

На правах рукописи

Абдулатипова Заира Магомедовна

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЗАЖИВЛЕНИЕ
ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ РАНЫ ЖЕЛУДКА**

(экспериментальное исследование)

14.03.03 - патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва
2016

Работа выполнена на кафедре общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
кафедры общей патологии и
патологической физиологии
имени В.А. Фролова РУДН

Дроздова Галина Александровна

Официальные оппоненты:

Пирожков Сергей Викторович

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии
лечебного факультета ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Восканян Сергей Эдуардович - доктор медицинских наук, заместитель главного
врача по хирургической помощи, руководитель центра хирургии и
трансплантологии ФГБУ "Государственный научный центр Российской
Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И.
Бурназяна» ФМБА

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Российский национальный исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2016 года в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 212.203.06 при Российском университете дружбы
народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ
ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул.
Миклухо-Маклая, д. 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.203.06
доктор биологических наук, доцент

М.М. Азова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Послеоперационные раны – асептическое механическое нарушение целостности тканей. Ушитые операционные раны желудка в связи с развитием хирургии и её новых технологии часто встречаются в хирургической практике, например, после гастропластик, резекций при осложнённой язвенной болезни, сосудистых мальформациях, бариатрической патологии, операциях на пищеводно-желудочном переходе и других заболеваниях.

Осложнения при заживлении послеоперационных ран развиваются в среднем у 18-22% больных, что определяет большое социально-экономическое значение проблемы [Восканян С.Э., 2010; Гостищев В.К., 2011]. Одним из наиболее частых осложнений, значительно отягощающих послеоперационный период, негативно отражающийся на психике больных и требующий проведения дополнительных лечебных мероприятий, является анастомозит. Нередко анастомозит становится причиной развития такого тяжелого осложнения, как нарушение эвакуаторной функции оперированного желудка, которое может привести к летальному исходу [Данилова Г.Ц., 2010; Voskanyan S.E., 2012; ZhangF., 2001].

Желудочно-кишечные анастомозы осложняются несостоятельностью швов у 0,4-0,5% пациентов. После ушивания перфоративных язв желудка и двенадцатиперстной кишки процент несостоятельности швов составляет 0,5-2%. После ушитых травматических повреждений желудка несостоятельность швов наблюдается в 10-11%, развивается ввиду их инфицированности и зависит от объёма и характера повреждения при ранении. Наименее изученными являются причины связанные с регенеративными свойствами тканей и характером их патологического состояния, а также наличием активного воспаления, которое возникает в месте повреждения [Гостищев В.К., 2011; Кайгородова Е.В., 2012; Князев О.В., 2015].

В последние годы во всем мире стали активно изучать и применять клеточные технологии для индукции восстановительных процессов органов

пищеварения, в частности, желудка. Применение новых технологий может стать наиболее эффективным методом лечения [Абдулатипова З.М., 2014; Артамонов С.Д., 2012; Аскарлов М.Б., 2009; Борзенков С.А., 2012; Готье С.В., 2010; Князев О.В., 2015; Månsson-Broberg A., 2016].

Степень разработанности темы.

Все существующие исследования несостоятельности швов анастомоза имеют описательный характер, которые получены при гастроскопии или при исследовании секционного материала. Наличие послеоперационных осложнений специалисты связывают с общими факторами (пожилой возраст, эндотоксикоз, анемия, гипо- и диспротеинемия, гиповитаминоз, сахарный диабет) и техническими трудностями во время проведения операции, такими, как натяжение тканей, сшивание патологически измененных тканей и т.д. В основном изучали кожные раны, их заживление и осложнения. Желудочные и/или кишечные анастомозы практически оставались без внимания. Отсутствуют данные о состоянии слизистой оболочки в зоне шва после резекции желудка или кишки. Отсутствует понимание о нарушении тканевого гомеостаза БАВ, который обеспечивает устойчивость ткани к повреждениям и приводит к недостаточности адаптационных механизмов. Данный вопрос исследован недостаточно и в основном все работы касаются изучения состояния ткани в отдалении от послеоперационного шва желудка. Для выявления нарушений, которые имеются в окружающей послеоперационную рану ткани, необходимо проведение экспериментальных и биохимических исследований с целью изучения содержания и соотношения баланса или дисбаланса БАВ. Экспериментальные исследования позволяют объективно оценивать выраженность нарушения тканевого гомеостаза после хирургического вмешательства и получить количественные данные изучения БАВ в динамике процесса, а также оценить выраженность нарушений. На основании вышеуказанного, можно вычислить силу и направленность связи между патофизиологическими процессами. Таких исследований при изучении процесса заживления операционной раны желудка в доступной нам литературе не обнаружено.

Цель исследования.

Изучить эффективность и безопасность трансплантации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга для заживления послеоперационной раны железистой части желудка у крыс.

Задачи исследования:

1. Предложить модель операционной раны желудка у животных, которая имеет структурно-функциональные нарушения, схожие с изменениями, наблюдаемыми у пациентов после операции на полых органах ЖКТ.
2. Определить активность протеолитических ферментов (пепсиногенов) и ингибиторную способность ткани в разные периоды заживления раны и их участие в механизме повреждения слизистой оболочки желудка.
3. Определить роль серотонина в процессе заживления послеоперационной раны и поддержания воспаления в околораневой области.
4. Определить содержание про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови при операционной ране желудка в зависимости от фазы саногенеза.
5. Установить безопасность введения аллогенных МСК КМ экспериментальным животным.
6. Оценить функциональный потенциал аллогенных МСК КМ, влияющий на качество заживления послеоперационного шва стенки желудка у крыс.

