

УДК 616.419-089.843):615.276.015.4:612.017.1

ВНУТРИКОСТНАЯ СИНГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА
С ДЕПОНИРОВАНИЕМ ИММУНОДЕПРЕССАНТА В ОБЛАСТИ ПЕРЕСАДКИ
С.В.Панько, Ю.Г.Антипов, Г.Я.Хулуп, А.В.Санин, А.М.Демецкий,
С.Н.Рябов, А.С.Панфилов, Ю.Н.Семенидо, Э.И.Ржеусский

Проблема трансплантации костного мозга является одной из

актуальнейших тем современной биологии и медицины. Существующие методы консервации костного мозга, обработки донорских и аутогенных трансплантатов, а также методы самой трансплантации (внутривенное, внутрикостное переливание и др.) не отвечают задачам современной гематологии и трансплантологии. Имеющиеся методы подготовки реципиента к трансплантации костного мозга сопряжены с применением высоких доз цитостатических препаратов и лучевой терапии, что отрицательно сказывается на функциях важнейших систем организма. Не дает ответа современная трансплантология и на вопрос эффективного лечения, предупреждения вторичной болезни, так как и в этом случае приходится применять большие дозы иммунодепрессантов.

Учитывая работы ведущих отечественных (А.Я.Фриденштейн, Е.А.Лурья, 1980; В.А.Козлов с соавт., 1982; И.Л.Чертков, О.А.Гуревич, 1984) и зарубежных (J.Trentin, 1976; N.Wolf, 1982) ученых в области трансплантации костного мозга о важности и необходимости микроокружения для нормального функционирования клеток-предшественников костного мозга, мы поставили перед собой цель разработать такой метод трансплантации, при котором клетки сингенного костного мозга помещались бы в адекватное донорскому микроокружение, т.е. в кость сингенного реципиента.

Вторая задача заключалась в разрешении вопроса возможности создания депо иммунодепрессанта в месте трансплантации с помощью магнитных носителей и внешнего постоянного магнитного поля (ПМП), а также изучить действие препарата на трансплантат.

Методика

Эксперименты были выполнены на ПГО линейных мышах, гибридах первого поколения F_1 (СВА x В1С₅₇).

Композиционная ферромагнитная жидкость (КФМЖ) изготавлива-

лась на основе феррофазы, размер частиц которой составлял 200-300 Å, намагниченность насыщения - 14 кА/ч. КФМЖ получали по технологии, предложенной Zilbermann в 1983 году. Процент включения циклофосфана в КФМЖ определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны = 210 нм. Индукция магнитного поля, необходимая для удержания частиц магнитной жидкости в кости животных, рассчитывалась с помощью формулы, предложенной Davisoll, Morris в 1984 году.

$$V_{\text{ж}} = 330 \cdot \left(\frac{\eta}{\mu_0} \right) \cdot d \cdot \left(\frac{d}{R} \right) \cdot \varphi$$

где φ - скорость потока; η - вязкость среды; R - радиус стенки сосуда; d - диаметр магниточувствительных частиц.

Учитывая, что жидкость вводилась каплей, индукция постоянного магнитного поля, необходимая для удержания КФМЖ в кости составила 500 мТл.

Изучение влияния КФМЖ, содержащей иммунодепрессант, на клетки-предшественники костного мозга производилась с помощью метода селезеночных колоний, разработанного Till, Mc Cluskey в 1961 году. Поскольку трансплантация сингенного костного мозга производилась, в отличие от классического метода, не внутривенно, а внутрикостно с последующим введением КФМЖ в место пересадки, то в первой серии опытов был осуществлен подбор количества клеток костного мозга, необходимого для выживания реципиента и удобного подсчета числа селезеночных колоний. Радиационные химеры получали путем гамма-облучения мышей в дозе 830 рад. Клетки костного мозга забирались у доноров из трубчатых костей, суспензировались в среде RPMI-16-40 и вводились внутрикостно в бедренную кость реципиента с помощью микроприцы фирмы "Lipshutz" в объеме 0,01 мл, после определения жизнеспособности клеток методом их окраски раствором трипанового

голубого о возином (гибель клеток составляла не более 3%). Удержание КФМЖ в кости производилось с помощью кольцевых самарий-кобальтовых магнитов с индукцией ПМП 0,6 Тл.

В первой серии опытов было выделено 3 группы отличающихся по количеству трансплантируемых клеток костного мозга: I группа - 2×10^6 клеток, II группа - 5×10^6 и III группа - 9×10^6 . Предварительные опыты показали, что наиболее оптимальным количеством донорских клеток для сингенной трансплантации является 2×10^6 .

Во второй серии опытов было выделено 7 групп, которые представлены на рис. I, в каждой группе этой серии, $n = 12$.

