

Применение клеточной терапии — путь повышения эффективности аутотрансплантации щитовидной железы

Галян А.Н.

Use of cellular therapy as a way to improve efficiency of thyroid gland autotransplantation

Galyan A.N.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Галян А.Н.

В эксперименте на 150 крысах-самцах линии Вистар после тиреоидэктомии выполнена аутотрансплантация ткани щитовидной железы в большой сальник с целью профилактики послеоперационного гипотиреоза. В течение 3 мес на основании изучения и сравнительного анализа морфологии и функционального состояния трансплантированной ткани щитовидной железы показана высокая степень восстановления гормональной тиреоидной активности и жизнеспособности трансплантата в условиях применения клеточной взвеси аутологичных полипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Ключевые слова: щитовидная железа, трансплантация, стволовые клетки, гормональная система.

In the experiment carried out on 150 Vistar line male rats after a thyroidectomy a thyroid gland tissue was autotransplanted into big omentum to prevent postoperative hypothyroidism. Three-month study and comparative analysis of morphology and functional state of the transplanted tissue showed high levels of thyroid hormone reactivation and transplant viability owing to the use of the cellular suspension of autologous pluripotent mesenchymal stromal cells.

Key words: thyroid gland, transplantation, stem cells, hormonal system.

УДК 616.441-089.843-033.3-035.1-08:615.38:611.018.5

Введение

Варианты коррекции развивающегося в послеоперационном периоде гипотиреоидного состояния, основанные на выполнении органосохраняющих операций и адекватном подборе тиреоидной заместительной терапии, могут быть дополнены методикой аутотрансплантации неповрежденной ткани щитовидной железы в большой сальник, который обладает иммунопротективными свойствами, высокой степенью васкуляризации и способностью к лимфотрофике [1–3]. Возникающий при трансплантации иммунный конфликт, сложность методов криоконсервации тканей определяют актуальность аутотрансплантации [1, 3], а полученные в последнее время данные о свойствах и закономерностях жизнедеятельности аутологичных полипотентных мезенхимальных стромальных клеток (АПМСК), культивируемых по современным технологиям,

позволяют использовать их для восстановления морфофункциональной состоятельности тканей и органов [1, 2, 4–8].

Цель исследования — изучить морфофункциональное состояние ткани щитовидной железы (ЩЖ) при ее аутотрансплантации в прядь большого сальника в условиях применения аутологичных полипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 150 шестимесячных крысах-самцах линии Вистар массой 300–350 г из питомника отдела экспериментального биомедицинского моделирования НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск) (сертификат имеется), которым под эфирным масочным наркозом выполнены операции тиреоидэктомии и аутотрансплантации ткани ЩЖ в прядь большого сальника в виде участка доли или

его гомогенизата. Экспериментальные животные содержались в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных.

Животные были разделены на группы: I – с трансплантацией участка ткани ЩЖ (32 крысы); II – с трансплантацией тканевого гомогенизата ЩЖ (32 крысы); III – с трансплантацией участка ткани ЩЖ и введением в трансплантат 500 тыс. АПМСК (32 крысы); IV – с трансплантацией тканевого гомогенизата ЩЖ и введением в трансплантат 500 тыс. АПМСК (34 крысы). Контрольную группу составили 20 интактных крыс.

АПМСК готовили по следующей методике. Получали суспензию костномозговых клеток в 1 мл препаровочной среды, содержащей 95% RPMI-1640 и 5% ЭТС. После фильтрации через капроновый фильтр и отмывания клеток путем центрифугирования при 1 500 об/мин в течение 10 мин взвесь клеточных элементов в 5 мл препаровочной среды помещали в чашке Петри в CO₂-инкубатор с 5% CO₂ при температуре 37 °C на 90 мин. Путем клонирования *in vitro* в полувязкой культуральной метилцеллюлозной среде с добавлением L-глутамин определяли содержание колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) (коммитированных мезенхимальных предшественников) во вводимой клеточной взвеси. Содержание мезенхимальных стволовых клеток во фракции аутологичных адгезирующих костномозговых клеток определяли методом лимитирующих разведений.

