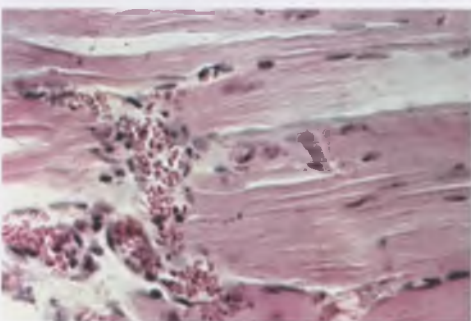




Рис. 5.34. Трансплантированные фибробласты по ходу кровеносных капилляров скелетной мышечной ткани основной группы А животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

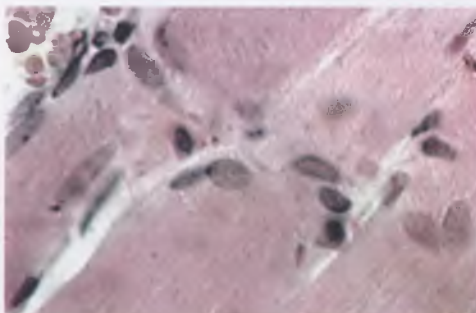


Рис. 5.35. Малодифференцированные фибробласты и кровеносные капилляры 2-й группы животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

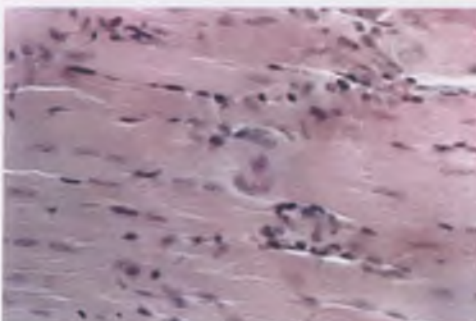


Рис. 5.36. Пролиферация эндотелиоцитов в мышечных волокнах скелетной мускулатуры 3-й группы животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

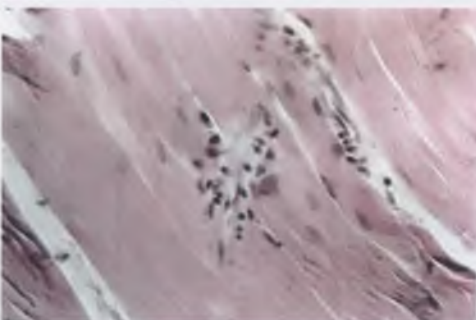


Рис. 5.37. Деление фибробластов в мышечных волокнах вокруг кровеносных капилляров 3-й группы животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

Рис. 5.38. Трансплантат фибробластов на 30-е сутки после эксперимента 3-й группы животных. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

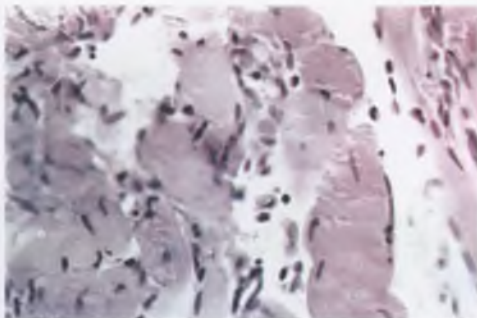


Рис. 5.39. Рост и развитие эндотелиоцитов и фибробластов 3-й группы животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40



Рис. 5.40. Увеличение количества ядер мышечных волокон скелетной мускулатуры 3-й группы животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

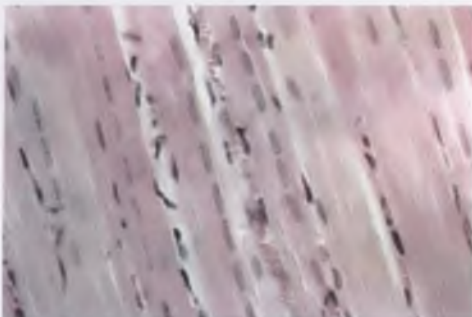


Рис. 5.41. Трансплантированные фибробласты концентрируются в непосредственной близости от кровеносных капилляров 3-й группы животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40



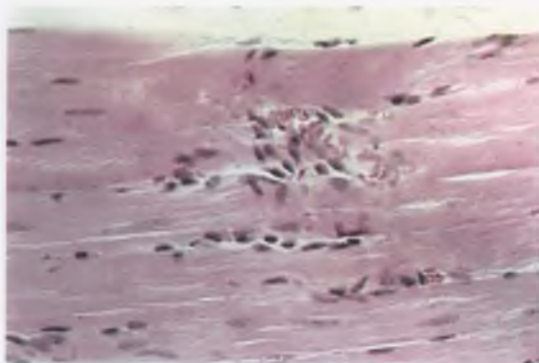


Рис. 5.42. Фибробластические клетки и эндотелиоциты кровеносных капилляров 2-й группы животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

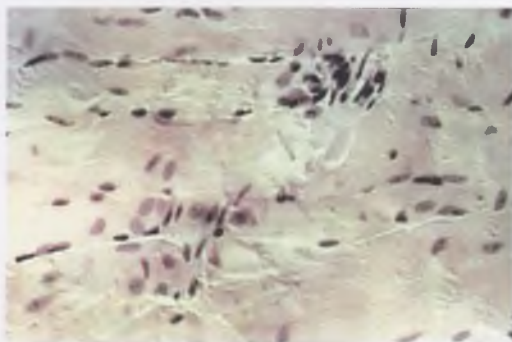


Рис. 5.43. Концентрация малодифференцированных клеток 2-й группы животных через 30 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

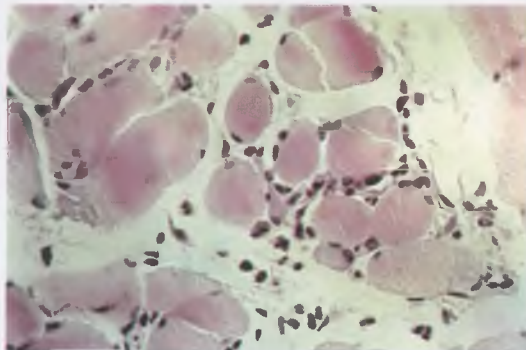


Рис. 5.44. Небольшое количество лимфоидных клеток между мышечными волокнами скелетной мышечной ткани животных 3-й группы через 60 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

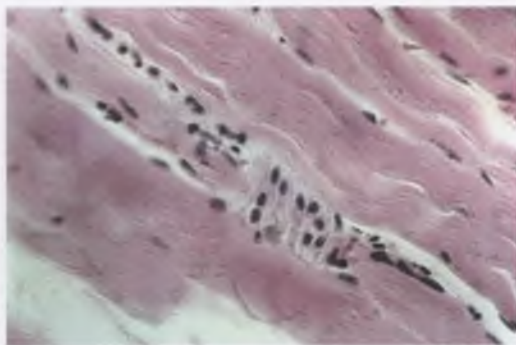


Рис. 5.45. Лимфоидные клетки по ходу кровеносных капилляров у животных 3-й группы через 60 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

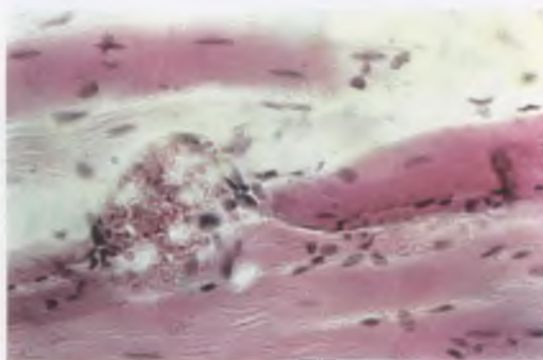


Рис. 5.46. Трансплантированные юные фибробласты и лимфоидные клетки рядом с кровеносными сосудами скелетной мышечной ткани 3-й группы животных через 60 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40

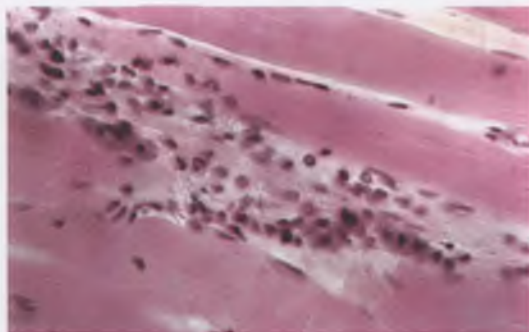


Рис. 5.47. Скопление фибробластов, стимулирующих пролиферацию эндотелиоцитов и миосателлитов скелетной мускулатуры 3-й группы животных через 60 суток после опыта. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофотография, ок. 10, об. 40



Рис. 5.51. Умеренная гистохимическая реакция на гликоген в зоне расположения кровеносных капилляров 3-й группы животных через 30 суток после опыта. Реакция Мак-Мануса. Микрофотография, ок. 10, об. 40



Рис. 5.52. В скелетной мышечной ткани гистохимическая реакция на гликоген 3-й группы животных через 60 суток после опыта. Реакция Мак-Мануса. Микрофотография, ок. 10, об. 40

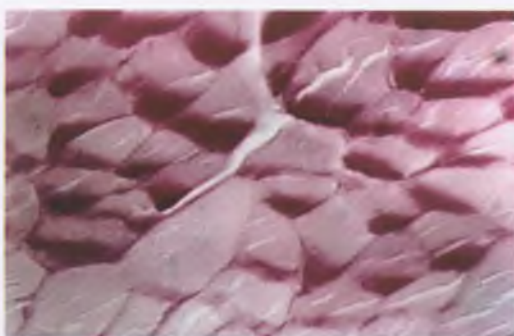


Рис. 5.53. Высокая гистохимическая реакция на гликоген в зоне эндомизия скелетной мышечной ткани 3-й группы животных через 60 суток после опыта. Реакция Мак-Мануса. Микрофотография, ок. 10, об. 40



Рис. 5.54. Высокая гистохимическая реакция на гликоген отдельных мышечных волокон 3-й группы животных через 60 суток после опыта. Реакция Мак-Мануса. Микрофотография, ок. 10, об. 40

3. *Стволовые клетки взрослого организма.* Взрослые стволовые клетки — это недифференцированные клетки, которые находятся среди дифференцированных клеток и тканей организма. Общее их количество в каждой ткани крайне незначительно. Они могут длительное время сохраняться в таком состоянии до момента востребования. Сигналом к началу дифференциации могут послужить травмы или болезни. Эти клетки могут бесконечно возобновлять себя и дифференцироваться (развиваться) в специализированные клетки для восстановления утраченных. К настоящему времени стволовые клетки обнаружены в костном мозге, жировой ткани, головном мозге, периферической крови, кровеносных сосудах, коже, печени, скелетной мускулатуре. Весьма вероятно их присутствие и в других тканях. Особенно важными являются сообщения ряда авторов о концентрации СК в селезенке. По их мнению, селезенка наряду с костным мозгом является источником СК. Поэтому ранее считавшаяся безобидным оперативным пособием спленэктомия с этих позиций приобретает совершенно противоположное значение. Т. е., утратив селезенку, организм теряет значительное количество СК и тем самым способность к восстановлению утраченных функций многих органов.

Следовательно, часть стволовых клеток сохраняется для последующего использования. Однако с возрастом или в случае серьезных патологий их естественное количество оказывается недостаточным, и необходима трансплантация. В отличие от эмбриональных взрослые стволовые клетки вызывают реакции отторжения при трансплантации, поэтому для каждого реципиента требуется индивидуальный подбор донора. Примером может служить трансплантация костного мозга, которая применяется уже более 30 лет. В ее основе лежит использование донорских стволовых клеток. Для их приживления используются сложные и далеко не безопасные методы подавления иммунной защиты пациента. Возможно также развитие поздних осложнений по типу синдрома «трансплантат против хозяина».

Современная биотехнология позволяет обойти препятствие тканевой несовместимости. Пациент во многих случаях может быть одновременно и донором, и реципиентом. Из его собственных тканей можно взять небольшое количество стволовых клеток, размножить их до необходимого объема, затем дифференцировать в нужном направлении. К настоящему времени разработаны методы дифференциации в кроветворные клетки, нервные клетки, клетки печени, мышечные клетки и ряд других. Это создало основу для лечения наиболее распространенных и опасных заболеваний и открыло уникальные перспективы перед современной медициной. По этой схеме возможно даже выращивание органов и тканей для последующей трансплантации с идеальной совместимостью.

