

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНОЇ ІШЕМІЇ НИЖНІХ КІНЦІВОК

Р. В. Салютін, С. С. Паляниця, В. М. Сірман, Л. А. Панченко, Л. С. Комарова
Координаційний центр трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України, м. Київ

TRANSPLANTATION OF MULTIPOTENT STROMAL CELLS OF ADIPOSE TISSUE IN TREATMENT OF THE LOWER EXTREMITIES CHRONIC ISCHEMIA

R. V. Salyutin, S. S. Palyanytsya, V. M. Sirman, L. A. Panchenko, L. S. Komarova

Незадовільні результати лікування хронічної ішемії кінцівок зумовили необхідність пошуку нових методів лікування хворих. Розвиток біотехнологій, молекулярної та клітинної біології дозволив використовувати клітину для лікування багатьох захворювань [1], в тому числі хронічних ішемічних станів [2]. Майбутнє клітинної терапії і трансплантології пов'язане з використанням стовбурових клітин, які застосовують з метою заміщення структурної і функціональної недостатності різних органів [3].

Переваги використання аутологічних стовбурових клітин для трансплантаційної медицини очевидні: необмежена доступність, швидке досягнення результатів, відсутність необхідності проведення імуносупресивної терапії та уникнення її негативних побічних реакцій [4]. В літературі є повідомлення про клінічне використання стовбурових клітин, виділених з пуповинної крові, що є етично прийнятним і перспективним. Розробляються інші альтернативні шляхи одержання стовбурових клітин людини, які використовують як джерело гемопоетичних стовбурових клітин і для відновлення кровотоку в ішемізованих органах і тканинах [5, 6].

Мезенхімальні стромальні клітини, які отримують під час ферментного оброблення жирової тканини, мають схожу з поліпотентними мезенхімальними стромальними клітинами кісткового мозку здатність диференціюватися в клітини як мезенхімального, так і немезенхімаль-

Реферат

В експериментальних дослідженнях на щурах, у яких моделювали ішемію кінцівки, в рамках доклінічних досліджень встановлена доцільність застосування стромальних клітин, виділених з жирової тканини. Вивчені гістологічні та імуногістохімічні зміни в м'язовій тканині після трансплантації мультипотентних стромальних клітин (МСК) власної жирової тканини у хворих при ішемії нижньої кінцівки. Показані зменшення вираженості ішемічного ушкодження міофібрил, швидка активація регенераторних сил м'язів, чітка стимуляція процесів ангіогенезу через 3 міс після трансплантації МСК.

Ключові слова: хронічна ішемія нижніх кінцівок; непряма реваскуляризація; стромальні клітини жирової тканини.

Abstract

The expediency of the stromal cells application, obtained from adipose tissue, was determined in a frame of preclinical investigations conduction, concerning experimental works on laboratory rats, in whom the extremity ischemia was simulated. Histologic and immunohistochemical changes were studied in muscular tissue after transplantation of multipotent stromal cells of own adipose tissue in patients, suffering ischemia of the lower extremity. Reduction of severity of the myofibrils ischemic damage, rapid activation of the muscles regenerative power, accurate stimulation of the angiogenesis processes in 3 mo after transplantation of the cells were demonstrated.

Key words: chronic ischemia of the lower extremities; indirect revascularization; stromal cells of adipose tissue.

ного походження. Шляхом підбору спеціальних середовищ і умов культивування вдається диференціювати ендотеліальні клітини в гладеньком'язові, попередниці ендотеліальних клітин — в кардіоміоцити [7].

Проведені експериментальні дослідження на щурах з вивчення впливу стромально-васкулярної фракції на експериментальну ішемію кінцівок. Робота здійснена в межах етапу доклінічного дослідження з оформленням протоколу доклінічного дослідження відповідно до наказу МОЗ України від 10.10.07 № 630 "Про затвердження порядку проведення клінічних випробувань клітинних та клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань". За даними

доклінічних досліджень підтверджено значну активацію процесів ангіогенезу та суттєве зменшення пошкоджуючого впливу в умовах експериментальної ішемії.

