

УДК 576.3/7.086.83:616.13:617.58

© Попандопуло А.Г., Оберемко А.В., Варшавер П.Л., Постолук І.Г., 2012

## ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НА НЕОАНГІОГЕНЕЗ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ХРОНІЧНОЮ ІШЕМІЄЮ НИЖНІХ КІНЦІВОК

Попандопуло А.Г., Оберемко А.В., Варшавер П.Л., Постолук І.Г.

ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В.К. Гусака НАМН України»

Експериментальне дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми: «Дослідити деякі механізми неоангіогенезу при дистальних хронічних порушеннях артеріального кровообігу нижніх кінцівок за умов використання клітинно-тканинних технологій» (№ держреєстрації 0111U002051).

Лікування хронічної ішемії нижніх кінцівок до нинішнього часу залишається невирішеною проблемою сучасної науки. Навіть в розвинутих країнах, таких, як Німеччина, кількість ампутацій нижніх кінцівок, пов'язаних з нереконструктабельними дистальними оклюзійними ураженнями артерій, досягає 40 000 на рік [1].

Ідея клітинної трансплантації для лікування ішемії нижніх кінцівок на сьогодні є одним із найбільш перспективних напрямків терапії критичної ішемії при дистальному порушенні кровообігу. Вивчення цього питання проводиться протягом майже десяти років. В різних країнах в експерименті при моделюванні хронічної ішемії нижніх кінцівок вивчалися різні клітини-кандидати для неоангіогенезу - моноклеари кісткового мозку [2], моноклеарні клітини периферичної крові [3,4], тромбоцити периферичної крові разом з моноклеарами [5], гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки [6] та ін. Трансплантація клітинного матеріалу поліпшувала в експерименті показники колатерального кровообігу в ураженій кінцівці. Але поки що не визначено, за рахунок чого відбувається ревазуляризація при трансплантації стовбурових клітин. На даний час також відсутні дані щодо порівняння ефекту введення різних клітин та порівняння впровадження цих нових методів неоангіогенезу з іншими непрямими методами.

**Метою** дослідження було визначити вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку на неоангіогенез нижніх кінцівок щурів за умов експериментальної хронічної ішемії нижніх кінцівок.

**Матеріал і методи.** Експериментальне дослідження проводилось на інбредній лінії щурів Вістар-Кіото масою 270-340 г. Вибір щурів інбредної лінії Вістар пов'язаний з високим ступенем гомозиготності цих тварин, що нівелювало можливість реакції відторгнення алотрансплантата, отриманого з кісткового мозку однієї тварини цієї ж лінії.

МСК отримували з кісткового мозку. Виділені клітини при маркуванні антитілами ("BD Biosciences Pharmingen", США) мали фенотип: CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> (> 95 % позитивних) і CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD79a<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup> (< 2 % позитивних) та були здатні диференціюватись в остео-, адипо- та хондрогенному напрямку при спрямованій індукції *in vitro*. Культивування проводили за стандартною методикою [7].

Експериментальне моделювання хронічної ішемії кінцівки щурів проведено за методикою,

розробленою в державній установі «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім В.К. Гусака Національної академії медичних наук України». Після двоетапного оперативного втручання з метою прошивання стовбура та гілок стегневої артерії було підтверджено наявність хронічної ішемії кінцівки у всіх щурів. Клінічне підтвердження було основане на появі трофічних виразок на оперованих кінцівках та кульгавості у щурів. Інструментальне підтвердження було отримане шляхом порівняння графічних зображень, отриманих за допомогою лазерного доплеровського флоуметрування (ЛДФ) здорової та оперованої кінцівки (спостерігалось значне зниження показника мікроциркуляції). Після виведення тварин з експерименту були взяті біоптати м'язів гомілки та стегна, де спостерігались ознаки хронічної ішемії, з метою проведення гістологічного дослідження.

Всі щури були поділені на 5 груп по 15 тварин. Перша група (контрольна) – формування хронічної ішемії без подальшого лікування. Друга група – внутрішньом'язове введення фізіологічного розчину. Третя група – внутрішньом'язове введення аутокрові, як агенту формування місцевого асептичного запалення, та, завдяки цьому, як можливого джерела неоангіогенезу в уражених кінцівках. Четверта група – внутрішньом'язове введення МСК, як джерела ангіогенезу. П'ята група – інтраваскулярне введення МСК.