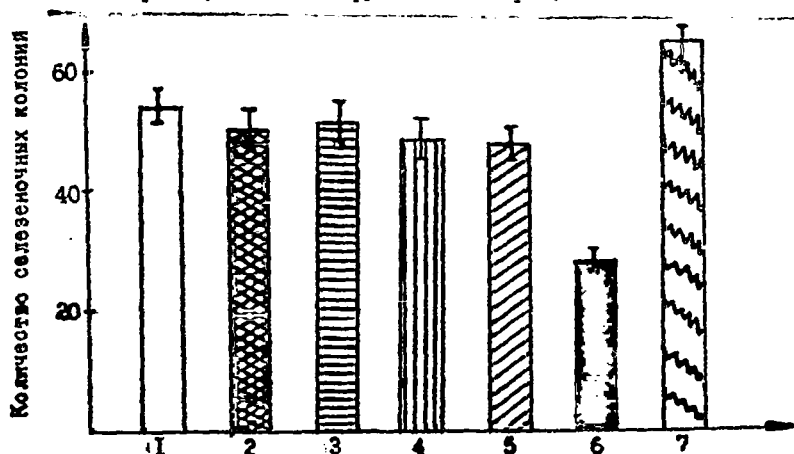


Рис. I. Влияние КФМЖ на трансплантат костного мозга:

I - внутрикостная трансплантация (ТР); 2 - ТР с последующим воздействием ПМП; 3 - ТР с введением КФМЖ в место трансплантации; 4 - ТР с КФМЖ и ПМП; 5 - ТР с введением КФМЖ, содержащей циклофосфан; 6 - ТР с введением КФМЖ, содержащей циклофосфан и воздействием ПМП; 7 - ТР с введением циклофосфана и ПМП.

Трансплантация костного мозга в этой серии опытов производилась также, как и в предыдущей, введением КФМЖ и циклофосфана в 3,4,5,6,7 группах осуществлялось в количестве, необходимом для создания терапевтической концентрации иммунодепрессанта (10 мг/кг) в пересчете на бедренную кость мыши, предполагая, что не менее 80% КФМЖ удерживается в помощи ПМП в костномозговом канале. В послеоперационном периоде животные с целью профилактики инфекционных осложнений получали внутримышечно мономицин и аскорбиновую кислоту с пищей. Через 8 сут изъятую у реципиентов селезенку фиксировали в жидкости Боуена и производили подсчет числа селезеночных колоний.

Из представленной диаграммы видно (рис. I), что в опытной 6 группе наблюдалось достоверное снижение числа колоний клеток-предшественников донора в селезенках реципиентов по сравнению с контрольными группами. Отсутствие цитостатического эффекта КФМЖ, содержащей циклофосфан в 5 группе, где не применялось воздействие ПМП, объясняется, вероятно, тем, что КФМЖ довольно быстро с током крови попадала в общий кровоток из кости и клетки трансплантированного костного мозга не успевали провагимодействовать с ней. При воздействии же внешнего ПМП создавалось депо КФМЖ в месте трансплантации, которое сохранялось достаточно долго для того, чтобы ферромагнитная жидкость, содержащая циклофосфан, связалась с частью клеток трансплантированного костного мозга, за счет чего в дальнейшем произошла их гибель и проявился цитостатический эффект препарата.

Выводы

I. Синтезированная ЛФЖ, содержащая циклофосфан, может удерживаться в месте трансплантации костного мозга с помощью внешнего ПМП индукцией 0,6 Гл и проявлять при этом свой цито-

статический эффект на клетки-предшественники костного мозга.

2. Разработанный метод внутрикостной пересадки, при условии дозированного выхода иммунодепрессанта из КЭМК, может быть в перспективе использован в эксперименте и клинике для предупреждения вторичной болезни.

Литература

1. Козлов В.А., Журавкин И.Н., Цырлова И.Г. Стволовая кроветворная клетка и иммунный ответ. - Новосибирск: Наука. - 1982. - 256 с.

2. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. - М.: Медицина. - 1980. - 220 с.

3. Чертков И.А., Гуревич О.А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. - М.: Медицина. - 1984. - 105 с.

4. Daiscol Ch.F., Morris R.M. // Microvascular Research. - 1984. - V.21. - P.353-369.

5. Till J.J., McCulloch A. // Rad.Res. - 1961. - V.14. - P.213-222.

6. Trentin J.J. Hemopoietic inductive microenvironment // Stem cells of renewing cell populations. - N.Y. - 1976. - P.255-264.

7. Wolf N.S. // Exp.Hematol. - 1982. - V.10. - P.98-107.

8. Zimmermann U. Cellular Drag-Carrier system and their possible targeting // Targeting drugs. - N.-Y. - 1983. - P.201-230.