Мета роботи: визначити гістологічні та імуногістохімічні зміни, що відбуваються в м'язах ішемізованої кінцівки пацієнтів при облітеруючих захворюваннях артерій кінцівок після трансплантації МСК, виділених з власної жирової тканини.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розроблена технологія трансплантації МСК, виділених з жирової тканини, хворим при хронічній ішемії кінцівок, яка включала першим етапом отримання жирової

тканини шляхом ліпоаспірації, виділення стромально—васкулярної фракції жирової тканини. Частину отриманих клітин стромально—васкулярної фракції внутрішньом'язово вводили в кінцівку (сегмент гомілка — стопа), решту клітин залишали для подальшого культивування та експансії на питоному середовищі. Через 2 — 3 тиж, після 3—го пасажу клітини знімали з питоного середовища для повторного пересадження хворому в ішемізовану кінцівку. Трансплантацію клітин здійснювали шляхом їх внутрішньом'язового введення в зону ішемії в ділянках оклюзованих артерій. Перед трансплантацією і через 3 міс після першої трансплантації брали біопсійний матеріал м'язів ішемізованої кінцівки для гістологічних та імуногістохімічних досліджень.

Застосовували загальні гістологічні методи дослідження за стандартною схемою. Під час проведення імуногістохімічних досліджень використовували непрямий стрептавідин—пероксидазний метод виявлення експресії антигенів віментину, фактору Віллебранда та колагену IV типу.

Трансплантація МСК, виділених з жирової тканини, здійснена у 9 пацієнтів — при хронічній ішемії нижніх кінцівок, у 4 — облітеруючому ендартеріїті, у 3 — облітеруючому атеросклерозі, у 2 — постемболічній оклюзії артерій стегново—підколінного сегмента. Чоловіків було 8, жінок — 1. Вік хворих у середньому 42,5 року.

Обстеження хворих до операції включало доплерографію артерій, рентгеноконтрастну ангіографію, лазерну флуометрію мікроциркуляторного русла. В усіх хворих констатовано неможливість виконання реконструктивних оперативних втручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні м'язової тканини ішемізованої кінцівки до введення МСК, виділених з жирової тканини, в м'язових симпластах виявляли виражені мозаїчні зміни: вогнища

пошкодження, фіброзні структури, порушення архітекτονіки навколо деструктивно і дистрофічно змінених симпластів, судинні "пучки", в яких судини утворюють клубочки або розташовані окремо. Ці судини оточені фіброзними, колагеновими волокнами, їх просвіт звужений або вони оклюзовані, тобто, спостерігали початкове формування сполучнотканинного рубця з невеликою кількістю м'язових волокон, спотворення регенераторних процесів з переважанням деструкції над регенерацією м'янів.

В пухкій сполучній тканині перимізію найчастіше виявляли фібробласти, деякі з них дегенеровані й зруйновані. Оновлення популяції фібробластів, клітин ендотелію і проміжних структур пухкої сполучної тканини спостерігали рідко. Постійна перебудова пухкої сполучної тканини не виражена.

Мезенхімоподібні клітини переважно розташовані в периваскулярних зонах. Там же виявляли перицити — це особлива лінія розвитку периваскулярних клітин, сполучнотканинні відростчасті клітини, розташовані в розщепленнях базальної мембрани ендотелію судин мікроциркуляторного русла. Такі зони пухкої сполучної тканини перимізію, ймовірно, є "мезенхімальним резервом" материнського ложа.

За даними гістологічних досліджень виявляли невеликі ділянки збережених міосимпластів, в яких окремі м'язові волокна гіпертрофовані, тобто, ділянки компенсаторних реакцій, проте, в перимізію формувалися зони фіброзу.

За результатами імуногістохімічного дослідження експресія віментину в ділянках судинних пучків перимізію — і ендомізію нерівномірна (рис. 1).

Експресія фактору Віллебранда, що є маркером ангіогенезу, в цій групі не виявлена (рис. 2).

При гістологічному дослідженні м'язової тканини через 3 міс після трансплантації клітин в більшості спостережень виявлене переважання ділянок міосимпластів у супроводі новоутворених судин, розташованих у перимізію (рис. 3). Структура

симпластів на великій відстані не порушена.

Найбільш виражені скупчення клітин розташовані навколо новоутворених капілярів. На окремих ділянках спостерігали виражений поліморфізм клітин. В зоні проліфе-

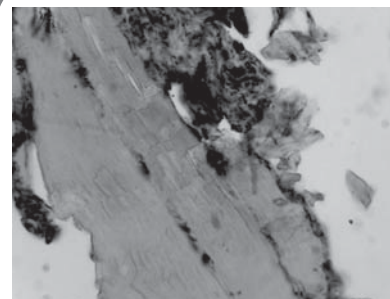


Рис. 1.
Мікрофото.
Міосимпласт. Експресія мезенхімального фактору віментину в судинних пучках перимізію з порушенням їх архітекτονіки. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням гематоксилином Маєра. 36. x 200.