Проведенное исследование показало, что содержание КОЕ-Ф во взвеси адгезирующих клеток костного моз-га составляло $(476,6 \pm 25,6) \cdot 10^6$ нуклеаров, а мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток) $(113 \pm 12) \cdot 10^6$ трансплантируемых клеток. Адгезирующие элементы отделяли с помощью 0,25%-го раствора трипсина и 0,02%-го раствора ЭДТА в соотношении 1:1 в течение 15 мин при тех же условиях. После двукратного отмывания клетки разводили до необходимой концентрации и вводили в трансплантат по 500 тыс. клеток в 0,2 мл препаровочной среды.

Функциональное состояние трансплантированной ткани ЩЖ оценивали через 1 и 3 мес после операции. Крыс под наркозом забивали методом дислокации шейных позвонков, полученные при этом 5–7 мл крови центрифугировали и отбирали 3–4 мл сыворотки по стандартной методике, далее выполняли лапаротомию и извлекали трансплантат.

Исследование уровней тиреотропного гормона (ТТГ), общих тироксина (Т₄), трийодтиронина (Т₃), свободных Т₄, Т₃, тиреоглобулина и тиреокальцитонина проводили при помощи наборов для иммуноферментного анализа «ТироидИФА-ТТГ-1», «ТироидИФА-тироксин-01», «ТироидИФА-свободный Т₄» фирмы «АлкорБио» (г. Санкт-Петербург), «СвТ3-ИФА» фирмы «Хема» (г. Москва), «НВО Иммунотех» (г. Москва) и DRG International Inc. Lot 6032-CT (США), DRG Instruments GmbH (Германия).

Гистологическое исследование и морфометрию трансплантата выполняли по стандартной методике (ув. 160). Количественные показатели выражались в виде $M \pm m$, где M – среднее выборочное значение, m – стандартная ошибка среднего. Внутри- и межгрупповые различия показателей оценивались с использованием непараметрического U -критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Через 1 мес после аутотрансплантации отмечено значительное снижение концентрации ТТГ во всех группах, причем в I и II группах значения ТТГ существенно не отличались, в III группе этот показатель более угнетен, а в IV группе его уровень превышал сравниваемые значения. Через 3 мес установлено наиболее близкое к контролю значение ТТГ в III группе ($(0,047 \pm 0,003)$ мМЕд/л) при относительно одинаковых значениях данного параметра в других группах.

Показатели свободного Т₄ в I и II группах через 1 мес после аутотрансплантации находились на уровне $(15,18 \pm 2,60)$ и $(28,63 \pm 2,80)$ пмоль/л соответственно, а в III и IV

группах с введением в трансплантат АПМСК уровень данного гормона повысился, достигая максимума в IV группе ($(37,04 \pm 1,90)$ пмоль/л). Через 3 мес отмечена общая для всех групп тенденция увеличения данного параметра почти в 2 раза с максимальным показателем ($52,76 \pm 3,63$) пмоль/л в III группе, наиболее близким к контролю.

Уровень свободного T_3 на этапе месячного наблюдения составлял максимальное от нормы увеличение (до $(10,34 \pm 1,10)$ пмоль/л) в I группе и незначительное увеличение (до $(7,14 \pm 0,38)$ пмоль/л) во II группе. В III и IV группах значения данного показателя отличались минимально ($4,71 \pm 0,05$ и $4,68 \pm 0,10$ соответственно). Через 3 мес наблюдения показатели свободного T_3 в III и IV группах возросли вдвое, хотя и были несколько меньше, чем в I, II и контрольной группах.

Через 1 мес после ауто трансплантации показатели общего T_4 были снижены во всех группах по сравнению с контролем, достигая минимума в I группе ($(37,32 \pm 5,30)$ нмоль/л), на этапе 3-месячного наблюдения уровень общего T_4 в III и IV группах приближался к контролю, а во II группе значительно превышал контрольные показатели, достигая ($90,44 \pm 34,08$) нмоль/л.

Значение общего T_3 на этапах наблюдения в группах с введением в трансплантат АПМСК сопоставимо с данными, полученными в контрольной группе, а в I и II группах отмечалось его превышение по сравнению с контролем с тенденцией к уменьшению на 3-месячном этапе наблюдения.

Оценивая с точки зрения тиреоидной гормонпродукции эффективность двух видов трансплантации и влияние на трансплантат АПМСК, получены следующие результаты (табл. 1). На фоне сохраняющегося общего угнетения ТТГ и фактически соответствующего контролю уровня

T_3 в сравниваемых группах отмечено увеличение свободного T_3 в группах с применением АПМСК, повышение свободного и общего T_4 до уровня контрольных показателей. Данные значения гормонального статуса свидетельствуют об имеющихся гормональных реакциях во всех группах, причем с более яркими проявлениями в III и IV группах, что свидетельствует о высокой степени адаптации трансплантируемой ткани щитовидной железы в условиях применения АПМСК.