По сообщениям исследователей, сегодня трудно представить полный список заболеваний, при которых стволовые клетки могут оказать

лечебное влияние. Он расширяется практически ежедневно. В числе патологий, при которых наблюдается положительный клинический эффект, заболевания крови, атеросклероз сосудов сердца, ишемическая болезнь головного мозга, иммунодефициты различных этиологий, сепсис, гнойно-септические заболевания и осложнения, аутоиммунные заболевания и некоторые другие.

Трансплантация и имплантация стволовых клеток может осуществляться внутривенно, внутрикостно, внутримышечно, внутрипеченочно, в мышцу сердца эндолюмбально и т. д. Наиболее часто используется внутривенное введение.

Сахарный диабет — одно из самых распространенных заболеваний человечества. Общее число больных, по прогнозам специалистов, к 2025 г. достигнет 300 млн человек. Это заболевание приводит к развитию сердечно-сосудистых осложнений, слепоте, гангрене нижних конечностей и почечной недостаточности. Нами проведено экспериментальное изучение эффективности и безопасности использования стволовых клеток фетальной селезенки и селезеночной ткани взрослой крысы в качестве профилактики и коррекции экспериментальной аллоксановой инсулиновой недостаточности и недостаточности инсулина при резекции и полном удалении поджелудочной железы. Наблюдения проводились в течение трех лет. Через 6–12 месяцев после аллогенной трансплантации стволовых клеток фетальной селезеночной ткани и аутологичной трансплантации взрослой селезенки были отмечены существенные улучшения показателей углеводного и липидного обмена. Установлено статистически достоверное снижение уровней гликозурированного гемоглобина, глюкозы крови, показателей липидного обмена. Эти улучшения сохранялись на протяжении всего периода исследования. Средняя доза инсулина, необходимая для поддержания уровня глюкозы, через шесть месяцев была снижена, а в ряде случаев полностью отменена.

Сделан вывод о том, что терапия стволовыми клетками при инсулиновой недостаточности является безопасной и эффективность ее заключается в улучшении показателей углеводного и липидного обмена, а также в снижении скорости прогрессирования поздних осложнений диабета или их редукции.

Гепатиты и циррозы печени относятся к чрезвычайно трудным для современной терапии заболеваниям. К сожалению, эффективность самых современных методов противовирусной терапии остается низкой. Алкогольная болезнь печени, по-видимому, также формируется на фоне хронической вирусной инфекции. Независимо от этиологического фактора (вирусы, алкоголь, экзо- и эндотоксины, аутоиммунные повреждения) происходит каскадная гибель гепатоцитов (главных клеток печени) с избыточным образованием межклеточного матрикса, нарушением структуры коллагена и изменением клеточной структуры

органа. Социально-медицинские проблемы трансплантации печени (пока что безальтернативного метода лечения пациентов в терминальной стадии болезни) общеизвестны. Сегодня в большинстве центров трансплантации печени больше половины больных из листа ожидания умирает, не дождаввшись операции.

Нами выполнено экспериментальное исследование, при котором проводилось введение в печень клеточных культур фетальной печени и селезенки с экспериментальной моделью цирроза печени и хронического гепатита. Наблюдение за лабораторными животными, биохимические показатели и данные сравнительного патоморфологического исследования показали высокую эффективность и безопасность трансплантации клеточных культур.

В клинической практике была применена методика аутологичной трансплантации мобилизованных и выделенных стволовых клеток костного мозга у больных с циррозом печени и хроническим гепатитом. По классификации Child большинство из них входили в группу C и находились в листе ожидания трансплантации печени. Установлено значительное улучшение функциональных показателей печени и снижение клинических проявлений ее недостаточности. Улучшились качество и продолжительность жизни. После начала лечения все больные прожили больше 14 месяцев, т. е. все могли дожить до необходимой им трансплантации печени. Уникальность возможностей стволовых клеток наблюдается и в положительном опыте лечения гепатитов, циррозов печени и ее алкогольной болезни в менее запущенных стадиях заболевания.

Данное исследование позволяет заключить, что использование стволовых клеток с лечебной целью при данной патологии — это возможность регуляции нарушенных межклеточных взаимодействий в печени, влияния на механизмы клеточной гибели (некроз-апоптоз), а также на процессы фиброгенеза. Эти процессы определяют динамику восстановления структурно-функциональных взаимоотношений в пораженном органе. Возможность достижения достаточно длительного клинического эффекта трансплантации стволовых клеток представляется реальной.

Использование стволовых клеток при заболеваниях и повреждениях нервной системы является чрезвычайно перспективным направлением современной медицины. Известен и широко освещен в прессе положительный эффект имплантации нервных клеток эмбриона при болезни Паркинсона, детском церебральном параличе и другой патологии. Выше мы привели экспериментальные данные по некоторым механизмам лечебного эффекта стволовых клеток при травматическом поражении нервной ткани. В эксперименте на лабораторных животных с моделью тяжелого ушиба и повреждения головного мозга мы применяли стволовые клетки. Использовались различные суспензии

клеточных культур, которые вводились методом как трансплантации, так и имплантации непосредственно в очаг поражения. Получены положительные результаты при вышеуказанной травме, что доказывается гистологическими и гистохимическими исследованиями. Достигнуто восстановление чувствительности и моторной активности в ответственных зонах, а также восстановление нарушенных функций органов.

Использование клеточной терапии стволовыми клетками в лечении хронической ишемии нижних конечностей представляется очень заманчивым направлением. Об эффективности данного метода лечения сообщают как отечественные, так и зарубежные клиницисты. Для установления ее безопасности и эффективности нами проведено экспериментальное исследование на лабораторных животных. Предложенные нами модели критической ишемии нижних конечностей у крыс в настоящее время оказались удобными моделями критической ишемии нижних конечностей у человека и позволили изучить эффективность проводимой терапии.

Экспериментальное и гистологическое исследование показало возможность терапии критической ишемии нижних конечностей у лабораторных животных путем введения клеточных культур аллогенной зрелой и фетальной селезеночной ткани. Трансплантация стволовых клеток подопытным животным способствовала новообразованию кровеносных капилляров путем активного деления эндотелиоцитов мелких кровеносных сосудов. По-видимому, в развитии новых кровеносных капилляров принимают участие и сами трансплантированные клетки.

Трансплантация культуры фибробластов в скелетную мышечную ткань в экспериментальных условиях не вызывает каких-либо деструктивных процессов, а также в отдаленные сроки (до 60 суток) не были отмечены возможные негативные влияния на клеточные и не клеточные структуры. В исследованные сроки эксперимента в мышечной ткани не выявлено признаков деструктивного процесса в ответ на трансплантацию стволовых клеток в организм подопытных животных. Экспериментальное исследование показало, что большая стимуляция ангиогенеза в условиях ишемии происходит при аллотрансплантации культур клеток-фибробластов по сравнению с трансплантацией культуры клеток селезеночной ткани. Экспериментальные исследования показали, что трансплантация клеточной культуры фибробластов может быть использована и в клинической практике для стимуляции процессов репаративной регенерации скелетной мускулатуры при различных травмах, а также при атрофии мышечных волокон, возникших вследствие денервации или гипокинезии, а также при голодании. Значительное возрастание гистохимических показателей поперечно-полосатой мышечной ткани 4-й группы животных указывает на возрастание метаболического статуса после трансплантации фибробластических клеток.

В заключение хочется отметить, что для ученых остается достаточно много научно-исследовательской работы. Перспектива сбора стволовых клеток — что некоторые называют собственным природным «восстановительным набором» — находится среди наиболее волнующих научных разработок последней половины прошлого столетия. В этом наша глубочайшая надежда, что через центр исследования стволовых клеток работа пойдет путем общих усилий. Совместные усилия отечественных и зарубежных ученых покажут, что через несколько лет произойдет раскрытие информации о том, как нормальные процессы могут быть вызваны вновь.

Список использованной литературы

1. Абалмасов К.Г., Морозов К.М., Федорович А.А. Микрохирургическая коррекция хронической критической ишемии нижних конечностей // Тез. докл. симпозиума «Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний», 17–18 октября, 2001, Москва. — С. 5.
2. Абдулкадыров К.М., Балашова В.А. Клеточный состав печени и селезенки в фетальном периоде // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2008. Т. 111, №1. С. 46–49.
3. Азатян К.Д. Трансплантация фетальных клеток при хирургическом лечении больных циррозом печени и портальной гипертензией // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук — Москва. 2004. 25 с.
4. Азизова А.А., Ходжаев С.Х., Асламов Б.Н. Спленэктомия при заболеваниях крови // Анн. хир. гепатол. — 2000. Т. 5. №2. С. 264–265.
5. Александрова М.М., Конорова И.Л. Развитие и васкуляризация неокортикальных трансплантатов в ранние сроки после пересадки // В кн.: «Трансплантация ткани мозга млекопитающих» — Пушкино. 1988. С. 3–4.
6. Александрова М.А. Механизмы дифференцировки нервной ткани и межклеточные взаимодействия при нейротрансплантации у млекопитающих // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М. 1999. 48 с.
7. Алексеев В.А., Сячина Н.П. Ультраструктурные особенности эндотелиальных клеток и звездчатых эндотелиоцитов синусоидов печени крыс в норме и реакциях их на повреждающее воздействие тетрахлорметаном // Ультраструктурная патология печени. — Рига: Зинатне. 1984. С. 16–20.
8. Алексеева Г.В., Боттаев Н.А., Горошкова В.В. и др. Проблемы клинической лимфологии и эндоекологии // 1-я российская конф. — М., Сочи. 1997. С. 89.
9. Алексеева Г.В., Боттаев Н.А., Горошкова В.В. Применение семакса в отдаленном периоде у больных с постгипоксической патологией мозга // Анестезиология и реаниматология. — 1999. №1. С. 40–43.
10. Алексеева И.Н., Громашевская Л.П., Ильевич Н.В., Брызгина Т.М., Галенко Т.И., Касаткина М.Г., Радзевич И.М., Шкурова О.С. Влияние противопеченочных гетероантител на восстановительные процессы в печени при ее экспериментальных поражениях // Успехи гепатологии / Под ред. А.Ф.Блюгера. — Рига. 1986. С. 273–291.
11. Анненков В.В., Попов Ю.А., Хохлов А.М. и др. Прибор для замораживания биологических суспензий // Патент РФ 93018119. — 1995.
12. Аничков А.Д., Поляков Ю.И., Коненков С.Ю. и др. Повреждения мозга. — СПб. 1999. С. 393–394.
13. Апарцин К.А., Белых Г.К., Дубинин Е.Ф., Усольцев Ю.А. Антимикробная резистентность после вынужденной спленэктомии с экстраперитонеальной аутотрансплантацией ткани селезенки в условиях хирургической инфекции живота // Гомеостаз и инфекционный процесс: Тез. докл. междунаrod. конф. — Саратов. 1996. С. 17.