Научная новизна.

Впервые в эксперименте проведено изучение послеоперационного шва, начиная с первого часа повреждения. Представлена характеристика функциональных и морфологических изменений: кровотока, содержания биологически активных веществ, уровня протеолитической активности при кислых значениях рН желудка.

Впервые в условиях эксперимента установлено, что при операционной ране желудка значительно повышается содержание серотонина в крае операционной раны. Изменение концентрации серотонина в первые часы оперативного

вмешательства имеет четко выраженную временную последовательность и взаимосвязано с нарушением кровотока.

Проведено подробное исследование концентрации цитокинов в сыворотке крови в зависимости от фазы заживления операционной раны, что позволило оценить их информативность в динамике патологического процесса и прогнозировать осложнения процесса заживления.

Впервые установлено, что аллогенные МСК костного мозга от здорового донора, при трансплантации животным в послеоперационном периоде, управляют процессами регенерации в повреждения стенки желудка. Двукратная трансплантация аллогенных МСК КМ на 3-и и 8-е сутки эффективна для качественного заживления операционного шва после резекции 2/3 желудка.

Теоретическая и практическая значимость.

Разработана экспериментальная модель оперативного вмешательства на желудке, воспроизводящая сходные морфофункциональные нарушения с операционными ранами у человека. Применение данной модели позволило изучить механизмы патогенеза и саногенеза операционной раны.

В условиях эксперимента проведено сопоставление морфологических и функциональных нарушений в желудке после операции. Установлено, что содержание биологически активных веществ в ткани и в сыворотке крови определяется фазой патологического процесса, отражая динамику пато - и саногенеза.

Определена роль биологически активных веществ в патогенезе осложнений после резекции 2/3 желудка, показано их участие в развитии повреждения и формировании регенераторно-восстановительных процессов при экспериментальной операционной ране желудка у крыс.

Предложено использование экспериментальной модели для изучения действия новых лекарственных препаратов на развитие, течение и заживление операционной раны.

Методология и методы диссертационного исследования.

Проведены экспериментальные исследования, которые позволяют установить причину повреждений в околораневой зоне в ходе динамического наблюдения за процессом заживления операционной раны желудка. В рамках экспериментального наблюдения вводили раствор аллогенных стволовых клеток для выявления их действия на процесс заживления и установления оптимальных доз введения. В исследовании были использованы общедоступные методы, адекватно отображающие фазы пато - и саногенеза. Определяли уровень содержания медиаторов воспаления (5-НТ и провоспалительных цитокинов) и маркеров заживления раны желудка (противовоспалительных цитокинов). Полученные цифровые данные были проанализированы и обработаны с помощью статистических расчетов.

Внедрение результатов исследования.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова Медицинского института РУДН.

Положения, выносимые на защиту:

1. Создана верифицированная модель операционной раны желудка, позволяющая оценить морфологические и функциональные нарушения в зависимости от сроков заживления.
2. Определены новые характеристики состояния ткани в зоне операционной раны желудка (изменение содержания серотонина в крае операционной раны в сочетании с нарушением кровотока и повышением содержания провоспалительных цитокинов).
3. В эксперименте у животных каждый период заживления операционной раны характеризуется определенным изменением содержания и соотношения биологически активных веществ. При операционной ране желудка в эксперименте выявлено изменение содержания и соотношения биологически активных веществ, которые могут выполнять агрессивные или защитные

функции в зависимости от фазы патологического процесса и проводимой терапии.

4. На основании полученных в эксперименте данных об изменениях концентрации и соотношений биологически активных веществ в экстрактах слизистой оболочки желудка и в сыворотке крови определены прогностические критерии течения послеоперационных ран желудка.

5. Трансплантация аллогенных МСК КМ предупреждает развитие поздних осложнений операционных ран желудка, являясь при этом безопасным методом лечения.

Степень достоверности.

Определение серотонина, цитокинов и уровень протеолитической активности проводили на сертифицированных для данного вида работ приборах, прошедших заводскую поверку и стандартизацию. Данное исследование выполнено при достаточном объеме выборки. В работе использовались методы статистической обработки, соответствующие поставленным задачам. Полученные выводы основаны только на статистически достоверных расчетах.

Апробация результатов работы.

Материалы диссертации были представлены на конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2014 г.), на конференции «Инновационные технологии» в Сколково (Московская область, 2014 г.), на «Гастросессии» (г. Москва, 2015 г.), на заседании кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова (г. Москва, 2016).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них 5 – статьи в журналах, входящих в перечень, утвержденный ВАК РФ.

Структура и объем диссертации.

Выполненная работа изложена на 114 страницах текста, набранного на компьютере. Работа построена традиционно: всего 6 глав, куда входит введение, литературный обзор, материалы и методы исследования, собственные результаты, заключение, практические рекомендации, библиография включает

201 работу, из них 62 работы на английском языке, 139 работ на русском языке. Иллюстрации – 8 таблиц, 38 рисунков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на модели послеоперационной раны желудка. Моделирование проводили на белых крысах обоего пола, содержащихся в виварии на смешанном рационе питания со свободным доступом к воде.