На этапе 3-месячного мониторинга зафиксировано увеличение концентрации тиреоглобулина в сыворотке крови опытных животных III и IV групп по сравнению с контролем и данными, полученными через 1 мес после трансплантации, что может свидетельствовать об активизации тиреоидного синтеза и восстановлении тиреоидного обмена (табл. 2). Динамика изменения концентрации тиреокальцитонина в сравниваемых группах на этапах наблюдения не однозначна, обращает на себя внимание значительное увеличение данного показателя в IV группе через 3 мес после ауто трансплантации, что также подтверждает функциональную активность C-клеточного аппарата (табл. 2).

Морфологическая картина ауто трансплантата ткани ЩЖ при применении АПМСК имеет следующую характеристику. В I группе (рис. 1) на гистологических срезах ауто трансплантата среди жировой и соединительной ткани видны тиреоидные фолликулы в количестве до 50 на срезе. Размеры фолликулов средние, встречаются единичные крупные фолликулы. Стратификация фолликулов отсутствует. Эпителий их кубический, слущивающийся в просвет фолликула. Коллоид зернистый, гомогенный, в части фолликулов окрашен слабо. Между фолликулами имеются прослойки соединительной ткани с очаговым или диффузным скоплением лимфоцитов и макрофагов.

Таблица 1

Показатели тиреоидного гормонального статуса в экспериментальных группах на этапах наблюдения ($M \pm m$)

Группа	Свободный T_3 , пмоль/л		Свободный T_4 , пмоль/л		Общий T_3 , нмоль/л		Общий T_4 , нмоль/л		ТТГ, мМЕд/л	
	1 мес	3 мес	1 мес	3 мес	1 мес	3 мес	1 мес	3 мес	1 мес	3 мес

I	10,34 ± 1,10	9,15 ± 0,07	15,18 ± 2,60*	34,84 ± 2,60*	3,14 ± 0,46*	1,43 ± 0,09	37,32 ± 5,30*	59,02 ± 3,16	0,020 ± 0,010*	0,037 ± 0,005
II	7,14 ± 0,38*	9,54 ± 0,21	28,63 ± 2,80*	44,22 ± 3,06	2,02 ± 0,09*	1,50 ± 0,06	46,11 ± 5,70	90,44 ± 34,08	0,020 ± 0,010*	0,038 ± 0,008
III	4,71 ± 0,05*	8,88 ± 0,07	29,00 ± 4,00*	52,76 ± 3,63	1,73 ± 0,21	1,49 ± 0,16	42,96 ± 5,20*	53,50 ± 1,39	0,010 ± 0,010*	0,047 ± 0,003
IV	4,68 ± 0,10*	8,92 ± 0,21	37,04 ± 1,90*	43,68 ± 4,98	1,83 ± 0,20	1,40 ± 0,07	38,84 ± 3,70*	56,36 ± 3,39	0,030 ± 0,010*	0,033 ± 0,004*
Контроль	12,11 ± 1,96		63,87 ± 10,32		1,93 ± 0,52		62,23 ± 7,13		0,059 ± 0,008	

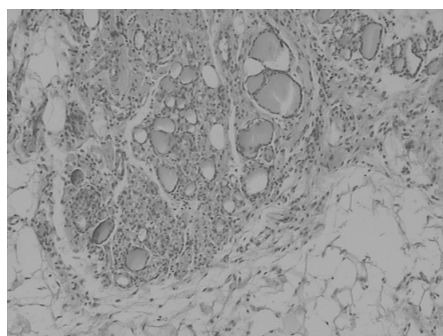
* Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

Таблица 2
Показатели тиреокальцитонина и тиреоглобулина в экспериментальных группах на этапах наблюдения (M ± m)