14. *Аларцин К.А.* Аутотрансплантация ткани селезенки при вынужденной спленэктомии в условиях хирургической инфекции живота / В кн.: под ред. проф. Е.Г.Григорьева «Хирургия тяжелых гнойных процессов» — Новосибирск: Наука. 2000. Гл. 8. С. 193–209.
15. *Аларцин К.А.* Хирургическая профилактика и способы коррекции послеоперационного гипоспленизма: Дисс. ... докт. мед. наук. — Иркутск. 2001. 293 с.
16. *Ашмарин И.П., Каменская М.А.* Нейропептиды в синаптической передаче // Итоги науки и техники. Физиология человека и животных. — М. 1988. Т. 34. 182 с.
17. *Бабаева А.Г.* Регенерация и система иммуногенеза. — М.: Медицина. 1985. 256 с.
18. *Байматов В.Н.* Механизмы развития гепатоза у животных // Сборник докл. Рос. акад. с/х наук. — №2–3. 1993. С. 86–91.
19. *Байматов В.Н.* Реактивные изменения в печени на действие различных раздражителей // Тезисы докл. 102-й научн. конф. БГАУ. — Уфа. 1993. С. 31.
20. *Балабанов Ю.В.* Получение чистых культур нейронов головного мозга и эмбрионов человека // Цитология. — 1992. №5. С. 83–88.
21. *Балакирев Е.М., Мальков Ю.Н.* 8-я Всесоюзная научная конференция по трансплантации органов и тканей // Журнал «Хирургия». — 1980. №11. С. 117–119.
22. *Баранов В.Г., Соколоверова И.М., Гаспарян Э.Г. и др.* Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии. — Л.: Наука. 1983. 240 с.
23. *Барсуков А.Н., Федоров Г.Н., Семенов В.Ф.* Влияние ожоговой травмы на реактивность клеток селезенки мышей разных генотипов в регионарной реакции трансплантат против хозяина // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1990. №6. С. 592–594.
24. *Бахадыров Ф.Н., Алимходжаев Ф.Х., Шевердин В.А., Сатаева З.М.* Комплексное строение микроциркуляторного русла печени при постнатальном онтогенезе после резекции печени и при экспериментальном токсическом поражении // Морфология. — 1998. №3. С. 23.
25. *Бекетова Т.П., Секамова С.М.* К вопросу структурной гетерогенности гепатоцитов // III Всесоюз. конф. по патологии клетки: Тез. докл. — М. 1982. С. 101–102.
26. *Берснев В.П., Степанова Т.С., Овечко В.Н.* Лечение больных с эпилептическим и цереброорганическим синдромом методом нейротрансплантации // Сборник тезисов 1-го съезда нейрохирургов России. — 1995. С. 291.
27. *Берснев В.П., Хачатрян В.А., Отеллин В.А. и др.* Травма нервной системы у детей // 1-я всеросс. конф. — СПб. 1997. С. 17–21.
28. *Берснев В.П., Степанова Т.С., Овечко В.Н.* Повреждения мозга. — СПб. 1999. С. 298–303.

29. Берсенов А.В., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А. Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2001. №2. С. 46–53.
30. Берсенов А.В. Трансплантация клеток эмбриональной печени и стволовых клеток костного мозга для коррекции дислипидемии и ранних стадий атерогенеза (экспериментальное исследование) // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Москва. 2003. 27 с.
31. Берсенов А.В. Клеточная трансплантология — история, современное состояние и перспективы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2005. №1. С. 49–56.
32. Бехтерева Н.П., Гилерович Е.Г., Гурчин Ф.А. и др. О трансплантации эмбриональных нервных тканей в лечении паркинсонизма // Журнал невропатологии и психиатрии им. Корсакова. — 1990. Т. 90. №11. С. 10–13.
33. Благодатский М.Д., Суфианов А.А., Ларионов С.Н. и др. Трансплантация эмбриональной нервной ткани при синингомиелии: первый клинический опыт // Вопросы нейрохирургии. — 1994. №3. С. 27–29.
34. Блинков С.М., Бразовская Ф.А., Пуцилло М.В. Атлас мозга кролика. — М. 1973. 26 с.
35. Бобрин И.И., Шевченко Е.А., Алимов Г.А. Ультраструктурная организация эндотелиоцитов синусоидов печени человека в пренатальном периоде // Арх. анат., гист. и эмб. — 1987. №6. С. 43–46.
36. Бобрышев Ю.В., Балабанов Ю.В. и др. Особенности дифференцировки нейронов в органотипической культуре коры головного мозга эмбрионов человека // Материалы II Всесоюзного симпозиума «Возбудимые клетки в культуре ткани» — Пушкино. 1989. С. 83–85.
37. Боженков Ю.Г., Степанков Ю.П., Ткаченко Т.В., Говорова Н.В. Фармакотерапия при неотложных состояниях. — Омск: ГУИПП. 1999. 320 с.
38. Бокерия А.А., Еремеева М.В. Современные состояния и перспективы использования ангиогенеза в лечении ишемической болезни сердца // Грудная и сосудистая хирургия. — 2000. №2. С. 57–61.
39. Болякина Г.К., Еникеева Д.А., Каменская М.А. и др. Механизмы и возможные пути коррекции вторичных повреждений мозга // Информ. сб. «Новости науки и техники». Вып. «Реаниматология и интенсивная терапия». — 1997. №2. С. 11–21.
40. Бордуновский В.Н. Пластическая хирургия селезенки и печени (экспериментально-клиническое исследование) // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — Пермь. 1992. 50 с.
41. Бордуновский В.Н. Хирургия селезенки. — Челябинск: Юж.-Урал. кн. изд-во. 1997. 192 с.
42. Борисов А.Е., Жидков К.П., Дмитриев Н.В. и др. Методика экстракорпоральной перфузии срезов ксенотенной селезенки // Вестн. хир. им. Грекова. — 1989. №7. С. 24–25.
43. Боровиков В.П., Боровиков И.П. STATISTICA — Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. — М.: Информ.-изд. дом «Филинъ». 1997. 608 с.

44. *Бородин Ю.И., Любарский М.С., Майбородин И.В.* К проблеме искусственного лимфатического узла // *Морфология*. — 1999. Т. 116. №6. С. 38–42.
45. *Боттаев Н.А.* Профилактика и коррекция пароксизмальных состояний у больных с постгипоксической энцефалопатией // *Автореф. дисс. ... канд. мед. наук*. — М. 1999. 24 с.
46. *Бочаров А.В., Федина И.Б., Спиров В.Г. и др.* Использование культивируемых на микроносителях гепатоцитов для коррекции острой печеночной недостаточности // *Бюлл. exper. биол. и мед.* — 1990. №6. С. 590–592.
47. *Брагин А.Г., Виноградова О.С.* Активность нейронов септума и гиппокампа, трансплантированных в переднюю камеру глаза крыс // *Журн. высш. нервн. деят.* — 1983. Т. 33. №4. С. 708–716.
48. *Брагин А.Г., Зенченко К.И., Пичкур Л.Д., Копьев О.В.* Сравнительные характеристики активности нейронов в срезах трансплантированного и интактного неокортекса // *Нейрофизиология*. — 1991. Т. 23. №3. С. 273–280.
49. *Брагин А.Г., Стафехина В.С.* Нейронная активность в суспензионных трансплантатах неокортекса // *Журн. высш. нервн. деят.* — 1992. №5. С. 955–964.
50. *Буреш Я., Петрань М., Захар И.* Электрофизиологические методы исследования — М. 1962. С. 291–292.
51. *Булгаков А.В.* Хирургическое лечение недостаточности замыкательного аппарата прямой кишки с применением аллотрансплантатов // *Автореф. дисс. ... канд. мед. наук*. — Пермь. 1991. 22 с.
52. *Быстронь И.П., Отеллин В.А.* Трансплантация диссоциированных клеток эмбрионального мозга животных и человека в мозг млекопитающих // *Морфология*. — 1992. Т. 102. №1. С. 111–124.
53. *Вакулин Г.М.* Морфологические критерии снижения проницаемости и трофики цирротически измененной печени крыс и их повышения под влиянием пирогенала и пиридоксальфосфата (морфометрия трансмиссионная и растровая электронная микроскопия) // *Бюлл. exper. биол. и мед.* — 1993. №12. С. 645–650.
54. *Вакулин Г.М., Марченко В.Т., Прутовых Н.Н., Якобсон Г.С.* Ультраструктурные и функциональные особенности обратимости склеротических изменений печени крыс под влиянием экзогенной органоспецифической РНК // *Бюлл. exper. биол. и мед.* — 1978. №4. С. 495–501.
55. *Васина Н.В., Лебедева Ю.Н., Митин А.С., Бруслик В.Г., Шиманко И.И.* Использование гепатоцитов в лечении больных с механической желтухой в пред- и послеоперационном периодах // *Тезисы I Московского международного конгресса хирургов*. — Москва. 1995. С. 335–336.
56. *Василешникова И.П., Отеллин В.А.* Результаты трансплантации участков среднего мозга эмбрионов человека в мозг взрослых крыс // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. — 1988. Т. 94. №6. С. 16–20.

57. *Васин Н.Я., Сафронов В.А., Шабалов В.А.* Лечение сложных форм детского церебрального паралича с использованием множественных внутримозговых электродов // Вопросы нейрохирургии. — 1981. №6. С. 38–45.
58. *Венгеровский А.И., Маркова И.В.* Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Методические рекомендации Российского фармакологического государственного комитета МЗ РФ / Ведомости фарм. комитета. — 1999. №2. С. 10.
59. *Вепринцев Б.Н., Викторов И.В., Вильнер Б.Я.* Руководство по культивированию нервной ткани. — М.: Наука. 1988. 318 с.
60. *Викторов И.В., Сухих Г.Т.* // Вестник РАМН. — 2002. №4. С. 24–30.
61. *Виноградова О.С.* Развитие нервной ткани млекопитающих при трансплантации в мозг и переднюю камеру глаза: проблемы и перспективы // Онтогенез. — 1984. Т. 15. №3. С. 229–251.
62. *Виноградова О.С.* Перспективы и ограничения метода нейротрансплантации // Всесоюзный симпозиум «Трансплантация мозга млекопитающих» — Пушино. 1988. С. 12.
63. *Виноградова О.С.* Методы культивирования нервной ткани in vivo // Руководство по культивированию нервной ткани. — М.: Наука. 1988. 318 с.
64. *Виноградова О.С.* // Журн. высш. нервн. деят. — 1995. Т. 35. №1. С. 132–138.
65. *Виноградова И.Н.* Нейротрансплантация в лечении болезни Паркинсона // Вопросы нейрохирургии им. Бурденко. — 1993. №1. С. 35–39.
66. *Витвицкий В.Н.* Функциональные воздействия и трансплантация нервной ткани как факторы изменения макромолекулярных систем регуляции биосинтеза в структурах головного мозга // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М: Ин-т ВНД и НФ. 1987. 47 с.
67. *Вовин Р.Я., Корзнев А.В., Лыткин В.М., Шустин В.А.* // Вестник хирургии. — 1991. №6. С. 129–132.
68. *Волкова О.В., Елецкий Ю.К.* Основы гистологии с гистологической техникой. — М.: Медицина. 1982. 304 с.
69. *Воробьева Т.М.* История Сабуровой дачи. Успехи психиатрии, неврологии, нейрохирургии и наркологии // Сб. научн. трудов. — Харьков. 1996. Т. 3. С. 158–161.
70. *Гавриленко А.В., Скрылев С.И., Кузубова Е.А.* Целесообразность выполнения не прямых реваскуляризаций после неэффективных реконструктивных сосудистых операций // Тез. докл. симпозиума «Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний», 17–18 октября 2001 г. — Москва. С. 35.
71. *Ганнушкина И.В., Сабурова И.Н., Конорова И.Л., Полежаев Л.В.* Роль гематоэнцефалического барьера при трансплантации в головной мозг эмбриональной нервной ткани у млекопитающих // В сб.: «Трансплантация тканей мозга млекопитающих» — Пушино. 1988. С. 15–16.
72. *Гешелин С.А., Бабур А.А., Гирля В.И. и др.* Гетеротопическая аутоотрансплантация селезеночной ткани у пациентов, перенесших спленэктомию по поводу травмы // Анн. хир. гепатол. — 2000. Т. 5. №2. С. 272.