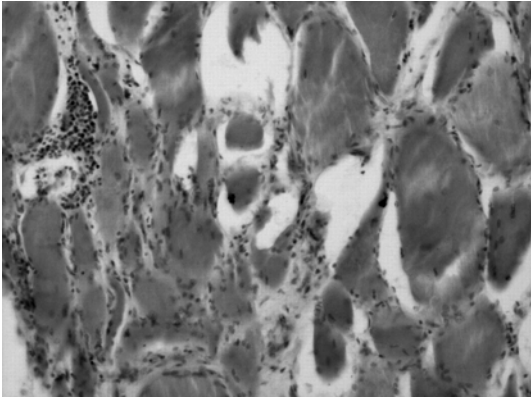
Курс введення суспензії мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин при інтраваскулярному та внутрішньом'язовому введенні - одноразово дозою  $2 \times 10^6$  на кілограм ваги в чотирьох точках: по дві в ділянки гомілки та стегна.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням ліцензійного пакету «MedStat» (версія 3, сер. № MS000027) з використанням адекватних методів біостатистики. При значеннях  $p < 0,05$  відмінності вважали достовірними.

**Результати та їх обговорення.** Після моделювання ішемії нижньої кінцівки за дві доби після проведення перев'язування стегнової артерії при гістологічному дослідженні м'язової тканини внутрішньої поверхні стегна у всіх спостереженнях мали місце ознаки вираженої ішемії на фоні порушення кровообігу в судинах мікроциркуляції.

На 7-му добу експериментальної ішемії в біоптатах спостерігались максимально виражені ознаки деструкційних процесів в м'язових волокнах з наявністю вогнищ некрозу, вираженою вакуольною та жировою дистрофією, набряком міжм'язової строми. Мали місце розволокнення та набряк судинної стінки з прогресуючою десквамацією та некрозом ендотеліальних клітин з облітерацією просвіту судин за рахунок тромбозу. В більшості спостережень на 7-му добу ішемії в м'язових біоптатах периваскулярно визначалась

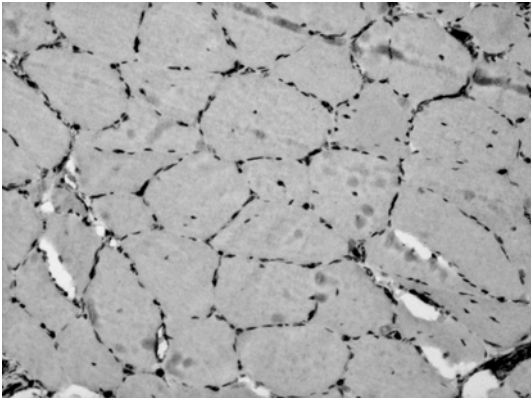
помірна лімфогістіоцитарна інфільтрація (рис. 1). В окремих спостереженнях зберігались вогнищеві міжм'язові крововиливи різної давності з вогнищами відкладень гемосидерину, некрозом окремих м'язових волокон.



**Рис. 1.** Експериментальна ішемія, 7-а доба. Виражені дистрофічні зміни міоцитів, помірна лімфогістіоцитарна інфільтрація периваскулярно та в перимізії. Фарбування гематоксилином і еозином, окуляр  $\times 10$ , об'єктив  $\times 7,5$ .

На 14-ту добу експериментальної ішемії ознаки розладу кровообігу в м'язах ішемізованої кінцівки починали регресувати та на перший план виступали репаративні фібропластичні процеси.

На 21-шу добу ішемії процеси репарації стабілізувались, м'язові волокна нерівномірної товщини, з гіперплазією окремих волокон, м'язовим склерозом і ліпоматозом, периваскулярно – виражений склероз. При імуногістохімічному фарбуванні з CD34 в міжм'язовій стромі чітко візуалізувались стінки нечисельних судин, мілкі тонкостінні капіляри визначались в перимізії (рис. 2).



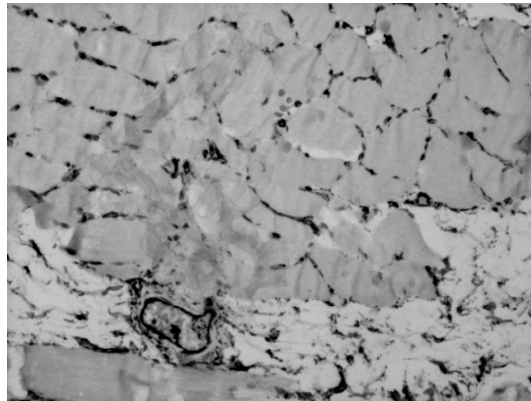
**Рис. 2.** Експериментальна ішемія, 21-а доба. Одиночні тонкостінні капіляри в перимізії. Імуногістохімія з моноклональними антитілами до CD34, окуляр  $\times 10$ , об'єктив  $\times 7,5$ .

Гістологічна картина в групі тварин з внутрішньом'язовим введенням фізіологічного розчину суттєво не відрізнялась від такової в групі тварин без проведення будь-якого лікування.