Все животные были распределены на серии (таб. 1). Первая серия включала крыс после операций на желудке, состояла из трех групп: животные без введения МСК, после введения физиологического раствора, после однократного и двукратного введения МСК. Вторая серия включала крыс без операции (интактных животных), группы животных соответствовали первой серии.

Таблица 1

Распределение животных по группам.

Первая серия крыс (n=20)			Вторая серия крыс(n=20)				
Крысы после операции на желудке			Крысы без операции (интактные)				
Группы							
1	2	3	1	2	3		
Без введения МСК (n=5)	После введения МСК (n=10)	После введения физиологического раствора (n=5)	Без введения МСК (n=5)	После введения МСК (n=5)	После введения физиологического раствора (n=5)		
	подгруппы			подгруппы			
	1			2		1	2
	однократно			двукратно		однократно	двукратно

На рисунке 1 схематично представлены отделы желудка у крыс и линия, по которой проводилась резекция желудка.

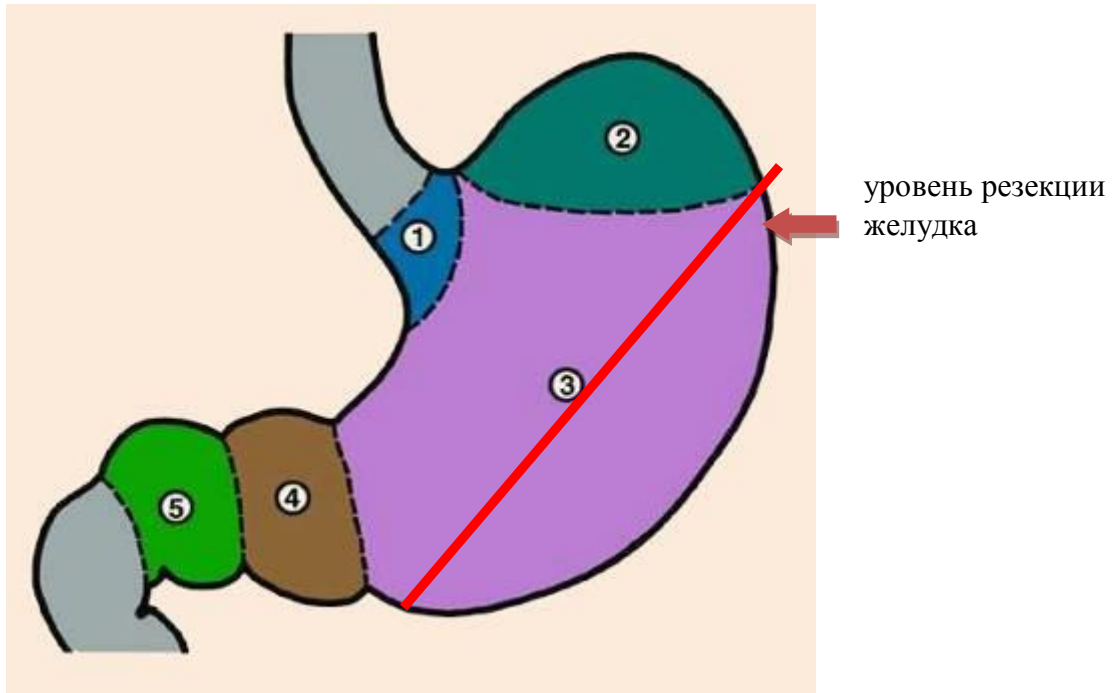


Рис. 1. Желудок, схема отделов и линия резекции.
1 - кардиальная часть. 2 - преджелудок. 3 - тело. 4 - привратниковая пещера.
5 - привратниковая пилорическая часть.

Оперативное вмешательство проводилось под эфирным наркозом в интервале между 9-ю и 12-ю часами дня. За 18 часов до операции у крыс убирали корм, оставляя свободный доступ к воде. У наркотизированных животных по срединной линии послойно вскрывалась передняя брюшная стенка. Сначала желудок с использованием лигатур фиксировался на «держалки». По большой кривизне в железистой зоне тела желудка производилась продольная резекция 2/3 желудка (рис. 1). Культи желудка ушивалась двурядным швом: первый серозно-мышечный, второй – серо-серозный нитью викрил 6-0. Желудок погружался в брюшную полость. Проводилась проверка на гемостаз. Передняя брюшная стенка ушивалась непрерывным швом нитью капрон 2-0. Кожа обрабатывалась спиртовым раствором.

Аллогенные МСК КМ и физиологический раствор вводили внутривентриально. Мононуклеарную фракцию клеток получали из аспирата костного мозга крыс. Для эксперимента использовали клетки 8 и 9-го пассажа

(клеточный материал, пригодный для трансплантации, с сохраненной популяционной активностью и отсутствием погибших клеток).

Клеточную трансплантацию МСК производили на 3-и сутки после операции однократно в дозе $3,5 \times 10^6$, а также клетки вводили крысам дважды, первое введение в дозе $3,5 \times 10^6$ клеток на 3-и сутки после операции, второе введение в той же дозе на 8-е сутки. Физиологический раствор вводили в равных объемах с МСК (0,5 мл).