73. Гилерович Е.Г. Иммунная привилегированность головного мозга и трансплантация эмбриональной нервной ткани // Тез. докл. конф., посвященной 100-летию Института экспериментальной медицины — Ленинград. 1990. С. 29.
74. Гилерович Е.Г., Федорова Е.А., Отеллин В.А. // Арх. анатомии. — 1990. Т. 98. №5. С. 22—26.
75. Гилерович Е.Г. // Морфология. — 1993. Т. 80. №3. С. 11—20.
76. Гирман С.В., Головина И.Л. Нормализующее влияние трансплантатов эмбриональной нервной ткани на обучение крыс, подвергшихся гипоксии // В сб.: «Трансплантация тканей мозга млекопитающих» — Пушино. 1988. С. 19.
77. Гирман С.В., Головина И.Л. Аfferентные связи трансплантатов эмбрионального неокортекса в коре мозга взрослых крыс // В сб.: «Трансплантация тканей мозга млекопитающих» — Пушино. 1988. С. 18.
78. Глебов Р.Н., Крыжановский Г.Н. Функциональная биохимия синапсов. — М.: Медицина. 1978. 326 с.
79. Говенько Ф.С., Шустин В.А., Бовин Р.Я., Корзенев А.В. Хирургическая коррекция некоторых психопатологических расстройств. — СПб. 1997. С. 49—57.
80. Гордеева О.В., Мануилова Е.С., Гривенников И.А. // Онтогенез. — 2003. Т. 34. №3. С. 174—182.
81. Григорович К.А. Об оценке результатов хирургического лечения поврежденных нервов // Вестник хирургии. — 1977. №10. С. 131—133.
82. Григорьев Е.Г., Апарцин К.А., Матинян Н.С. и др. Органосохраняющая хирургия селезенки. — Новосибирск: Наука. 2001. С. 400.
83. Грубник В.В., Кошель Ю.Н., Величко В.В. и др. Современные подходы к лечению хирургических заболеваний селезенки // Анн. хир. гепатол. — 2000. Т. 5. №2. С. 272—273.
84. Губский Ю.И. Молекулярные механизмы повреждения мембран гепатоцитов при экспериментальном поражении печени // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — Киев. 1984. 33 с.
85. Гурвич А.М. Сущность и основные механизмы возникновения постреанимационной патологии мозга // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 1987. №3. С. 14—18.
86. Гурвич А.М., Алексеева Г.В., Семченко В.В. Постреанимационная энцефалопатия (патогенез, клиника, профилактика и лечение). — Омск: ИНК «Омич». 1996. 76 с.
87. Гурвич А.М., Заржечкий Ю.В., Аврущенко М.Ш. и др. Влияние активации поведения в постреанимационном периоде на функциональные и морфологические характеристики мозга // Анестезиология и реаниматология. — 1999. №1. С. 37—40.
88. Давыдова Т.В., Евсеев В.А., Фомина В.Г. и др. Подавление потребления алкоголя спленоцитами, экстракорпорально стимулированными вазоп-

- рессином, у мышей линии С57В1/6 // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2000. №6. С. 617–619.
89. *Давыденко В.В., Мачс В.М.* Стимулированный ангиогенез — новое направление в лечении при ишемических состояниях // Вестник хирургии им. И.И.Грекова. — 2000. №1. С. 117–120.
90. *Данилова Л.А., Федотенков А.Г., Петров Р.В. и др.* Влияние криоконсервирования на гомотрансплантационную активность лимфоцитов // Пробл. гематологии переливания крови. — 1978. №12. С. 21–25.
91. *Домрачев С.А., Курбанов Ф.С., Чиников М.А. и др.* Спленэктомия в гемолитической клинике // Анн. хир. гепатол. — 2000. Т. 5. №2. С. 274.
92. *Дунаев П.В., Туровина Л.П., Истомина О.Ф.* Органоспецифические особенности реакции гепатоцитов печени в экстремальных условиях воздействия // Российские морфологические ведомости. — 1999. №1–2. С. 32.
93. *Епифанов О.И., Терских В.В., Полуновский В.А.* Регуляторные механизмы пролиферации клеток // Итоги науки и техники. Серия: Общие проблемы физико-химической биологии. — М. 1988. Т. 10.
94. *Жданова Т.Ф., Солопаева И.М., Малюгин Г.В.* Стимуляция внутриклеточной регенерации гепатоцитов хорионическим гонадотропином (морфометрическое исследование) // Заболевания органов пищеварения: Сб. науч. тр. / Центр институт гастроэнтерологии. — М. 1980. №12/3. С. 55–61.
95. *Журавлева З.Н.* Ультроструктурное исследование пластики клеточных элементов и межклеточных взаимодействий в трансплантатах нервной ткани // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М. 1999. 78 с.
96. *Журавлева М.В., Рубецкой Л.С.* Гистохимическое изучение экспериментальной модели обратимого цирроза печени // Арх. пат. — 1970. Вып. 9. С. 19–24.
97. *Зарецкая Ю.М.* Актуальные вопросы клинической трансплантационной иммунологии // Журнал «Проблемы гемотрансфузиологии и переливания крови» — 1979. №10. С. 6–12.
98. *Зозуля Ю.А., Цимейко О.А., Цымбалюк В.И. и др.* Аллотрансплантация эмбриональной нервной ткани в сочетании с реваскуляризационными операциями в восстановительном лечении больных ишемическим инсультом // Нейрохирургия — Киев. 1991. Вып. 24. С. 36–40.
99. *Зубарев П.И., Еременко В.П.* Тактика хирурга при травме селезенки и последствия спленэктомии // Вестник хирургии им. Грекова. — 1990. №7. С. 55–58.
100. *Исаев А.А., Мелихова В.С.* Применение клеток пуповинной крови в клинической практике // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2008. Т. 111. №1. С. 34–46.
101. *Ионкин Д.А., Кубышкин В.А., Елагина Л.В. и др.* Отдаленные результаты вмешательства на селезенке // Анн. хир. гепатол. — 2000. Т. 5. №2. С. 275–276.

102. *Карамян А.И., Соллертинская Т.Н.* Эволюция поведения и нейропептиды // Материалы X Всесоюзного совета по эволюции физиологии. — 1990. С. 175–176.
103. *Карташова О.Я., Салдава Л.А., Залцмане В.К.* Реактивные изменения соединительной ткани печени // Успехи гепатологии / Под ред. А.Ф.Блюгера. — Рига. 1982. С. 142–155.
104. *Ким О.А., Ярыгин В.Н., Черных Г.В.* Приживляемость эмбриональных закладок супраоптического и паравентрикулярных ядер гипоталамуса человека в полости третьего желудочка головного мозга крыс // Онтогенез. — 1990. Т. 21. №4. С. 388–394.
105. *Кирпатовский И.Д.* Нейроэндокринная трансплантация как новое направление в современной трансплантологии, техника пересадки головного мозга (переднего гипоталамуса) на артериально-венозных связях и клинические результаты новой операции // Журнал «Трансплантология и искусственные органы». — 1998. №4. С. 61–62.
106. *Кичигина В.Ф., Брагин А.Г., Виноградова И.С.* Функциональная интеграция нервной ткани крысы при ксенотрансплантации в мозг кролика // Журн. высш. нервн. деят. — 1984. Т. 34. №5. С. 932–940.
107. *Киясов А.П., Одинцова А.Х., Гумерова А.А., Газизов И.М. и др.* Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2008. Т. 111. №1. С. 70–76.
108. *Клецинов В.Н.* Изменение нейронов мозга реципиента вокруг трансплантата эмбриональной нервной ткани // Онтогенез. — 1989. Т. 20. №2. С. 216–219.
109. *Кнорре Л.Г.* Эмбриональный гистогенез. — М.: Медицина. 1971. 431 с.
110. *Коваленко П.П.* Основы трансплантологии. — Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского университета. 1975. 180 с.
111. *Кованов В.В., Кулик В.П.* Пересадка органов пищеварения. — М.: Изд-во Университета дружбы народов. 1986. С. 4–5.
112. *Кожура В.Л.* Актуальные проблемы нейробиологии массивной кровопотери // Вестник РАМН. — 1997. №10. С. 10–13.
113. *Кожура В.Л.* Острое реперфузионное повреждение мозга: новые мишени для профилактики и терапии // Реаниматология и интенсивная терапия (Инф. сб.: «Новости науки и техники»). — 1998. №1. С. 13–17.
114. *Козлова Е.Н.* Дифференцировка нервных и глиальных клеток неокортикальных трансплантатов, помещенных в мозг взрослых крыс // Онтогенез. — 1990. Т. 21. №4. С. 388–394.
115. *Колосов Н.Г.* Иннервация внутренних органов и сердечно-сосудистой системы. — М.-Л.: Изд. АН СССР. 1954. С. 265.
116. *Константинов Б.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. и др.* Возможности и перспективы лечения критической ишемии с использованием генно-инженерных технологий // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2003. №3. С. 14–17.

117. *Корочкин Л.И., Михайлов А.Т.* Введение в нейрогенетику. — М.: Наука. 2000. 312 с.
118. *Корочкин Л.И.* Биология индивидуального развития. — М.: Наука. 2002. 263 с.
119. *Косых А.А., Бесараб И.Ю., Рощина Н.М.* Роль соединительной ткани в репаративной регенерации нормальной и цирротически измененной печени крыс // Регенерация, адаптация, гомеостаз / Сб. науч. тр. под ред. Б.П.Солопаева — Горький. 1990. С. 21—30.
120. *Котова Е.Н., Тугаринова В.Н.* Содержание цитохромов в митохондриях гепатоцитов при прогрессирующем цирротическом процессе в печени кроликов // Успехи гепатологии / Под ред. А.Ф.Блюгера. — Рига. 1986. Вып. С. 216—223.
121. *Кудрявцева М.В., Сакута Г.А., Емельянов А.В., Слепцова Л.А. и др.* Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и активности ферментов его метаболизма в гепатоцитах человека и животных при циррозе печени и в условиях реабилитации // Цитология. — 1994. Т. 36. С. 200—210.
122. *Кузин М.И., Данилов М.В., Благовидов Д.Ф.* Хронический панкреатит. — М.: Медицина. 1985. С.275—298.
123. *Кулик В.П.* Пересадка органов пищеварения — М. 1986. С. 6—8.
124. *Кулик В.П., Новиков В.К., Булава К.М., Фуругян П., Искренко И.А.* Пересадка взрослым животным поджелудочной железы плодов // Физиологический журнал им. Сеченова. — 1994. №10. С. 111.
125. *Лейниекс А.А.* Оценка эффективности трансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы у больных сахарным диабетом // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук — М. 1989. 25 с.
126. *Лейтес С.М., Лаптева Н.Н.* Очерки по патофизиологии обмена веществ. — М. 1967. 301 с.
127. *Ленков Д.Н., Верещак Н.И.* Восстановление локомоции после частичной декорткации и гомотрансплантации у белой крысы // В сб.: «Трансплантация тканей мозга млекопитающих» — Пушкино. 1988. С. 41—42.
128. *Лепехова С.А.* Ксенотрансплантация криоконсервированной культуры эмбриональных клеток печени в коррекции острой печеночной недостаточности (экспериментальное исследование) // Дисс. ... канд. биол. наук. — Иркутск. 1999. 128 с.
129. *Лисяный Н.И., Радзиевский А.А., Яворская С.А. и др.* Иммунотропное влияние трансплантации эмбрионального неокортекса в зону тяжелой закрытой травмы ЦНС // Сб.: «Взаимодействие нервной и иммунной систем». — Оренбург. 1990. С. 179—180.
130. *Литтман И.* Оперативная хирургия. — Будапешт. Издательство Академии наук Венгрии. Akademiai Kiado. 1985. С. 662—670.
131. *Лосева Е.В.* // Успехи физиол. наук. — 2001. Т. 12. №1. С. 19—37.
132. *Луцки А.А., Аничков А.Д., Полонский Ю.З., Низковолос В.Б.* Повреждения мозга. — СПб. 1999. С. 394—396.

133. *Луцкеина Е.А.* Трансплантация нервной ткани как фактор компенсации нарушенных функций: морфологические аспекты // Сб.: «Клеточно-тканевые механизмы адаптации к действию повреждающих факторов». Под ред. В.В.Семченко — Омск. 1990. С. 25—28.
134. *Лыжин А.А., Викторов И.В., Вербицкая Л.Б.* Трансплантация культивированной эмбриональной нервной ткани // В сб.: «Трансплантация тканей млекопитающих» — Пушино. 1988. С. 44—46.
135. *Лыжин А.А., Викторов И.В.* Нейроархитектоническая организация трансплантатов культивируемой ткани мозга // Материалы II Всесоюзного симпозиума «Возбудимые клетки в культуре тканей». — 1990. С. 114—117.
136. *Малайцев В.В., Богданова И.М., Сухих Г.Т.* // Архив патологии. — 2002. №4. С. 7—11.
137. *Малышев И.И.* Восстановительные процессы в нервной ткани при трансплантации головного мозга у молодых кроликов // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 1988. Т. 105. №5. С. 599—601.
138. *Маянский Д.Н.* Роль клеток соединительной ткани в процессах регенерации. — Йошкар-Ола. 1980. С. 114—123.
139. *Маянский Д.Н., Шварц Я.Ш., Цырендоржиев Д.Д., Кутина С.Н.* Функциональные перестройки системы мононуклеарных фагоцитов при экспериментальном циррозе печени // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1988. №2. С. 214—216.
140. *Маянский Д.Н., Щербаков В.И., Комлягина Т.Г.* Зависимость мононуклеарной инфильтрации печени от пролиферации гепатоцитов // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1984. №5. С. 620—624.
141. *Маянский Д.Н.* К изучению структуры печени при трансплантационной болезни // Журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» — 1978. №5. С. 24—28.
142. *Медицинская микробиология* / Под ред. В.И.Покровского — М.: ГЭОТАР Медицина. 1998. 1200 с.
143. *Мисник Л.И., Лебедев Д.А.* Деградация коллагена и ингибирование его синтеза при развитии цирроза печени // Актуальные проблемы клинической морфологии / Сб. науч. тр. I Моск. мед. инст. им. Сеченова. — М. 1982. С. 88—90.
144. *Михайлов В.П., Катинас Г.С.* Тканевой гомеостаз и его механизмы // IX Всесоюз. съезд анат., гист. и эмбр. / Тез. докл. — Минск: Наука и техника. 1981. С. 268—269.
145. *Михайлова Н.Г., Цукер А.В., Лосева Е.В., Ермакова И.В.* Влияние трансплантации эмбриональной ткани головного мозга (ранние сроки) на реакцию избегания зоосоциальных и искусственных стимулов у крыс // *Physiol. and Behav.* — 1991. V. 50. №4. P. 831—833.
146. *Мулдашев Э.Р., Уимен Т. Дж., Курчатова Н.Н. и др.* Влияние экстракта трансплантата для пластики века серии Allograft на синтез ДНК в культуре клеток // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — М. 1994. №1. С. 75—79.