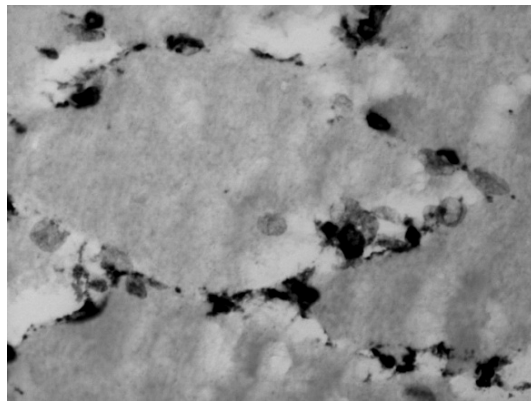
В групі тварин з внутрішньом'язовим введенням аутокрові в ранні строки експерименту (2-7-а доба) гістологічно в м'язовій тканині мали місце виражені дистрофічні зміни міоцитів, у міжм'язових просторах – крововиливи та гемоси-

дероз. В зонах проведення ін'єкцій на 14-ту добу експерименту визначалась велика кількість гемосидерофагів, навантажених пігментом бурого кольору. Мали місце потовщення та фіброз стінок судин, збільшення кількості сполучнотканинного компоненту периваскулярно. На 21-шу добу експериментальної ішемії в даній групі тварин міжм'язовий склероз був більш вираженим порівняно з групою тварин без проведення будь-якої терапії та шурів 2-ї експериментальної групи з внутрішньом'язовим введенням фізіологічного розчину.

На 14-ту і 21-шу добу експерименту в м'язових біоптатах тварин з введенням МСК фіброзні зміни були виражені достовірно менше ( $p < 0,05$ ). Крім того, при імуногістохімічному фарбуванні з CD34 кількість дрібних міжм'язових капілярів була достовірно вищою ( $p < 0,05$ ), ніж в інших групах тварин (рис. 3). Тоді як у вивченні трансплантації стовбурових клітин з плазмідом VEGF (*vascular endothelial growth factor*) гістологічні дослідження не виявили жодних ознак формування нових кровоносних судин у зразках з ішемізованих кінцівок, в той час, як отримані добрі клінічні результати такої терапії [8].



а)



б)

**Рис. 3.** Експериментальна ішемія, група тварин з інтраваскулярним введенням МСК, 21-а доба. Велика кількість дрібних капілярів в перимізії. Імуногістохімія з моноклональними антитілами до CD34, а) Окуляр  $\times 10$ , об'єктив  $\times 7,5$ , б) Окуляр  $\times 10$ , об'єктив  $\times 30$ .

Таким чином, результати проведеного дослідження засвідчили про покращення кровотоку в ішемізованих кінцівках після як інтраваскулярного, так і внутрішньом'язового введення суспензії мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин порівняно з тими тваринами, яким не про-

водилась трансплантація клітин в ішемізовані тканини, та тими тваринами, яким внутрішньом'язово вводили фізіологічний розчин. Застосування МСК кісткового мозку порівняно з внутрішньом'язовим введенням аутокрові в експерименті на фоні ішемії дало більш швидке відновлення міжм'язових капілярів в ішемізованих кінцівках.

**Висновки:**

1. Трансплантація МСК кісткового мозку в ішемізовані кінцівки дослідних тварин дозволила

на 14-ту і 21-шу добу експерименту достовірно ( $p<0,05$ ) зменшити кількість фіброзних змін в м'язах порівняно з групою тварин, яким не проводилося лікування або внутрішньом'язово вводився фізіологічний розчин чи аутокров.

2. При імуногістохімічному фарбуванні з CD34 кількість дрібних міжм'язових капілярів була достовірно вищою у тварин з введенням МСК, ніж в інших групах тварин ( $p<0,05$ ).

**ЛІТЕРАТУРА:**

1. Chronic critical limb ischemia / A. Dohmen, S. Eder, W. Euringer [et al.] // Dtsch Arztebl Int. – 2012. – № 109(6). – P. 95-101.  
 2. Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia using autologous bone marrow cell transplantation / H. Matsubara // Nippon Naika Gakkaï Zasshi. – 2003. – N 10. – P. 877 – 883.  
 3. Outcomes of using autologous peripheral-blood stem cells in patients with chronic lower arterial insufficiency / A.V. Maksimov, A.P. Kiiasov, M.V. Plotnikov [et al.] // Angiol. Sosud. Khir. – 2011. – N 17(2). – P. 11-15.  
 4. Adverse events during treatment of critical limb ischemia with autologous peripheral blood mononuclear cell implant / T.B. Jonsson, T.Larzon, B. Arfvidsson [et al.] // Int Angiol. – 2012. - № 31(1). – P. 77-84.  
 5. Покровский А.В. Клиническая ангиология: руко-

