

Винахід відноситься до галузі біології і медицини і може бути використаний для ало- і ксенотрансплантації шкіри при пластичних операціях, у хворих з опіками та скальпованими ранами.

Молекулярною основою реакції відторгнення трансплантату є взаємодія між рецепторами Т-лімфоцитів і молекулами МНС (HLA), переважно HLA-DR [Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. / Пер. с англ. В.И.Кандрора, А.Н.Маца, Л.А.Певницкого, М.А.Серовой. - М.: Мир, 2000. - 592с.]. Тому в практичній трансплантології застосовуються такі способи попередження відторгнення трансплантату як неспецифічна і специфічна імуносупресія, індукція ареактивності до трансплантату шляхом спрямованого впливу на цитокінову регуляцію імунної відповіді, моделювання співвідношення між Th-лімфоцитами 1 і 2 типів, використання антитіл проти CD3⁺-клітин та ін [WO 9930730 A 1. Tremblay, Jacques, P. Способы и композиции для трансплантации клеток хозяину. -Изобретения стран мира. - 2000. - Вып.8, №12. - С.70; US 5914314 A. Falk, Rudolf Edgar, Asculai, Samuel S. Форма гиалуроновой кислоты и лекарственное средство, применяемое для уменьшения реакции отторжения трансплантированных органов у млекопитающих. Изобретения стран мира. - 2000. - Вып.8, №12. - С.50; US 5916559 A. Strom, Terry B. Применение агентов, специфических в отношении рецептора интерлейкина-2, для лечения отторжения трансплантата. - Изобретения стран мира. - 2000. - Вып.8, №12. - С.54; 6 A61K39/385. Карпов И.А., Копыльцов В.Н., Скалецкий Н.Н. Способ трансплантации органов и тканей. - 1998. - RU БИ №32. - С.340; WO 6A61K31/70. Simon, Paul M.; Mequire, Edward, J. Способы и олигосахариды для ослабления отторжения трансплантата. - Изобретения стран мира. - 2000. - Вып.8, №1. - С.71].

Мета винаходу. Розробити спосіб ало- і ксенотрансплантації шкіри без застосування імуносупресантів та інших фармакологічних препаратів.

Поставлена мета досягається тим, що перед ало- або ксенотрансплантацією шкіри внутрішньовенно вводяться мегадозы ембріональних плюріпотентних прогеніторних клітин (ЕППК) при одночасному внутрішньочеревному введенні антигену шкіри, що трансплантується.

Результати експериментальних досліджень.

Для отримання вагітних самок відібрано 6 самців білих щурів і 30 статевозрілих самок [сертифікат розпліднику Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України]. Тварин розмішували в окремих клітках (1 самець + 5 самок). Три вагітні самки на певному етапі розвитку ембріону вводили в наркоз (натрію етамінал - 40мг на кг маси тіла). Після асептичної обробки операційного поля (96° етиловий спирт, йод) проводили середню лапаротомію по linea alba. Обидва роги вагітної матки виводили в операційну рану і розрізали стерильними ножицями поперек (біля ембріонів). Останні вилучували в стерильну чашку Петрі з охолодженням до 4°С середовищем Хенкса з гентаміцином (кінцева концентрація - 0,001%). Після потрібної промивки з ембріонів виділяли ЕППК за розробленою нами методикою. Суспензію ЕППК фільтрували через капроновий фільтр (175мкм). До фільтрату додавали рівний об'єм 5% розчину димексиду (попередньо профільтрованого через клітинний фільтр з розміром пор 0,20мкм). Перед трансплантацією шкіри дослідним щурам внутрішньовенно вводили суспензію ЕППК (контроль життєздатності здійснювали шляхом світлової мікроскопії при забарвленні клітин трипановим синім) у визначеній нами дозі. Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм суміші 5% розчину димексиду у середовищі Хенкса. Всім тваринам в черевну порожнину вводили по 1,0мл антигену трансплантованої шкіри: наважку шкіри (10мг) обробляли ацетоном для видалення ліпідів, висушували, гомогенізували і додавали 1,0мл розчину Хенкса).

Протокол операції парної алотрансплантації шкіри. По дві тварини одночасно вводили в наркоз (натрію етамінал - 40мг на кг маси тіла). Ножицями ретельно видаляли шерсть на шкірі спини. Шкіру обробляли 96° спиртом та спиртовим розчином йоду. По шаблону (діаметр - 5см) концентрованим йодом відмічали межі шкірних ділянок. Ділянки шкіри відсепаровували і проводили алотрансплантацію шкіри з ушиванням шкірних країв вузловими однорядними швами. Щурів переносили в асептично оброблену післяопераційну кімнату.

Протокол операції ксенотрансплантації шкіри. Донором шкіри були статевозрілі морські свинки. Під нембутованим наркозом ножицями ретельно видаляли шерсть на шкірі спини. Шкіру обробляли 96° спиртом та спиртовим розчином йоду. По шаблону (діаметр - 5см) концентрованим йодом відмічали межі шкірних ділянок. Ділянки шкіри відсепаровували і проводили ксенотрансплантацію шкіри морських свинок щурам з ушиванням шкірних країв вузловими однорядними швами. Щурів переносили в асептично оброблену післяопераційну кімнату.

Результати оцінювали через 12, 15 і 90 днів після операції. На фото 1 (контроль), 2 (дослід) - тварини через 12 днів після алотрансплантації шкіри. У контрольного щура алотрансплантат перетворився в стрип і відторгнувся через 15 днів (фото 3), а в дослідній тварині шкіра залишалася живою впродовж 3міс. спостереження (фото 4). Введення щурам мегадоз ЕППК, отриманих з ембріонів самок щурів, сприяло приживленню ксеногенної шкіри. Про успішну ксенотрансплантацію шкіри морської свинки щурам свідчило її приживлення, що спостерігалось до кінця експерименту - протягом 90 днів (фото 5-6).

Висновок

Результати дослідження підтверджують ефективність застосування мегадоз ЕППК для досягнення імунологічної толерантності при експериментальній ало- і ксенотрансплантації шкіри.

Відповідність критерію "новизна" даного способу забезпечує те, що імунологічна толерантність при ало- і ксенотрансплантації шкіри досягається без використання імуносупресантів та інших фармакологічних впливів на імунну систему, за допомогою ембріональних плюріпотентних прогеніторних клітин.

Відповідність критерію "суттєві відмінності" даного способу забезпечує те, що на відміну від відомих раніше способів попередження реакції відторгнення трансплантату, імунологічна толерантність досягається шляхом внутрішньовенного введення ембріональних плюріпотентних прогеніторних клітин на тлі внутрішньочеревного введення в організм антигенів алотрансплантованої шкіри.

Відповідність даного винаходу критерію "позитивний ефект" забезпечується результатами експериментальних досліджень, які впродовж 3 міс. спостереження засвідчують відсутність реакції відторгнення ало- і ксенотрансплантатів шкіри при одночасному введенні в організм алоантигенів шкіри і ембріональних плюріпотентних прогеніторних клітин.



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6