Аутопсию производили на 10-е сутки после операции. При вскрытии вели протокол выявленных изменений по общепринятой методике. В работе применены биохимический и иммуноферментный методы анализа, макро- и микроскопия. Методы исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Методы исследования биологического материала

Методы исследования	Методика проведения исследования	Количество проведенных исследований на 20 животных
1. Гистологическая оценка желудка	Окраска гематоксилином и эозином	20
2. Исследование цитокинового статуса и аАТ Н+/К+ -АТФазе париетальных клеток в сыворотке крови	ИФА с использованием тест-системы для определения	$20 \times 7 = 140$
3. Определение серотонина в экстракте слизистой желудка	По методу Прошиной Л.	20
4. Определение протеолитической активности при кислых значениях pH	По методу Anson M., Mirsky A.	20
5. Определение ингибиторной способности экстрактов слизистой желудка	По методу Anson M., Mirsky A.	20
6. Биомикроскопия. Исследование микроциркуляторного русла слизистого и подслизистого слоя желудка	Лупа Nikon SWZ 800	5

Определение серотонина проводили флуориметрическим методом модифицированным Прошиной Л.Я. (1981). Экстракция серотонина осуществлялась путем гомогенизации ткани в 4,5 мл бутанола подкисленного

слабым раствором соляной кислоты. Далее бутаноловый экстракт обрабатывали для определения в нем серотонина. Все реактивы были приготовлены на трижды перегнанной воде. Приготовление реактивов было проведено по описанию, данному в диссертационной работе Трубицыной И.Е. (2004).

Протеолитическую активность определяли в день взятия проб. Активность экстрактов гомогената слизистой желудка определяли по методу Anson M., Mirsky A. (1932), в качестве субстрата использовали кристаллический гемоглобин бычий окисленный лиофилизированный (производитель *Sigma*).

Протеолитическую активность определяли при значении pH желудка от 2,0 и pH=4,5-6,5. Для этого слизистую желудка промывали в холодном физиологическом растворе, тщательно промокали фильтровальной бумагой, иссекали кусочек слизистой оболочки желудка, взвешивали 100 мг ткани и гомогенизировали.

Определение ингибиторной способности экстрактов слизистой оболочки желудка было проведено по описанию, данному в диссертационной работе Трубицыной И.Е. (2004). Ингибиторную способность измеряли по остаточной протеолитической активности пепсина. В качестве субстрата был использован бычий гемоглобин.

Для проведения биомикроскопии под эфирным наркозом прижизненно проводилась лапаротомия, у крыс извлекали желудок, стараясь не пересекать сосуды иссекали серозную оболочку, помещали под объектив в лупе Nikon SWZ 800.

Для проведения морфологического исследования стенку желудка оперированных и интактных животных после аутопсии фиксировали в 10% забуференном формалине. Биоптат с места оперативного вмешательства заливался в целлоидин-парафин (в один блок). Серии срезов окрашивались гематоксилином и эозином.

Для оценки цитокинового статуса изучали содержание провоспалительных (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) и противовоспалительного (IL-4) цитокинов в сыворотке крови животных методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием

тест-систем «Протеиновый контур» (С-Петербург), «Вектор-Бест» (Новосибирск) на анализаторе ChemWell® («AwarenessTechnology», США).

Статистическую обработку результатов производили на персональном компьютере с использованием специального статистического пакета Biostat; и с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа – теста Краскела-Уоллиса в программной среде для статистических вычислений R (пакет stats).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что с первых суток после операции на желудке развивается воспалительная реакция, выражающаяся в нарушении кровотока, образовании отека в области анастомозируемых тканей, в результате чего резко нарушается перистальтика культи желудка, происходит задержка эвакуации, наблюдается застой желудочного содержимого. После операции создается ситуация, когда снижены протективные свойства слизистой оболочки и повышены агрессивные свойства желудочного содержимого. Одновременно в толще ткани в зоне воспаления (ткань с отеком) снижается значение рН до 3,5-4,5, появляются активные протеолитические ферменты, отсутствующие в норме (рис. 2).

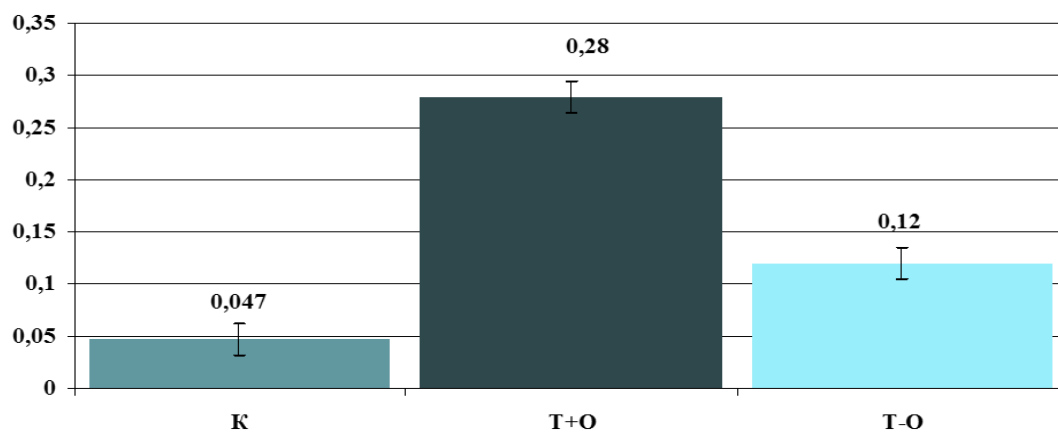


Рис. 2. Уровень протеолитической активности при рН- 3,5-4,5 внутри ткани и отечной жидкости. К – контроль, Т+О – ткань с отеком, Т-О – ткань без отека.