147. *Муслимов С.А.* О роли передних и задних конъюнктивальных сосудов в кровоснабжении конъюнктивы глазного яблока. Морфологические аспекты микроциркуляции // Сборник научных трудов. — Уфа. 1981. С. 41—45.
148. *Муслимов С.А.* Микроциркуляторное русло конъюнктивы глазного яблока в норме и при экспериментальной аллопластике // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Ярославль. 1984. 20 с.
149. *Мустафин А.Х.* Применение пластических материалов при хирургическом лечении повреждений печени // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Уфа. 1995. 21 с.
150. *Назаренко Г.И., Кишкун А.А.* Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. — М.: Медицина. 2000. 544 с.
151. *Нартайлаков М.А.* Клинико-экспериментальное обоснование применения аллогенных трансплантатов и медицинских лазеров при хирургическом лечении больных с очаговыми заболеваниями и повреждениями печени // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М. 1995. 37 с.
152. *Нартайлаков М.А., Сафин И.А., Мулдашев Э.Р., Муслимов С.А. и др.* Новый подход к хирургическому лечению кист печени // Новые технологии в хирургии. Международный симпозиум. Тез. докл. — Уфа. 1994. С. 132—133.
153. *Нартайлаков М.А., Сафин И.А., Мингазов Р.С. и др.* Новые возможности применения лазеров в хирургии печени // Материалы 3-й Международной конференции «Актуальные вопросы лазерной медицины и операционной эндоскопии». — Москва-Видное. 1994. С. 99.
154. *Неговский В.А., Мороз В.В.* Актуальные вопросы реаниматологии // Анестезиология и реаниматология. — 1999. №1. С. 6—9.
155. *Нигматуллин Р.Т.* Морфологические аспекты пересадки соединительнотканых аллотрансплантатов // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — Новосибирск. 1996. 40 с.
156. *Нигматуллин Р.А.* Аллогенный плацентарный трансплантат в комплексном лечении острого гнойного лактационного мастита // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — 1991. 23 с.
157. *Низковолос В.Б., Аничков А.Д.* Повреждения мозга. — СПб. 1999. С. 398—400.
158. *Новиков К.Н.* Гепатоцит. — М.: Наука. 1985. С. 146—169.
159. *Новиков В.С.* Программированная клеточная гибель. — СПб. 1996. 276 с.
160. *Обухова Г.П., Сенаторов В.В.* Гомотопическая трансплантация эмбриональной ткани неокортекса в мозг взрослых крыс в условиях его повреждения // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. — 1987. Т. 93. №12. С. 5—11.
161. *Овечко В.Н.* Метод интрацеребральной имплантации эмбриональной нервной ткани. — СПб. 1994. 6 с.
162. *Овечко В.Н.* Нейрохирургическое лечение больных с цереброорганическим и эпилептическим синдромом методом трансплантации эмбриона-

- льной нервной ткани // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — СПб. 1995. 23 с.
163. *Оганесян Т.* Клетки свободной специализации // Эксперт — наука и технология. — 2002. №26. С. 45—48.
 164. *Онищенко Н.А., Базиева Ф.Х., Мамхегова Т.Р., Первакова Э.И.* К механизму восстановления функций пораженной печени с помощью устройств биоискусственной поддержки печени // Трансплантология и искусственные органы. — 1997. №4. С. 86—91.
 165. *Онищенко Н.А., Базиева Ф.Х., Иванова-Смоленская И.А. и др.* Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 1999. №1. С. 54—59.
 166. *Отеллин В.А., Гурчин Ф.А., Гилерович Е.Г. и др.* Интрапаренхимальная трансплантация эмбриональных нервных тканей как способ коррекции дефектов мозга // Сб.: «Вопросы структурно-медиаторной организации, трансплантации и регенерации нервной системы». АМН СССР — Л. 1985. С. 96—104.
 167. *Отеллин В.А., Гилерович Е.Г., Гусихина В.И. и др.* Дифференцировка нейронов в трансплантатах эмбрионального мозга человека // Сб. науч. тр. Ин-та мозга АМН СССР. — Л. 1987. №16. С. 43—46.
 168. *Отеллин В.А., Гилерович Е.Г.* Способ трансплантации участков головного мозга. Авторское свидетельство №1445704. — 1988.
 169. *Отеллин В.А., Гилерович Е.Г., Гурчин Ф.И.* Перспективы использования в клинике метода трансплантации эмбриональной нервной ткани для коррекции изменений функций ЦНС // Сб.: «Фундаментальные и прикладные вопросы реабилитации больных с позвоночно-спинальной травмой». — Симферополь. 1989. С. 142—147.
 170. *Отеллин В.А.* Нейробиологические проблемы структурно-медиаторной организации центральной нервной системы и нейротрансплантологии — СПб. 1992. С. 73—79.
 171. *Панченко Е.Л., Буркова М.И., Буркова А.С. и др.* Опыт применения трансплантации фетальных тканей человека при болезни Дауна у детей // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1994. №4. С. 373—374.
 172. *Пауков В.С., Кауфман О.Я.* Стадии воспаления // Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В.В.Серова, В.С.Паукова. — М.: Медицина. 1995. С. 176—182.
 173. *Пермяков Н.К., Хучуа А.В., Туманский В.А.* Постреанимационная энцефалопатия. — М.: Медицина. 1986. 240 с.
 174. *Петровский Б.В., Шумаков В.И.* Хирургическая гепатология. — М. 1972. 322 с.
 175. *Подачин В.П.* Компенсация нарушений поведения методом трансплантации эмбриональной нервной ткани // Сб.: «Мозг и поведение». Ин-т ВИД и НФ. — М.: Наука. 1990. С. 532—541.
 176. *Подымова С.Д.* Болезни печени. — М.: Медицина. 1993. 544 с.
 177. *Покровский А.В.* Основные принципы диагностики и лечения критической ишемии конечностей при тромбооблитерирующих поражениях ар-

- терий // Хроническая критическая ишемия конечности. — Москва-Тула. 1994. С. 195–196.
178. *Покровский А.В., Дан В.Н., Чупин А.В., Харазов А.Ф.* Можно ли предсказать исход реконструктивной операции у больных с ишемией нижних конечностей на основании дооперационных исследований // *Ангиология и сосудистая хирургия*. — 2002. №3. С. 103–109.
 179. *Покровский А.В., Дан В.Н., Чупин А.В., Харазов А.Ф. и др.* Артериализация венозного кровотока стопы в спасении нижней конечности при критической ишемии у больных с атеросклерозом и сахарным диабетом // Тез. докл. симпозиума «Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний», 17–18 октября 2001 г. — Москва. С. 110.
 180. *Полежаев Л.В., Александрова М.А.* Трансплантация ткани мозга в норме и патологии. — М.: Наука. 1986. 152 с.
 181. *Полежаев Л.В.* Последние данные по трансплантации нервной ткани в центральную нервную систему млекопитающих и человека // В сб.: «Трансплантация ткани мозга млекопитающих» — Пушкино. 1988. С. 51–52.
 182. *Полежаев Л.В., Александрова М.А., Клешинов В.Н.* О возможности синтеза ДНК и митотического деления нейронов при трансплантации эмбриональной нервной ткани в головной мозг крыс // В сб.: «Трансплантация ткани мозга млекопитающих». — Пушкино. 1988. С. 54–55.
 183. *Полтавцева Р.А., Ревущин А.В., Александрова М.А. и др.* Онтогенез. — 2003. Т. 34. №3. С. 204–210.
 184. *Поляков А.А., Тарабыкин В.А., Корочкин Л.И. и др.* // Докл. РАН. — 2003. Т. 392. №2. С. 315–318.
 185. *Попов М.В., Галеев Ю.М., Аюшинова Н.И., Апарцин К.А.* Оценка функционального состояния оперированной селезенки методом динамической гамма-сцинтиграфии // *Медицинская визуализация*. — 2001. №3. С. 45–51.
 186. *Потапов И.В.* Трансплантация фетальных кардиомиоцитов и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в криповрежденный миокард // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Москва. 2003. 27 с.
 187. *Прокопьев М.В.* Применение ксенотрансплантации криоконсервированных клеток селезенки для коррекции постспленэктомического гипоспленизма (экспериментальное исследование) // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Иркутск. 2001. 25 с.
 188. *Прохоров А.В.* Хирургическое лечение инсулинзависимого сахарного диабета путем ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы в артериальное русло (экспериментально-клиническое исследование) // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — Минск. 2005. 42 с.
 189. *Пулин А.Г., Малышев А.Н., Нащекин В.О.* Опыт хирургического лечения больных с поражением дистального артериального русла нижних конечностей на фоне сахарного диабета // Тез. докл. симпозиума «Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний», 17–18 октября 2001 г. — Москва. С. 112.

190. Рабинович С.С., Фомичев Н.Г., Мосунов А.И. и др. Реваскуляризация контузионных очагов спинного мозга // I съезд нейрохирургов России. Тезисы. — 1995. С. 161–162.
191. Раевская М.В. Получение β -клеточной линии из селезенки мышей и ее характеристика // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1995. №2. С. 183–186.
192. Радзиховский А.П., Бабенко В.И., Беляева О.А., Теслюк И.И. и др. Хирургическая тактика при механической желтухе неопухолевого генеза // Тезисы I Московского международного конгресса хирургов. — Москва. 1995. 255 с.
193. Рахматуллин С.И. Экспериментальное обоснование возможности лечения цирроза печени путем пересадки эмбриональных клеток // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Уфа. 2000. 32 с.
194. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. — М.: БЭБиМ. 1998. 250 с.
195. Репин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. — М.: Реметэкс. 2002. 175 с.
196. Романова Л.К. Регуляция восстановительных процессов. — М.: МГУ. 1984. 175 с.
197. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. — М.: Медицинское информ. агентство. 2003. 910 с.
198. Рывняк В.В., Гудумак В.С., Оня Е.С. Электронно-гистохимическое выявление внутриклеточной и внеклеточной локализации катепсина D в печени // Бюл. exper. биол. и мед. — 1996. №2. С. 200–203.
199. Рябов Г.А. Синдромы критических состояний. — М.: Медицина. 1994. 368 с.
200. Савельев С.В. Трансплантация ткани эмбрионального головного мозга // Арх. патологии. — 1992. Т. 54. №11. С. 43–46.
201. Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. — М.: Медицина. 1997. С. 78–100.
202. Савченко Ю.Н., Еренцев С.И., Генне Р.И., Семченко В.В. Динамика фенотипически и генотипически обусловленной высокой судорожной активности мозга при внутримозговой аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани // Журнал неврологии и психиатрии. — 1993. Вып. 1. Т. 93. С. 3–7.
203. Савельев С.В., Лебедев В.В., Войтына С.В. и др. Трансплантация фетальной и ксеногенной нервной ткани при болезни Паркинсона // Бюл. exper. биол. и мед. — 1994. №4. С. 369–372.
204. Садовникова В.В., Солопаева И.М., Бобылева Н.А., Иванова Н.Л., Садовникова И.В., Смирнова Е.М. Морфологические аспекты регенерации патологически измененной печени // Морфология. — 1998. Т. 113. №3. С. 105.
205. Сакута Г.А., Кудряцев Б.Н. Клеточные механизмы регенерации циррозной печени крыс // Цитология. — 1996. Т. 38. №11. С. 1158–1170.