водство для врачей. В 2 т. Т. 1. Под ред. А. В. Покровского. – М.: Медицина, 2004. – 808 с.  
 6. Поляченко Ю.В. Імуногістохімічна та ультраструктурна характеристика процесів неоангіогенезу після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки за умов експериментальної ішемії / Поляченко Ю.В., Салютін Р.В. // Харківська хірургічна школа. - 2010. - № 4 (42). - С.41-45.  
 7. Індуктивні властивості різних носіїв культивованих клітинних ліній / В.К. Гринь, В.Н. Казаков, А.Г. Попандопуло [та ін.] // Трансплантологія. – 2008. - Т. 10, № 1. – С. 96 – 99.  
 8. Complex gene-cell therapy in treatment of critical lower limbs ischemia / J. Skóra, A. Pupka, P. Barć [et al.] // Pol Merkur Lekarski. – 2007. - Feb;22(128). - P. 121-125.

**Попандопуло А.Г., Оберемко А.В., Варшавер П.Л., Постолюк І.Г.** Вплив клітинної трансплантації на неоангіогенез шурів з експериментальною хронічною ішемією нижніх кінцівок // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 4. – С. 129-131.

Хронічні облітеруючі захворювання артерій нижніх кінцівок досить часто призводять до інвалідизації пацієнтів, що являє собою серйозну медико-соціальну проблему. Метою даної роботи було визначити вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку на неоангіогенез нижніх кінцівок шурів за умов експериментальної хронічної ішемії нижніх кінцівок. Результати показали, що після моделювання ішемії за дві доби після проведення перев'язування стегнової артерії при гістологічному дослідженні м'язової тканини внутрішньої поверхні стегна у всіх спостереженнях мали місце ознаки вираженої ішемії на фоні порушення кровообігу в судинах мікроциркуляції. Трансплантація МСК кісткового мозку в ішемізовані кінцівки дослідних тварин дозволила на 14-ту і 21-шу добу експерименту достовірно зменшити кількість фіброзних змін в м'язах порівняно з тваринами, яким не проводилось лікування або внутрішньом'язово вводився фізіологічний розчин ( $p<0,05$ ). Крім того, при імуногістохімічному фарбуванні з CD34 кількість дрібних міжм'язових капілярів була достовірно вищою у тварин з введенням МСК, ніж в інших групах тварин ( $p<0,05$ ).

**Ключові слова:** мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку, хронічна ішемія нижніх кінцівок.

**Попандопуло А.Г., Оберемко А.В., Варшавер П.Л., Постолюк І.Г.** Влияние клеточной трансплантации на неоангиогенез крыс с экспериментальной хронической ишемией нижних конечностей // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 4. – С. 129-131.

Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей достаточно часто приводят к инвалидизации пациентов, что представляет собой серьёзную медико-социальную проблему. Целью данной работы было определить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга на неоангиогенез нижних конечностей крыс при экспериментальной хронической ишемии нижних конечностей. Результаты показали, что после моделирования ишемии через двое суток после проведения перевязывания бедренной артерии при гистологическом исследовании мышечной ткани внутренней поверхности бедра во всех наблюдениях имели место признаки выраженной ишемии на фоне нарушения кровообращения в сосудах микроциркуляции. Трансплантация МСК костного мозга в ишемизированные конечности подопытных животных позволила на 14-е и 21-е сутки эксперимента достоверно уменьшить количество фиброзных изменений в мышцах по сравнению с животными, которым не проводилось лечение или внутримышечно вводился физиологический раствор ( $p<0,05$ ). Кроме того, при иммуногистохимическом окрашивании с CD34 количество мелких межмышечных капилляров было достоверно выше у животных с введением МСК, чем в других группах животных ( $p<0,05$ ).

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга, хроническая ишемия нижних конечностей

**Popandopulo A.G., Oberemko A.V., Varshaver P.L., Postolyuk I.G.** Cell transplantation influence on rat's angiogenesis by experimental chronic lower limb ischemia // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 4. – С.129-131.

Chronic lower limb ischemia represents a serious problem in Ukraine. The purpose of this work was to determine bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) influence on rat's angiogenesis by experimental chronic lower limb ischemia. Rats of the Wistar-Kioto line were divided into 5 groups, 2 of which – with transplantation of bone marrow MSCs. The histological signs of apparent ischemia against microcirculation disorder were revealed in two days after chronic lower limb simulation. Bone marrow MSCs transplantation to ischemic lower limbs of experimental animals allowed to reduce number of fibrous changes in muscles in comparison with animals without treatment or with physiological solution injection at 14th and 21st days of experiment ( $p<0,05$ ). Immunohistochemical staining with CD34 revealed small intermuscular capillaries was increasing for animals with transplantation of bone marrow MSCs compared to other groups of animals ( $p<0,05$ ).

**Key words:** bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells, chronic lower limb ischemia.

Надійшла 21.05.2012 р.  
 Рецензент: проф. В.І.Лузін