Таким образом, в слизистой оболочке желудка помимо повреждающих факторов, которые присущи любому процессу воспаления, присутствует важный агрессивный фактор - это внутритканевая активация синтезируемого главными

клетками слизистой оболочки желудка суперактивного протеолитического фермента пепсиногена, активированного лизосомальными ферментами.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при раневом дефекте наблюдается выход активных ферментов в межклеточное пространство, одновременно снижается ингибиторная способность ткани.

В ходе экспериментальных исследований было показано, что первыми возникают изменения в главных клетках. Они быстро лишаются зимогенных гранул (пепсиногена), затем некротизируются. В слизистой оболочке желудка на границе с некрозом главные клетки лишены гранул. Можно предполагать, что происходит выброс пепсиногена в межклеточное пространство. Вслед за этим наступает некроз базальных отделов слизистой оболочки. Вероятнее всего, это связано с превращением пепсиногена в пепсин лизосомными ферментами и сразу же после выброса ферментов из клетки происходит переваривание ткани.

Благодаря экспериментальным исследованиям мы смогли проследить этот процесс с первого часа повреждения. Кроме повреждающего действия протеолитических ферментов, через 24 часа в зоне повреждения появляется большое число тучных клеток и резко выраженный отек стенки желудка. В мышечном слое стенки определяется крупноочаговая полиморфноклеточная выраженная инфильтрация.

Динамическое наблюдение содержания серотонина в экстрактах слизистой оболочки желудка при экспериментальной операционной ране показало существенное повышение его, начиная с первых суток после операции, и выявило определенную закономерность в развитии патологических процессов.

Повышение содержания 5-НТ в экстрактах слизистой оболочки желудка в первый час после оперативного вмешательства достигает $3,9 \pm 0,4$ мкг/г ткани, в контроле $1,4 \pm 0,2$ мкг/г ткани ($p < 0,001$). В период рубцевания раны (10 суток, 120 ч) в окружающей ткани увеличено число тучных клеток, благодаря этому сохраняется высокая концентрация серотонина до $4,1 \pm 0,5$ мкг/г ткани ($p < 0,001$), (рис. 3). В поздний период при внешнем осмотре отек ткани отсутствует, но сохраняется кровоточивость зоны оперативного вмешательства. Каждая фаза

воспалительной реакции отличается от значений в контроле. Имеются различия между группами - это указывает, что 5-НТ в острый период деструкции выполняет роль медиатора воспаления, в более поздние сроки 5-НТ участвует в процессах регенерации, как тканевой гормон.

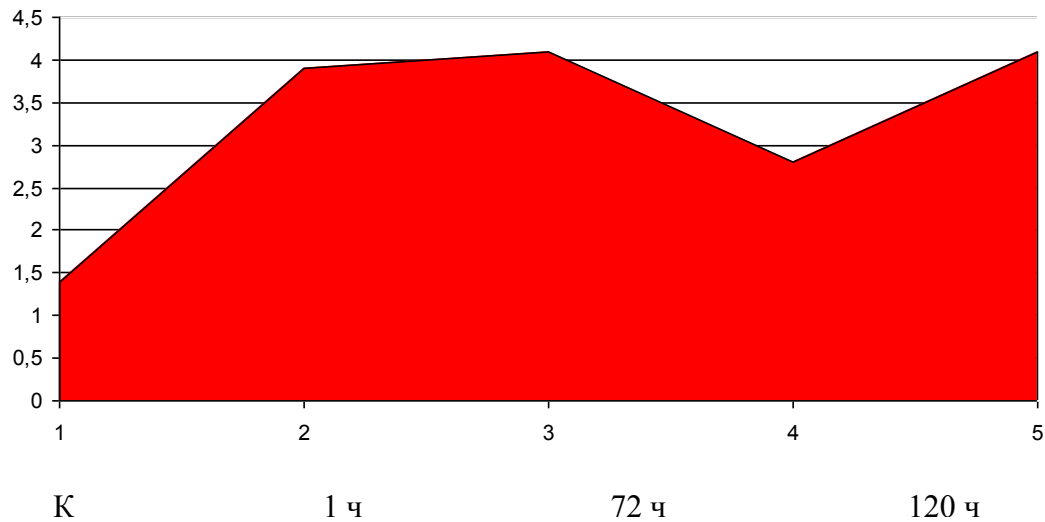


Рис. 3. График динамики изменений концентрации серотонина в экстрактах слизистой оболочки желудка в зоне рубца мкг/г ткани от 1ч до 240 ч (10 суток).

Таким образом, в период деструктивных изменений повышается содержание серотонина на 279%. В период регенерации операционной раны сохраняется высокое содержание серотонина (221%).