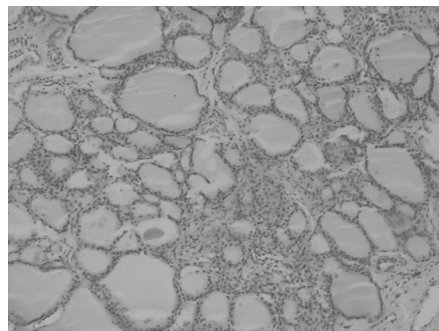
Группа	Тиреокальцитонин, пг/л		Тиреоглобулин, нг/л	
	1 мес	3 мес	1 мес	3 мес
I	6,8 ± 1,7	12,9 ± 4,9*	2,2 ± 0,7*	3,2 ± 1,2
II	15,9 ± 4,8*	14,1 ± 4,6*	2,7 ± 1,0	8,6 ± 2,1
III	7,6 ± 1,7*	3,9 ± 0,6	3,5 ± 0,9	11,8 ± 1,4*
IV	5,8 ± 0,8*	21,7 ± 3,3*	5,2 ± 1,8	8,6 ± 2,1
Контроль	5,9 ± 0,8		5,7 ± 0,8	

* Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

В III группе (рис. 2) количество фолликулов ЩЖ на срезах превышало 50, по размеру они средние и крупные. Наблюдались явления стратификации. Эпителий кубический, слущивание его в просвет фолликулов практически отсутствует. Коллоид ярко окрашен, имеет зернистую или гомогенную структуру. Между фолликулами выявлены прослойки соединительной ткани с интерфолликулярным лимфомакрофагальным инфильтратом, который носит очаговый характер. Выражены явления ангиогенеза.

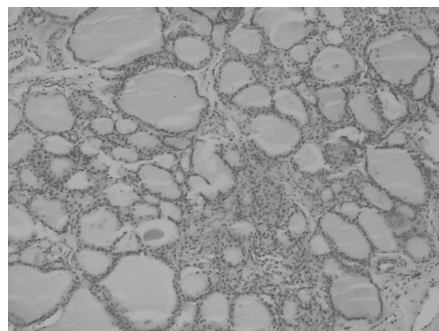


Через 1 мес после операции

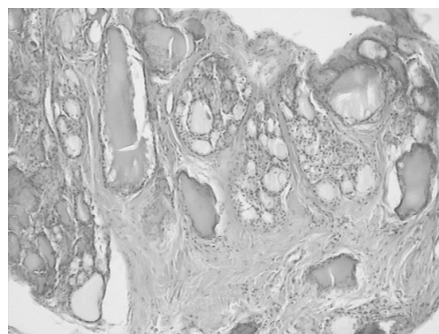


Через 3 мес после операции

Рис. 1. Неизменный участок ткани щитовидной железы, трансплантированный в прядь большого сальника (I группа)



Через 1 мес после операции

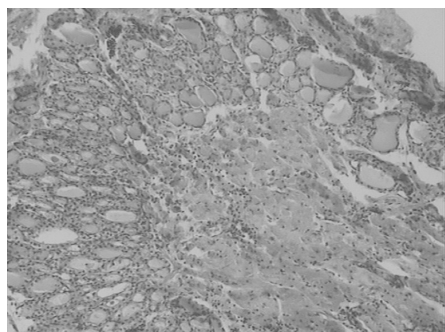


Через 3 мес после операции

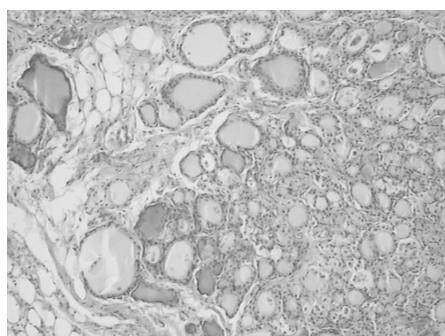
Рис. 2. Неизменный участок ткани щитовидной железы, трансплантированный в прядь большого сальника с однократной инъекцией 500 тыс. АПМСК (III группа)

Во II группе (рис. 3) на гистологических срезах среди жировой и соединительной ткани видны мелкие, средние и крупные фолликулы

ЩЖ (более 50 на срезе). Стратификация отсутствует. Эпителий фолликулов уплощенный или низкий кубический. Коллоид имеет зернистую или гомогенную структуру, окрашен слабо. Между фолликулами наблюдаются прослойки соединительной ткани и диффузный лимфомакрофагальный инфильтрат.