206. *Сакута Г.А.* Клеточные механизмы регенерации цирротически измененной печени // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — СПб. 1997. 18 с.
207. *Сафин И.А., Нартайлаков М.А., Мустафин А.Х., Бакиров С.Х. и др.* Использование «трансплантата для замещения объемных дефектов» в хирургии печени // Метод. рекомендации. — Уфа. 1994. 10 с.
208. *Секамова С.М., Бекетова Т.П.* Функциональная морфология печени // Морфологическая диагностика заболеваний печени / Под ред. В.В. Серова, К.Лапиша — М.: Медицина. 1989. С. 8—36.
209. *Сергеев В.С.* Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2005. №2. С. 39—42.
210. *Серов В.В.* От целлюлярной патологии Вирхова до молекулярной патологии сегодняшнего дня // Архив патологии. — 2001. Т. 63. №1. С. 3—5.
211. *Серов В.В., Лапиш К.* Морфологическая диагностика заболеваний печени. — М.: Медицина. 1989. 336 с.
212. *Сетков Н.А., Казаков В.П., Андреева Т.В., Седов К.Р.* Гепатоциты из печени мышей с экспериментальным посттоксическим циррозом стимулируют в гетерокарионах синтез ДНК в ядрах покоящихся фибробластов линии NIH 373 // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1991. №9. С. 298—301.
213. *Скалецкий Н.Н.* Культуры островковых клеток поджелудочной железы и их трансплантация в эксперименте и клинике // Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М. 1999. 69 с.
214. *Смоляр А.Н.* Хирургическая тактика при повреждениях селезенки в свете ближайших и отдаленных результатов // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — М. 2001. 24 с.
215. *Соловьев Ю.Н., Блохина Н.Г., Брызгалов И.П., Ревазова Е.С.* Трансплантация эмбриональных человеческих тканей бестимусным мышам // Бюллетень экспер. биол. и мед. — 1985. №3. С. 334—336.
216. *Солопаев Б.П., Бобылева Н.А.* Регенерация печени с экспериментальным циррозом после четырехкратной резекции // Бюл. экспер. биол. и мед. — 1980. №10. С. 433—485.
217. *Сухих Г.Т.* Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее // Бюл. экспер. биол. и мед. — 1998. Т. 126. Приложение 1. С. 3—10.
218. *Строжаков Г.И., Эттингер О.А.* Перспективы использования стволовых клеток в гепатологии // Медицинская кафедра. — 2006. №3—4. С. 4—7 и 97—103.
219. *Тимербулатов В.М., Фаязов Р.Р., Тимербулатов Ш.В., Саялов М.М. и др.* Перспективы использования трансплантации селезеночной ткани при экспериментальной инсулиновой недостаточности // Вестник Уральской медицинской академической науки. — Екатеринбург 2006. №1. С. 113—116.
220. *Тимербулатов В.М., Фаязов Р.Р., Хасанов А.Г., Рахматуллин С.И. и др.* Возможна ли коррекция инсулиновой недостаточности путем ауто-трансплантации селезеночной ткани? / Хирургия. — 2006. №3. С. 22—28.

221. *Тимербулатов В.М., Фаязов Р.Р., Хасанов А.Г. и др.* Хирургия абдоминальных повреждений. — М.: МЕДпресс-информ. 2005. 255 с.
222. *Тимербулатов М.В., Хасанов А.Г., Фаязов Р.Р., Каюмов Ф.А.* Органосохраняющая и мини-инвазивная хирургия селезенки. — М.: МЕДпресс-информ. 2004. 218 с.
223. *Усейнов Э.Б., Исаев А.Ф., Киселевский М.В., Алимов А.Н.* Проблема послеоперационных гнойно-септических осложнений при травме живота с повреждением селезенки в свете иммунных нарушений // Хирургия. — 2006. №2. С. 69–72.
224. *Урываева И.В., Фактор В.М.* Полная смена клеточного состава паренхимы печени после воздействия дипина и частичной резекции // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 1988. №1. С. 77–79.
225. *Ушаков В.Ф., Палиенко Л.А., Лившиц К.И., Гриша И.П., Крамарь С.Д., Филимонова Л.А.* Состояние клеточной поверхности гепатоцитов при действии четыреххлористого углерода // Арх. анат., гист. и эмбриол. — 1990. Т. 99. №12. С. 44–48.
226. *Федорова Е.А., Отеллин В.А.* Влияние иммунной супрессии на приживляемость и развитие неокортекса человека, пересаженного в спинной мозг взрослой крысы // Морфология. — 1992. Т. 102. №5. С. 19–25.
227. *Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А.* Клеточные основы кроветворного микроокружения. — М.: Медицина. 1980. 216 с.
228. *Цыпин А.Б., Шумаков В.И., Онищенко Н.А. и др.* Пептиды, обладающие иммуностимулирующей активностью, способ их получения, лекарственный препарат на их основе спленонид и его применение // Патент РФ 98106075. — 2000.
229. *Цымбалюк В.И., Пичкур Л.Н., Мартынюк В.Ю.* Нейротрансплантация в лечении последствий апаллического синдрома // I съезд нейрохирургов России. Тезисы. — 1995. С. 317–318.
230. *Черных Е.Р., Старостина Н.М., Пальцев А.И., Леплина О.Ю. и др.* Аутологичные клетки костного мозга при лечении цирроза печени // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2007. №4. С. 231–237.
231. *Чикаев В.Ф., Сафина Н.А., Зинкевич О.Д.* Влияние гемоспленоперфузии на состояние гуморального иммунитета при гнойно-септических осложнениях в неотложной абдоминальной хирургии // Вестн. хир. — 2000. Т. 159. №1. С. 21–23.
232. *Чуклин С.Н.* Влияние аутотрансплантации ткани селезенки на иммунорегуляторный статус организма // Анн. хир. гепатол. — 2000. Т. 5. №2. С. 292–293.
233. *Шапкин Ю.Г., Киричук В.Ф., Масляков В.В.* Иммунный статус в отдаленном периоде у пациентов, оперированных по поводу повреждений селезенки // Хирургия. — 2006. №2. С. 14–18.
234. *Шапкин Ю.Г., Чалык Ю.В., Масляков В.В.* Возможности и результаты органосохраняющих операций при травмах селезенки // Вестн. хир. — 2000. №4. С. 41–42.

235. Шевченко Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. — СПб: Наука. 2006. 287 с.
236. Шрамка М., Раттай М., Раттай И. и др. Результаты клинической нейротрансплантации эмбриональной ткани при болезни Паркинсона // Вопросы нейрохирургии. — 1993. №1. С. 15–16.
237. Шумаков В.И., Игнатенко С.Н., Блюмкин В.Н. и др. Клинические результаты аллогенной и ксеногенной трансплантации культур островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом // Трансплантация и искусственные органы. — М. 1984. С. 19–21.
238. Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.Н. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы. — М.: Канон. 1995. 382 с.
239. Шумаков В.И. Трансплантология. Руководство. — М.: Медицина; Тула: Репроникс Лтд. 1995. 391 с.
240. Шумаков В.И., Хубутия А.Ш., Онищенко Н.А. Заготовка, криоконсервация и применение в перфузионных системах детоксикации организма // Сб. тез. симпозиума по проблемам тканевых банков с международным участием «Биоимплантология на пороге XXI века». — Москва. 2001. С. 148–149.
241. Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онищенко Н.А. и др. // Российский кардиологический журнал. — 2003. №5. С. 42–50.
242. Шустин В.А., Говенько Ф.С., Корзнев А.В., Шлепаков И.М. // 2-й съезд нейрохирургов России. — Н. Новгород. 1998. С. 202–203.
243. Щедрина М.А. Результаты микрохирургической аутотрансплантации большого сальника при лечении больных с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей 3–4-й степени // Тез. докл. симпозиума «Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний», 17–18 октября 2001 г. — Москва. С. 155.
244. Юрченко Н.Д., Колокольцова Т.Д., Шумакова О.В. и др. Создание аттестованных банков фибробластов человека, пригодных для лечения ран различной этиологии // Клинические аспекты клеточной и тканевой терапии: Материалы II межрегион. науч.-практ. конф. — Омск. 2000. С. 182–184.
245. Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. Functional diversity of helper T-lymphocytes / Nature — 1996. №383. P. 1059–1066.
246. Al-Ahmadi M., Brundage S., Brody F., Jacobs L., Sackier J.M. Splenosis of the mesoappendix: case report and review of the literature. // J R Coll Surg Edinb. 1998 Jun; 43 (3):200 — 2. PMID: 9654886.
247. Alvizoun-Mimos M., Angeies-Angeles A., Orozco-Esteves H., Larriva Sand J. Rapeseed diet and hepatocyte hypertrophy: an experimental morphometric study // Rev. Invest. Clin. — 1992. Apr-Jun. Vol. 44. №2. P. 187–192.
248. Andrus P.A., Taylor B.M., Sun F.F., Hall E.D. Effects of the lipid peroxidation inhibitor lirilazad mesylate (U-74006F) on gerbil brain eicosanoid levels following ischemia and reperfusion // Brain Res. — 1994. Vol. 659. №1–2. P. 126–132.

249. Appel J.Z., Alwayn J.P.N., Cooper D.K.C. Xenotransplantation: the challenge to current psychological attitudes / Progress in Transplantation — 2000. Vol. 10. №4. P. 217–225.
250. Arzoumanian A., Rosenthal L. Splenosis // Clin Nucl Med. — 1995. Aug; 20 (8):730-3. PMID: 7586882.
251. Ariosto F., Riggio O., Cantafora A., Colucci S., Gaudio E., Mechelli C., Merit M.L., Seri S., Capocaccia L. Carbon tetrachloride-induced experimental cirrhosis in the rat: a reappraisal of the model // Eur-Surg-Res. — 1989. Vol. 21(5). P. 280–286.
252. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. — 1997; 275: 964–967.
253. Asahara T., Masuda H., Takahashi T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ Res. — 1999; 85: 221–228.
254. Badet L., Titus T. et al. The interaction between primate blood and mouse islets induces accelerated clotting with islet destruction// Xenotransplantation — 2002. №9. Issue 2. P. 91.
255. Ban T.A., Panzarasa R.M., Borra S. et al. Choline alphocerate in elderly patients with cognitive decline due to dementing illness // New Trends of Clinical Neuro-pharmacology. — 1991. Vol. 5. P. 1–35.
256. Barde V.A. Trophic factors and neuronal survival // Neuron. — 1989. Vol. 2. №6. P. 1525–1534.
257. Baue A.B., Bonawick W.J. The immunologic response to heterotopic allovital aortic valve transplants in presensitized and nonsensitized recipients / J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 1968. Vol. 56. №6. P. 775–788.
258. Berman N.E., Johnson J.K., Klein R.M. Early generation of glia in the intermediate zone of the developing cerebral cortex // Brain Res. Develop. — 1997. Vol. 101. P. 149–164.
259. Bernstein J.J., Golberg W.J. Graft derived reafferentation of nost spinal cord is not necessary for amelioration of lesion induced deficits: possible role of migrating grafted astrocytes // Brain Res. Bull. — 1989. Vol. 22. №1. P. 139–146.
260. Bjorklund A., Stenevi U. Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system // Physiol. Rev. — 1979. Vol. 59. №1. P. 62–100.
261. Bjorklund A., Stenevi U. Intracerebral neural grafting: A historical perspective // Neural Grafting Mammalian CNS. Amsterdam e. a. — 1985. P. 3–14.
262. Bobzien B., Yasunami Y., Majercik M. et al. Intratesticular transplantation os islet xenografts (rat to mouse) // Diabetes — 1983. Vol. 32. Issue 3. P. 213–216.
263. Bosi E., Braghi S. et al. Autoantibody rsepponse to islet transplantation in type 1 diabetes // Diabetes — 2001. №50. P. 2464–2471.
264. Bonni A., Sun Y., Nadal-Vicens M., Bhatt A., Frank D.A., Rozovsky J. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway // Science. — 1997. Vol. 278. P. 177–183.