Анализ полученных данных позволил предположить, что повышение серотонина в ткани является пусковым сигналом для иммунного ответа, который зависит от уровня концентрации серотонина в месте повреждения. Серотонин, обладая высокой системной биологической активностью, циркулирует в крови короткое время из-за наличия «ферментного барьера», осуществляемого моноаминоксидазой. Кроме того, существует система «кровь \leftrightarrow ткань», обеспечивающая барьерные функции слизистой оболочки желудка. Особое место занимают Т-клетки, которые за счет медиаторов воспаления координируют иммунную реакцию.

Расстройство метаболического равновесия в тканях проявляется в начальном периоде воспалительного процесса и обусловлено физическими и химическими свойствами фактора, вызвавшего воспаление (механическое

повреждение всех слоев стенки желудка). Эти первоначальные изменения можно определить как первичную воспалительную реакцию. Вторичная воспалительная реакция проявляется изменениями следующих систем: сосудистой, нервной, иммунной и соединительной ткани. Вторичная реакция начинается воспалительной гиперемией, образованием экссудата и накоплением в измененных тканях многоядерных лейкоцитов и других фагоцитирующих клеток, формируется воспалительная инфильтрация ткани. Ключевая роль в реализации реакций первой линии защиты, в том числе и воспаления, принадлежит иммунной системе. В межклеточное пространство поступают про- и противовоспалительные цитокины, выделяемые активированными лимфоцитами, моноцитами, макрофагами.

Мы установили, что через 24 часа после ушивания операционной раны в сыворотке крови крыс резко повысилось содержание провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) при низком содержании противовоспалительного интерлейкина (IL-4). Указанные сдвиги в группе оперированных животных (с введением физиологического раствора) продолжали сохраняться как в период воспаления, так и в период регенерации. У животных после операции и введения аллогенных МСК в сыворотке крови достоверно снижалось содержание TNF- α , IL-1 β и IFN- γ , а IL-4 повышался.

Положительную динамику регенераторных процессов в зоне операционной раны под влиянием МСК мы связываем с позитивным иммунорегуляторным действием аллогенных МСК, которое мы отметили в ходе динамического наблюдения.

Полученные данные свидетельствуют о наступающем снижении системной воспалительной реакции в организме под влиянием аллогенных МСК КМ, создавая благоприятные условия для восстановления баланса про- и противовоспалительных цитокинов (рис.4) и активизации морфогенетической функции иммунцитов. Отражением этих процессов является отсутствие поздних осложнений и заживление операционной раны.

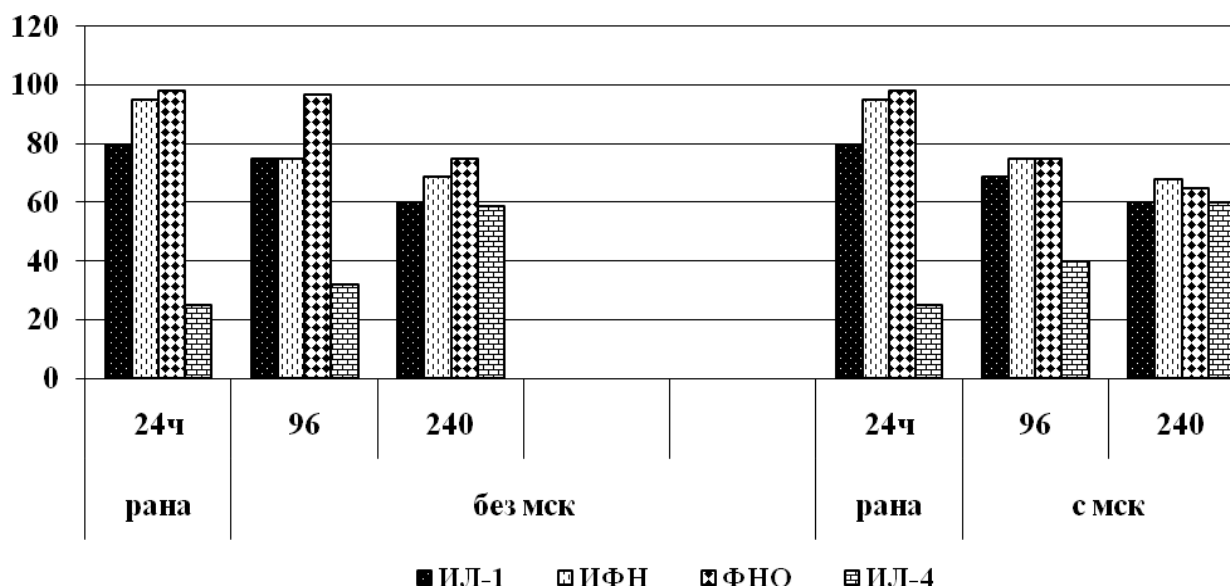


Рис.4. Концентрация цитокинов в сыворотке крови крыс после операции без введения МСК (слева) и после введения МСК (справа) через 24, 96, 240 часов.

В серии исследований, где не вводили аллогенные МСК в околорубцовой зоне отмечен отек, гиперемия, эрозии, кровоточивость при контакте со слизистой оболочкой желудка, налет фибрина на поверхности слизистой оболочки.