Через 1 мес после операции



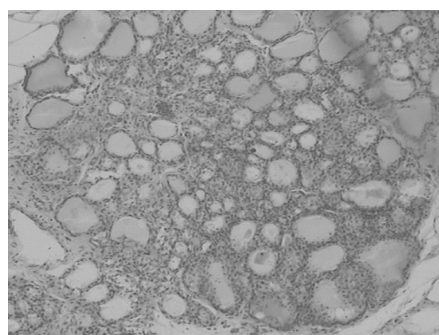
Через 3 мес после операции

Рис. 3. Гомогенизат неизмененного участка ткани щитовидной железы, трансплантированный в прядь большого сальника (II группа)

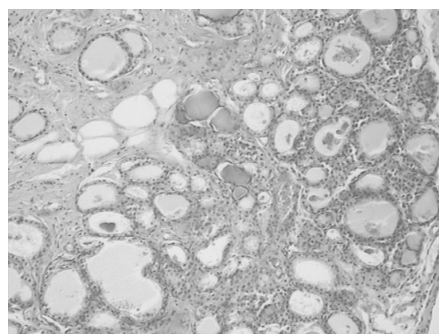
На гистологических срезах в IV группе (рис. 4) количество фолликулов более 50. Фолликулы средние и крупные. Видны явления стратификации. Эпителий фолликулов кубический с участками уплощенного, слущивания эпителия нет. Коллоид ярко окрашен, имеет зернистую или гомогенную структуру. Интерфолликулярный фиброз выражен умеренно, лимфомакрофагальная инфильтрация носит очаговый деликатный характер. Выражены явления ангиогенеза. При сравнении морфологической картины установлено, что в III и IV группах с применением АПМСК тиреоидные фолликулы более крупные, стратифицированные, со-

Экспериментальные и клинические исследования

держат большее количество яркоокрашенного коллоида, меньше выражены явления склероза, а лимфомакрофагальная инфильтрация носит очаговый характер. Активно идет процесс ангиогенеза, что свидетельствует о морфофункциональной состоятельности трансплантата.



Через 1 мес после операции



Через 3 мес после операции

Рис. 4. Гомогенизат неизмененного участка ткани щитовидной железы, трансплантированный в прядь большого сальника с однократно выполненной инъекцией 500 тыс. АПМСК (IV группа)

Заключение

Использование аутологичных полипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ауто-трансплантации ткани щитовидной железы усиливает морфо-

функциональные характеристики аутотрансплантата и позволяет компенсировать тиреоидную недостаточность.

Автор выражает благодарность за помощь в выполнении исследований следующим сотрудникам НИИ фармакологии СО РАМН и кафедры общей хирургии СибГМУ: В.В. Жданову, Т.И. Фоминой, Л.А. Ставровой, В.В. Удугу, О.С. Попову.

Литература

1. Божок Г.А., Алабедалькарім Н.М., Легач Є.І. Вплив кріоконсервування на імунно-біологічні властивості фрагментів надниркових залоз при алотрансплантації // Трансплантологія. 2004. Т. 5, № 1. С. 88–92.
2. Бондаренко Т.П., Божок Г.А., Алабедалькарім Н.М. та інші. Ксенотрансплантація кріоконсервованного ендокринного матеріалу як метод корекції гіпофункції залоз в експерименті // Трансплантологія. 2003. Т. 4, № 4. С. 60–63.
3. Пат. 2161917 РФ. Способ профилактики послеоперационного гипотиреоза / Попов О.С., Удуг В.В., Титов Д.С. и др.
4. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. и др. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов // Вестн. трансплантологии искусств. органов. 2002. № 4. С. 7–11.
5. Curtillet C., Cuadras P., Dore E. et al. Impairment thyroid after transplantasion of hemoetic stem precursor-cells in children // Arch. Pediatr. 2004. Nov. V. 11 (11). P. 1326–1332.
6. Matsumoto M., Ishiguro H., Tomita Y. et al. The changes of thyroid fursion after transplantasion of marrow in young patients // Pediatr Int. 2004. Jun. V. 46 (3). P. 291–295.
7. Reigh-Yi Lin, Atsushi Kubo, Gordon M. Keller et al. Ability of stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells *in vitro* // Endocrinology. 2003. V. 144, № 6. P. 2644–2649.
8. Saito T., Mineishi S. Non-myeloablative allogeneic stem cell transplant: achievements and perspectives // Эксперимент. онкология. 2001. Т. 23. С. 4–10.

Поступила в редакцию 20.05.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Сведения об авторах

А.Н. Галян – канд. мед. наук, ассистент кафедры общей хирургии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Галян Андрей Николаевич, тел. 8 (3822) 53-42-15, 53-32-81.