265. *Bosch J., Bmix J., Mas A., Navasa M., Rodes J.* Rolling review: the treatment of major complications of cirrosis // *Aliment. Pharmacol. Ther.* — 1994. Vol. 8. P. 639–657.
266. *Brunetti P., Basta G. et al.* Immunoprotection of pancreatic islet grafts within artificial microcapsules // *Int. J. Artif. Organs* — 1991. №14. P. 789–791.
267. *Campbell I.L., Iscaro A., Harrison L.C.* IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans // *J Immunol/* — 1988. №141. P. 2325–2329.
268. *Chen M.F., Hwang T.L.* The regeneration of cirrhotic liver after partial hepatectomy: a study using the rat carbon tetrachloride-induced cirrhotic model. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China. B.* — 1994. Apr. Vol. 18. №2. P. 71–75.
269. *Chijiwa K., Nacano K., Kameoka N., Nagai E., Tanaka M.* Proliferating cell nuclear antigen, plasma fibronectin, and liver regeneration rate after seventy percent hepatectomy in normal and cirrotic rats // *Surgery.* — 1994. Sep. Vol. 116. №3. P. 544–549.
270. *Cotterell A.H., Collins B.H. et al.* The humoral immune response in humans following cross-perfusion of porcine organs // *Transplantation* — 1995. №60. P. 861–868.
271. *Cox A.W., Brown M.H.* Results of Multi-target limbic surgery in the treatment of schizophrenia and aggressive states. — Madrid. 1975. P. 469–479.
272. *Cuevas P., Carceller F., Munoz-Willery I. et al.* Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury // *Surg. Neurol.* — 1998. Vol. 49. №1. P. 77–83.
273. *Czaja M.I., Weiner F.R., Flanders F.C.S., Giambrone M., Wind R., Biempica L., Zem M.A.* In vitro and in vivo association of transforming grown factor-Qerral with hepatic fibrosis // *J. Cell. Biol.* — 1989. Vol. 108. P. 2477–2482.
274. *Das G.D.* Neural transplantation in normal and traumatized spinal cord // *Acad. Sci.* — 1987. Vol. 495. №9. P. 53–69.
275. *De Backer A.I., De Schepper A.M.* Splenosis. // *JBR-BTR.* — 2000. Aug; 83 (4):203-4. PMID: 11126792.
276. *De Vos P., De Haan B.J. et al.* Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation and survival of microencapsulated rat islet allografts // *Transplantation* — 1996. №62. P. 893–899.
277. *De Vos P., Hamel A.F., Tatarkiewicz K.* reviews: Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets / *Diabetologia* — 2002. Vol. 45. Issue 2. P. 159–173.
278. *Deutsch J.C., Sandhu I.S., Lawrence S.P.* Splenosis presenting as an ulcerated gastric mass: endoscopic and endoscopic ultrasonographic imaging. // *J Clin Gastroenterol.* — 1999. Apr; 28 (3):266-7. PMID: 10192620.
279. *Diem P., Redmon J.B., Abid M.M. et al.* Glucagon, catecholamine and pancreatic polypeptide secretion in type I diabetic recipients of pancreas allografts // *J. Clin. Invest.* — 1990. 86:2008 — 2013.
280. *Drawan A. et al.* Hepatocyte transplantation for inherited factor V11 deficiency. // *Transplantation* — 2004; 78; 12; 1812-4.

281. *Dunnett S.B., Bjorklund A., Stenevi U.* Neural tissue transplantation research. — New-York. 1983. P. 191–216.
282. *Dunnett S.B., Bjorklund A.* Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain // *J. Exp. Biol.* — 1987. Vol. 132. P. 265–289.
283. *Dunn J., McLetchie N., Sheehan H.* Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. — *Lancet*. 1943. Vol. 244. №6242. P. 484–487.
284. *Expert J.J., Targarona E.M., Bombuy E. et al.* Evaluation of risk of splenosis during laparoscopic splenectomy in rat model. // *Wld J Surg* — 2001; 25:7:882–885.
285. *Ferrara N., Oulsy F., Gospodarowicz D.* Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, a neurotropic angiogenic mitogen // *Brain Res.* — 1988.
286. *Flisiak R.* Role of Ito cells in the liver function // *Pol. J. Pathol.* — 1997. Vol. 48. №3. P. 139–145.
287. *Freeman T.B., Kordower J.H.* // *Intracerebral Transplantation in Movement Disorders* / Eds J. Lindvall, A. Bjorklund, H. Widner. — 1991. P. 163–170.
288. *Fritschy W.M., Wolters G.H., Van Schilfgaarde R.* Effect of alginate-polylysine-alginate microencapsulation on in vitro insulin release from rat pancreatic islets // *Diabetes* — 1991. №40. P. 37–43.
289. *Gaudio E., Pannarale L., Franchitto A., Riggio O.* Zinc supplementation in experimental liver cirrhosis: a morphological, structural and ultrastructural study // *Int-J-Exp-Pathol.* — 1993. Oct. Vol. 74. №5. P. 463–469.
290. *Geisler A., Stiller K., Machnic G.* The cellular reproduction in physiological and reparative liver regeneration // *Exp-Toxicol-Pathol.* — 1994. Aug. Vol. 46. №3. P. 247–250.
291. *Gererts A., Lazou J. M., De-Bleser P., Wisse E.* Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver // *Hepatology.* — 1991. Jun. Vol. 13. №6. P. 1193–2002.
292. *Gerling P., Stokke T., Huitfeldt H.S., Stenersen T., Danielsen H.E., Grotmol T., Seglen P.O.* Analytical methods for the study of liver cell proliferation // *Cytometry.* — 1992. Vol. 13. P. 404–415.
293. *Gill R., Andine P., Hillered L. et al.* The effect of MK 801 on cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischemia in the rat // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1992. P. 371–379.
294. *Gilland E., Puka-Sundvall M., Andine P. et al.* Hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain: effects of pre-and post-treatment with the glutamate release inhibitor BW 1003C87 // *Dev. Brain Res.* — 1994. Vol. 83. №1. P. 79–84.
295. *Greenwel P., Schwartz M., Rosas M., Peyrol S., Grimaud J.A., Rojkmnd M.* Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CC14-cirrhosis livers. Differences in the production of interleukin — 6 // *Lab-Invest.* — 1991. Dec. Vol. 65. №6. P. 644–653.
296. *Griffin W.S., Stanley L.C., Ling C., White L. et al.* Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 1989. Vol. 86. №19. P. 7611–7615.

297. *Groth C.G., Korsgren O. et al.* Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients // *Lancet* — 1994. Vol. 344. №8934. P. 1402–1404.
298. *Gupta V., Wahoff D.C., Rooney D.P. et al.* The defective glucagons response from transplanted intrahepatic pancreatic islets during hypoglycemia is transplantation site-determined // *Diabetes* — 1997, 46:28 — 33.
299. *Hadorn E.* Developmental Genetics and Lethal Factors. London — N.Y. 1961. John Wiley & Sons. 360 p.
300. *Hamazaki K., Sato S., Yunoki M., Noda T., Moreira L.F., Mimura H., Orita K.* Kupffer cell function in chronic liver injury and after partial hepatectomy // *Res. Exp. Med. (Berl)* — 1994. Vol. 194. №4. P. 237–246.
301. *Hardin V.M., Morgan M.E.* Thoracic splenosis. // *Clin Nucl Med* — 1994; 19: 438–40.
302. *Hashimoto M., Kothary P.C., Eckhauser F.E., Raper S.E.* Treatment of cin'honc rats with epidermal growth factor and insulin accelerates liver DNA synthesis after partial hepatectomy // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 1998. Dec. Vol. 13. №12. P. 1259–1265.
303. *Hayward I., Mindelzun R.E., Jeffrey R.B.* Intrapancreatic accessory spleen mimicking pancreatic mass on CT scan. // *J Comput Assist Tomogr* — 1992; 16: 984–5.
304. *Hernandez-Munoz R., Diaz-Munoz M., Lopez V., Lopez-Barrera F., Yanez L., Vidrio S.* Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: protective role of adenosine administration // *Hepatology*. — 1997. Nov. Vol. 26. №5. P. 1100–1110.
305. *Heneine W., Tibell A. et al.* No evidence of infection with endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts // *Lancet* — 1998. Vol. 352. Issue 9129. P. 695–699.
306. *Herbst H., Milani S., Heinrichs O., Schuppan D.* Pathomorphology of acute and chronic stages of CCl₄-induced liver fibrosis: immunohistochemical and in situ hybridization studies // *Z. Gastroenterol.* — 1992. Mar. Vol. 30. №21. P. 21–28.
307. *Hoffman A.L., Rosen H.R., Ljubimova J.H., Sher L., Podesta L.G., Demetrian A.A., Macowka L.* Hepatic regeneration: Current concepts and clinical implication // *Semin. Liver Dis.* — 1994. Vol. 14. P. 190–209.
308. *Hunter K.E., Hatten M.E.* Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 1995. Vol. 92. P. 2061–2065.
309. *Hwang T.L., Yu H.C., Chen P.C., Chen M.F.* Liver regeneration following partial hepatectomy and stimulation by cirrhotic and non-cirrhotic rats // *Res. Exp. Med. (Berl)*. — 1995. Vol. 195. №4. P. 201–208.
310. *Ishizak Y., Komavasu T., Murota S.* A migration stimulated factor for vascular endothelial cells is released by cultured astrocytes // *Proc. Japan. Acad.* — 1990. Vol. 66. Ser. B. №4. P. 81–82.
311. *Jonsson J., Eloy R., Haffen K., Keding M., Yrenier J.* Chick embryo pancreatic transplants reverse experimental diabetes of rats // *J. Clin. Invest.* — 1979. Vol. 64. №2. P. 361–373.

312. *Juurlink B.H., Sweeney M.I.* Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 1997. Vol. 21. №2. P. 121–128.
313. *Kaibori M., Kwon A.N., Nakagawa M., Wei T., Uetsuji S., Kamiyama Y., Okumura T., Kitamura N.* Stimulation of liver regeneration and function of Recombinant human hepatocyte growth factor // *J. Hepatol.* — 1997. Aug. Vol. 27. №2. P. 381–390.
314. *Kaido T., Yoshikawa A., Seto S., Yamaoka S., Sato M., Ishii T., Imamura M.* Portal branch ligation with a continuous hepatocyte growth factor supply makes extensive hepatectomy possible in cirrhotic rats // *Hepatology.* — 1998. Sep. Vol. 28. №3. P. 756–760.
315. *Katz D.S., Moshiri M., Smith G. et al.* Spontaneous hemorrhage of abdominal splenosis. // *J Comput Assist Tomogr.* — 1998. Sep-Oct; 22 (5):725 — 7. PMID: 9754105.
316. *Kaufman D.B., Platt J.L., Rabe F.L. et al.* Differential roles of Mac-1+ cells and CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts // *J Exp. Med.* — 1990. №172. P. 291–302.
317. *Kendall D.M., Teuscher A.U., Robertson R.P.* Defective glucagons secretion during sustained hypoglycemia following successful islet allo- and autotransplantation in humans // *Diabetes* — 1997. 46:23–27.
318. *Kil H.Y., Zhang J., Piantadosi C.A.* Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia / reperfusion in rats // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1996. Vol. 16. №1. P. 100–106.
319. *Kiroff G.K., Mangos A., Cohen R. et al.* Splenic regeneration following splenectomy for traumatic rupture. // *Austr. N Z J Surg* — 1983; 53:5:431–434.
320. *Kitamura T., Wa anabe S., Sato N.* Liver regeneration, liver cancers and cyclins // *J. Gastroenterology. Hepatol.* — 1998. Sep. Vol. 13. P. 96–99.
321. *Kodama S., Davis M., Faustman D.L.* Diabetes and Stem Cell Researchers Turn to the Lowly Spleen // *Sci. Aging. Knowl. Environ.* — 2005. V. 3. P. 2–3.
322. *Kodama S., Davis M., Faustman D.L.* Diabetes and Stem Cell Researchers Turn to the Lowly Spleen. *Sci. Aging Knowl. Environ.* — 2005. Issue 3.
323. *Kodama S., Faustman D.L.* Routes to regenerating islet cells: stem cells and other biological therapies for type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* — 2004. 5 Suppl 2:38–44.
324. *Krahlentuhl S., Reichen J., Zimmermann A., Gehr P., Stucki J.* Mitochondrial structure and function in CCl₄-induced cirrhosis in the rat // *Hepatology.* — 1990. Sep. Vol. 12. №3. P. 526–532.
325. *Krebs W., Krebs I.P.* The fiber system of the choroidocapillaris // *Histopathol.* — 1990. Vol. 5. №2. P. 219–224.
326. *Korsgren O., Sandler S., Landstrom A.S. et al.* Large-scale production of fetal porcine pancreatic isletlike cell clusters. An experimental tool for studies of islet cell differentiation and xenotransplantation // *Transplantation.* — 1988. 45(30):509–514.
327. *Kovarik J., Mandel T.E.* Islet transplantation // *Transpl. Proc.* — 1999. 31:45–48.