У животных после операции на желудке микроскопически отмечены следующие изменения: межклеточные пространства расширены, выраженный отек, встречаются выступающие набухшие клетки с бугристой поверхностью. Отсутствует слизь на поверхности клеток. У животных без оперативного вмешательства на желудке, клетки поверхностного эпителия покрыты защитной пленкой из слизевых наложений.

У группы животных после операции на желудке с введением физиологического раствора в области шва отмечено формирование грубого рубца из волокнистой соединительной ткани с макрофагальными инфильтратами и полнокровными сосудами. У животных после операции на желудке и введения МСК в области шва формируется нежный рубец из соединительной ткани.

Таким образом, при воспроизведении экспериментальной модели операционной раны желудка, в прилегающей к шву ткани отмечены

деструктивные поражения и нарушения микроциркуляции, способствующие гипоксии, белково-энергетической недостаточности и запуску каскада повреждающих патофизиологических процессов. В крае операционной раны происходит снижение резистентности слизистой оболочки желудка к повреждающим факторам, что приводит к недостаточности восстановительного потенциала в процессе заживления. Отмечена высокая степень метаболических нарушений в области анастомозируемых тканей.

Аллогенные МСК КМ, включаясь в совокупность жизненных процессов в поврежденной ткани, могут производить коррекцию иммунологических нарушений, способствуя заживлению операционной раны. Экспериментальные исследования показали безопасности целесообразность введения МСК, учитывая их иммуномодулирующее действие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют подвести следующие итоги:

1. Предложенная модель операционной раны желудка у животных имеет структурно-функциональные нарушения схожие с изменениями, наблюдаемыми у пациентов после операций на полых органах ЖКТ.
2. Повышение уровня серотонина (5-НТ) в слизистой оболочке желудка приводит к нарушению кровотока и образованию повреждений слизистой оболочки желудка в зоне послеоперационной раны у 95% животных ($p < 0.05$).
3. Высокое содержание серотонина (5-НТ) в послеоперационной ране коррелирует с повышением уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови ИЛ-1 ($r = -0.82$, $p < 0.001$), ФНО- α ($r = -0.87$, $p < 0.001$), ИФ- γ ($r = -0.88$, $p < 0.001$).
4. Повышение уровня противовоспалительных и снижение уровня провоспалительных цитокинов является прогностическим благоприятным маркером заживления послеоперационной раны желудка.
5. Трансплантация аллогенных МСК КМ безопасна, не имеет побочных эффектов в послеоперационном периоде и может быть рекомендована для клинического использования после оперативных вмешательств на органах ЖКТ.

6. Внутривнутрибрюшинное введение аллогенных МСК КМ снижает уровень провоспалительных цитокинов сыворотки крови: ИЛ-1 на 30% ($p < 0.05$), ФНО- α на 35% ($p < 0.05$), ИФ- γ на 38% ($p < 0.05$).
7. Внутривнутрибрюшинное введение аллогенных МСК КМ повышает уровень противовоспалительного цитокина сыворотки крови ИЛ-4 на 50% ($p < 0.05$).
8. Трансплантация аллогенных МСК КМ обеспечивает качественное заживление операционной раны железистой части желудка.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Трансплантация МСК может быть рекомендована для клинического использования при оперативных вмешательствах на органах ЖКТ.
2. Соотношение содержания про- и противовоспалительных цитокинов может использоваться как прогностический маркер заживления послеоперационной раны полых органов ЖКТ.
3. Полученные данные могут быть использованы в образовательных целях.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Проведение операций (в данном случае на желудке, но можно оперировать пищевод или кишечник) на мелких лабораторных животных позволяет изучать новые лекарственные средства перед рекомендацией их в клиническую практику. В частности, это в полной мере относится к трансплантации МСК КМ. Эффект от введения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток полностью не изучен. Известно, что применение МСК открывает широкий диапазон возможностей в лечении хронических, часто рецидивирующих заболеваний. Также имеет высокую актуальность создание новых экспериментальных моделей, воспроизводящих с возможной точностью заболевания ЖКТ, что позволит изучить механизмы действия вводимых МСК не только на полых, но и на паренхиматозных органах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Князев О.В., Абдулатипова З.М., Сагинбаева И.И., Костюченко Л.Н. Иммунопитание и клеточная терапия как стимуляторы регенераторных реакций в ране у хирургических больных // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.-2013. - №2. – С. 116-120.
2. Трубицына И.Е., Абдулатипова З.М., Васнев О.С., Смирнова А.В., Орлова Ю.М. Серотонин в развитии и поддержании воспалительной реакции в слизистой оболочке желудка у крыс // Фундаментальные исследования. – 2014. - №10 (часть2). – С. 380-385.
3. Абдулатипова З.М. Использование мезенхимальных стромальных клеток при операциях на желудке // Фундаментальные исследования. - 2013. - №12 (часть 3). – С. 395-399.
4. Трубицына И.Е., Абдулатипова З.М., Васнев О.С., Смирнова А.В., Ротин Д.Л., Орлова Ю.М. Операционная рана желудка и механизмы развития повреждений // Современные проблемы науки и образования. - 2014. -№ 3. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=13714>
5. Абдулатипова З.М., Трубицына И.Е., Васнев О.С., Онищенко Н.А., Люндуп А.В., Орлова Ю.М., Смирнова А.В. Трансплантация стволовых клеток при операционной ране желудка у крыс // Вестник ДГМА. - 2014. - № 4. С. 59-61.
6. Абдулатипова З.М., Трубицына И.Е., Васнев О.С., Смирнова А.В. Опыт трансплантации стволовых клеток при операционной ране желудка у крыс // Материалы всероссийской научно-практической конференции. - Махачкала, 2014. – Т.2. - С. 244-247.
7. Trubitsyna Irina, Abdulatipova Zaira, Vasnev Oleg, Smirnova Anna, Lyundup Alexey, Onishchenko Nina, Orlova Yulij, Rotin Daniil. Role of serotonin and cytokines in development and maintenance of inflammatory reactions in mucous stomach of rats // News of science and education 11. - 2014.–С. 46-53.
8. Абдулатипова З.М., Орлова Ю.М., Трубицына И.Е., Васнев О.С., Люндуп А.В., Онищенко Н.С., Смирнова А.В. Качество заживления операционной раны у