328. *Koulmanda M., Qipo A., Smith R.N.* Pig islets xenografts are resistant to autoimmune destruction by non-obese diabetic recipients after anti CD4 treatment // *Xenotransplantation* — 2003. Vol. 10. P. 178–184.
329. *Kumar R.J., Borzi P.A.* Splenosis in a port site after laparoscopic splenectomy. // *Surg Endosc* — 2001.; 15:4: 413–414.
330. *Lacy P., Kostianovsky M.* Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas // *Diabetes* — 1967. №16. P. 35–39.
331. *Lakshmi K.G., Nitta Y. et al.* Indications of islet allotolerance in nonhuman primates // *Ann. NY Acc. Sci.* — 2002. №958. P. 199–203.
332. *Lau H., Reemtsma K., Hardy M.A.* Prolongation of rat islet allograft survival by direct ultraviolet irradiation of the graft // *Science* — 1984. №223. P. 607–609.
333. *Lee V.M., Stoffel M.* Bone marrow: An extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cell? // *J. Clin. Invest.* — 2003. V. 6. P. 799–801.
334. *Liu Eric H., Herold Kevan C.* Transplantation of the isles of Langerhans: New hope for treatment of type 1 diabetes mellitus // *TEM* — 2000. №9. P. 379–382.
335. *MacKenzie D.A., Sollinger H.W., Hullet D.A.* Analysis of pessenger cell composition of human fetal pancreas: implications for transplantation. // *Transpl. Proc.* — 1999. №254. P. 1782–1784.
336. *Mandrup-Poulsen T., Bendtzen K. et al.* Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic beta-cell cytotoxicity // *J. Immunol.* — 1987. №139. P. 4077–4082.
337. *Marchenisi G., Zoli M., Dondi C., Angiolini A., Forlani G., Melli A., Bianchi F.B., Pisi E.* Blood glucose and glucoregulatory hormones in liver cirrhosis: a study of 24 hour profiles and of the role of portal-systemic shunting // *Gastroenterology. Clin. Biol.* — 1982. Vol. 6. P. 272–278.
338. *Marciano F.F., Wiegand S.S., Sladex J.R., Gash D.M.* Fetal hypothalamic transplants promote survival and functional regeneration of acomotized adult supraoptic magnocellular neurons // *Brain Res.* — 1989. Vol. 483. №1. P. 135–142.
339. *Martinez-Hernandez A., Martinez J.* The role of capillarization in hepatic failure: studies in carbon tetrachloride-induced cirrhosis // *Hepatologi.* — 1991. Nov. Vol. 14. №5. P. 864–874.
340. *Matsumoto K., Nakamura T.* HGF: its organotrophic role and therapeutic potential // *Ciba Found Symp.* — 1997. Vol. 212. P. 198–211.
341. *Marion D.W., Leonov Y., Ginsberg M. et al.* Resuscitative hypothermia // *Crit. Care Med.* — 1996. Vol. 24 (2 Suppl). P. 81–89.
342. *McPaul J.J., Stastny P., Freeman R.B.* Specificities of antibodies eluted from human cadaveric renal allografts // *J. Clin. Invest.* — 1981. №67. P. 1405–1414.
343. *Melchiorri C., Bolond L., Chieco P., Pagnoni M., Gramantierry L., Barbara L.* Diagnostic and prognostic value of DNA ploidy and cell nuclearity in ultrasound guided liver biopsies // *Cancer.* — 1994. Vol. 74. P. 1825–1830.
344. *Migliorini R., Chaikoff I.* Pancreatectomy in rats: onset of metabolic changes in liver, adipose and diaphragm. / *Amer. J. Physiol.* — 1962. Vol. 203. №6. P. 1019–1023.

345. *Mitsuo Y., Takeshi S., Toru U. et al.* A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of α -tocopherol administration // *Stroke*. — 1993. Vol. 14. P. 977–982.
346. *Morohoshi I., Hamamoto T., Kuniimura T. et al.* Epidermoid cyst derived from accessor spleen in the pancreas. A case report with literature survey. // *Acta Pathol Jpn* — 1991. 41: 916–21.
347. *Musaro A. et al.* Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. *PNAS* — 2004; 101; 5: 1206–1210.
348. *Muldashev E.R., Sibiryak S.V., Muslimov S.A., Kurchatova N.N., Musma L.A., Khasanov R.A., Kireev V.L.* Pulverulent alloplant as a new bioimmunomodulator // *Arch. Pharm.* — 1998. V. 358. №1. R. 729.
349. *Nakayama S., Kodama K., Oguchi K.* A comparative study of human placenta hydrolysate (Laennec) by intravenous or subcutaneous injection on liver regeneration after partial hepatectomy in normal and CCl₄-induced cirrhosis rats // *Nippon-Yakurigaku-Zasshi*. — 1989. Nov. Vol. 94. №5. P. 289–297.
350. *Palm D., Knuckey N.W., Primiano M.J. et al.* Cystatin C, a protease inhibitor, in degenerating rat hippocampal neurons follow transient forebrain ischemia // *brain Res.* — 1995. Vol. 691. P. 1–8.
351. *Paty B.W., Ryan E.A., Shapiro A.M.J. et al.* Intrahepatic islet transplantation in type I diabetic patients does not restore hypoglycemic hormonal counterregulation or symptom recognition after insulin independence // *Diabetes* — 2002. 51:3428–3434.
352. *Peruche B., Kriegelstein J.* Mechanisms of drug actions against neuronal damage caused by ischemia-an overview // *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psy-chiat.* — 1993. Vol. 17. P. 21–70.
353. *Podgornaya O., Voronin A., Enukaslivy N. et al.* // *Int. Rev. Cytol.* — 2000. V. 224. P. 227–296.
354. *Poltavtseva R.A., Marey M.V., Aleksandrova M.A., Revishchin A.V., Korochkin L.I., Sukhikh G.T.* Evaluation of progenitor cell cultures from human embryos for neurotransplantation. *Developmental Brain Research* — 134 (2002) 149–154.
355. *Pomfy M., Franko J., Novakova D., Marsala J., Skuba J.* Effect of stobadine on survival, histopathologic outcome and acid-base status after global brain ischemia in dogs // *J. Hirnforsch.* — 1995. Vol. 36. №3. P. 365–378.
356. *Power L., Reyes-Leal B., Conn J.* Serum insulin-like activity in genetical and experimental diabetes mellitus. / *Metabolism* — 1964. Vol. 13. №11. P. 1297–1309.
357. *Prevost P., Flori S. et al.* Application of AN 69 hydrogel to islet encapsulation. Evaluation in streptozotocin-induced diabetic rat model // *Ann. NY Acad. Sc.* — 1997. Vol. 831. Issue1. P. 344–349.
358. *Ramia V.K., Maraist M. et al.* Reversal of insulindependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells // *Nat. Med.* — 2000. №6. P. 278–282.

359. *Richmond T.S.* Cerebral resuscitation after global brain ischemia: linking research to practice // AACN Clin. Issues. — 1997. Vol. 8. №2. P. 171–181.
360. *Robertson R.P., Kendall D., Teuscher A., Sutherland D.E.R.* Long-Term Metabolic Control with Pancreatic Transplantation // Transplantation Proceedings — 1994. 26(2). P. 386–387.
361. *Saez J.C., Bennett M.L., Spray D.C.* Carbon tetrachloride at hepatotoxic levels blocks reversibly gap junctions between rat hepatocytes. // Science — 1987. May. Vol. 236. №22. P. 967–969.
362. *Shapiro A.V., Hao E., Lakey J.R. et al.* Development of diagnostic markers for islet allograft rejection // Transpl. Proc. — 1998. №30. P. 647.
363. *Shapiro A.M., Lakey J.R., Rajotte R.V. et al.* Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen // N. Engl. J. Med. — 2000. 343, 230–238.
364. *Shapiro J.* Eighty years after insulin: parallels with modern islets transplantation? // Can. Med. Assoc. J — 2002. Vol. 167. №12. P. 1398–1400.
365. *Shapiro J., Jordan M.L. et al.* A prospective randomized trial of FK 506 / prednisolone vs 506 / azathioprine / prednisolone in renal transplant patients // Transp. Proc. — 1995. №27. P. 814–817.
366. *Shehegel'skaia E.A. et al.* Pluripotency of bone marrow stromal cells and perspectives of their use in cell therapy // Ontogenez. — 2003. V. 34. P. 228–235.
367. *Shin S.M., Razadan B., Mishra O.P. et al.* Protective effect of α -tocopherol on brain cell membrane function during cerebral cortical hypoxia in newborn piglets // Brain Res. — 1994. Vol. 653. P. 45–50.
368. *Siebers U., Zekorn T., Bretzel R.G. et al.* Histocompatibility of semipermeable membranes for implantable diffusin devices (bioartificial pancreas) // Transpl. Proc. — 1990. №22. P. 834–835.
369. *Sikov W.M., Schiffman F.J., Weaver M. et al.* Splenosis presenting as occult gastrointestinal bleeding. // Am J Hematol. — 2000. Sep; 65 (1):56–61. PMID: 10936865.
370. *Soon S.P., Heintz R.E. et al.* Insulin independence in type I diabetic patient after encapsulated islet transplantation // Lancet — 1994. №343. P. 950–951.
371. *Spector D.H., Boss B.D., Strecker R.E.* A model three-dimensional culture system for mammalian dopaminergic precursor cell: application for functional intracerebral transplantation // Exp. Neurol. — 1993. Vol. 124. P. 253–264.
372. *Stevens R.B., Lokeh A. et al.* Role of nitric oxide in the pathogenesis of early pancreatic islet dysfunction during rat and human intraportal islet transplantation // Trans. Proc. — 1994. №26. P. 692.
373. *Stevens R.B., Matsumoto S., Marsh C.L.* Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future // Clinical Diabetes — 2001. №19. P. 51–60.
374. *Sykorova J., Valoushkova V.* Cytoarchitecture and cytogenesis of the embryonic neocortical grafts transplanted into the young rat brain // В кн.: «Трансплантация ткани мозга млекопитающих»: Матер. всесоюз. симп. — Пушкино. 1988. P. 60.

375. *Takenaka Y., Miki M., Yasuda H., Mino M.* The effect of α -tocopherol an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1991. Vol. 285. P. 344–350.
376. *Todo S., Fung J.J. et al.* Liver, kidney and thoracic organ transplantation under FK506 // *Ann. Surg.* — 1990. №212. P. 295–305.
377. *Vento J.A., Peng F., Spencer R.P., Ramsey W.H.* Massive and widely distributed splenosis. // *Clin Nucl Med.* — 1999. Nov; 24 (11):845–6. PMID: 10551463.
378. *Volk A., Michalopoulos G., Weidner M., Gebhardt R.* Different proliferative responses of periportal and pericentral rat hepatocytes to hepatocyte growth factor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1995. Feb. Vol. 207. №2. P. 578–584.
379. *Wong R.Y.L. et al.* Synthesis and release of human (pro)insulin in human BM progenitor cells // *Cytotherapy.* — 2003. V. 3. P. 273–275.
380. *Yokota M., Tani E., Tsubuki S. et al.* Calpain inhibitor entrapped in liposome rescues ischemic neuronal damage // *Brain Res.* — 1999. Vol. 819. №1–2. P. 8–14.
381. *Zerlin M., Goldman J.E.* Interaction between glial progenitors and blood vessels during early postnatal corticogenesis: blood vessel contact represents an early stage of astrocyte differentiation // *J. Neurol.* — 1997. Vol. 387. P. 537–546.