крыс и стволовые клетки // Материалы Юбилейной двадцатой объединенной Российской Гастроэнтерологической недели, Москва, 2014. – С.8.

9. Trubitsyna I., Abdulatipova Z., Vasnev O., Smirnova A., Lyundup A.V., Onishchenko N., Orlova Y., Rothin D. Regeneration of the gastric mucosa in rats //Haikou China,13- 16 November, 2014.- P. 177.

10. Orlova Yulia, Abdulatipova Zaira, Trubitsyna Irina, Vasnev Oleg, Onishchenko Nina, Lyundup Alexey, Smirnova Anna. Intraperitoneal transplantation of mesenchymal multipotential stem cells in rats after gastrotomy // Сколково, Московская область, 2014. - P. 208.

11. Trubitsyna Irina, N. Onischenko, A. Lyundup, O. Knyazev, Yu. Orlova, Z. Abdulatipova, A. Smirnova, I. Ruchkina, D. Rotin. Systemic and local immunomodulatory effects of stem cells // Regenerative Medicine & Stem Cell 2015-Korea BUSAN, 2015. - P. 24.

12. Irina Trubitsyna, N. Onischenko, A.Lyundup, O. Knyazev, Parfenov A., Vinocurova L., Yu. Orlova, Z. Abdulatipova, I. Ruchkina, A. Smirnova. Immunomodulatory Effects of Stem Cells // Международная конференция «Стволовые клетки, эксперимент-клиника», С.-Петербург, Россия. - С. 87.

13. Абдулатипова З.М., Трубицына И.Е., Князев О.В., Васнев О.С., Люндуп А.В. Экспериментальный опыт применения мезенхимальных стромальных клеток при операциях на желудке // Научная сессия ЦНИИГ. Доктор.ру. Гастроэнтерология, 2015, №2 (103). - С.2.

14. Orlova Jul., Abdulatipova Z., Trubitsyna I., Vasnev O., Lundup A. Effect of mesenchymal stem cell in traperitoneal transplantation in rats after gastrotomy. Word Conference on Regenerative Medicine 2015, Leipzig, Germany, 2015. – P. 134.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-НТ – серотонин

TNF- α (α -ФНО) - альфа фактор некроза опухоли

БАВ- биологически активные вещества

ДПК - двенадцатиперстная кишка

Ig– иммуноглобулин

IL – интерлейкин

IFN- γ – интерферон гамма

ККМ – клетки костного мозга

МСК КМ – мезенхимальные стромальные клетки костного мозга

СК - стволовые клетки

СОЖ – слизистая оболочка желудка

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

РЕЗЮМЕ

кандидатской диссертации З.М. Абдулатиповой «Влияние трансплантации стволовых клеток на заживление послеоперационной раны желудка».

В представленном диссертационном исследовании были проведены исследования, позволяющие установить причину повреждений в околораневой зоне и влияние трансплантации стволовых клеток на заживление послеоперационной раны желудка. Объектом исследования являлись белые крысы линии *Wistar*, которым производилась трансплантация аллогенных мезенхимальных стромальных клеток после операции на желудке. В работе использовались методы статистической обработки, соответствующие поставленным задачам. Полученные выводы основаны только на статистически достоверных расчетах. Было установлено, что каждый период заживления послеоперационной раны желудка характеризуется изменением содержания и соотношения биологически активных веществ (серотонин, цитокины, пепсиноген), что влияет на заживление послеоперационной раны. Выявлено, что трансплантация стволовых клеток ведет к нормализации соотношения

биологически активных веществ в сыворотки крови и в ткани, тем самым создаются наиболее приятные условия для заживления.

SUMMARY

of Z.M. Abdulatipova's PhD science work "Effect of stem cells transplantation in post-operative gastric wound treatment".

In the present work there were carried out studies, allowing to establish the cause of injuries in the para-wound area and the effect of stem cell transplantation on the treatment of post-operative gastric wound. In the research white *Wistar* rats were used, that underwent transplantation of allogeneic mesenchymal stromal cells after surgery on the stomach. We used statistical methods of analysis appropriate to the task. The results are based only on statistically valid calculations. It was found that each period of postoperative wound healing is characterized by changing the consistency and ratios of the biologically active agents (serotonin, cytokines, pepsinogen), which effects the healing of surgical wounds. It was also shown that the stem cells transplantation eads to the ratios normalization of the active substances in the blood serum and in the tissue, thus creating the most favourable conditions for healing.