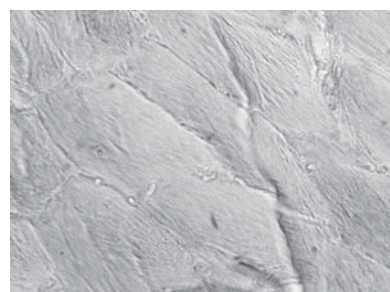


Рис. 2.
Експресія фактору Віллебранда до трансплантації клітин. 36. x 200.

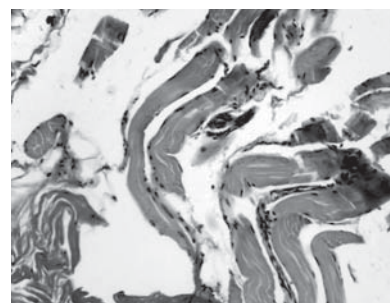


Рис. 3.
Мікрофото.
Міосимпласт з ділянками новоутворених капілярів через 3 міс після трансплантації. Забарвлення пікрофуксином за ван-Гізона. 36. x 400.

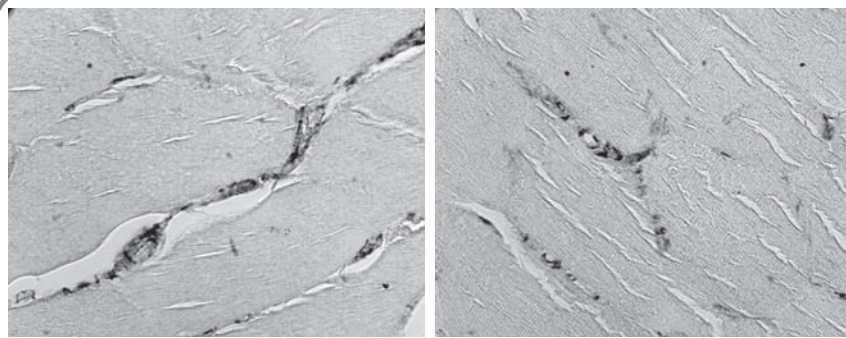


Рис. 4.
Значно виражена експресія фактору Віллебранда у сформованих судинах через 3 міс після трансплантації.
Зб. х 200.

рації містилися численні недиференційовані та малодиференційовані клітини, кровonosні судини. Молода сполучна тканина з добре вираженою мережею судин, артеріоли і венули розташовані поруч, впорядковано, орієнтовані переважно паралельно колагеновим волокнам, мають спрямований хід. У багатьох спостереженнях виявлені мікрозони, "насичені" ліпідними компонентами в проміжній, перимізіальній тканині.

Клітинна інфільтрація в ділянках активної проліферації мезенхімоподібних клітин нечітко виражена. Судини ростуть відносно рівним фронтом в зонах, що мають волокнистий каркас з однотипних волокон, і сповільнюється перед більш крупними пучками.

У цих ділянках клітинну інфільтрацію відзначали у прошарках пухкої сполучної тканини між пучками колагенових волокон. Інфільтрати утворені поліморфноядерними лейкоцитами, макрофагами, фібробластами.

За даними імуногістохімічних досліджень, експресія віментину та колагену IV типу виявлена в більшості спостережень у вигляді окремих мікрозон в ділянках формування новоутворених судин, в окремих клітинних структурах пери— і ендомізію.

Найбільш виражена в ці строки саме експресія фактору Віллебранда у вигляді виражених кровonosних капілярів та мікросудин (рис. 4) — в перимізію, міосимпластів та мікрозон — в ендомізію.

В усіх хворих досягнуті позитивні клінічні результати. За даними інструментальних досліджень, виявлене незначне підвищення сегментарного тиску на ішемізованій кінцівці. Результати лазерної флуориметрії свідчили про покращання мікроциркуляції в дистальних відділах кінцівки вже через 1 міс після клітинної трансплантації, збільшення показників мікроциркуляції у середньому на 10 — 15% у порівнянні з такими до трансплантації.

ВИСНОВКИ

1. Трансплантація МСК, виділених з жирової тканини, хворим при хронічній ішемії кінцівок сприяла активації регенераторних процесів з утворенням молодих міонів та зменшенням фіброзно—дистрофічних змін м'язової тканини.

2. Результати імуногістохімічних досліджень підтверджують активацію процесів ангіогенезу через 3 міс після трансплантації, про що свідчить експресія фактору Віллебранда в ділянках перимізію, експресія віментину та колагену IV типу в ділянках новоутворених судинних пучків.

3. Трансплантація МСК, виділених з жирової тканини, в зону ішемії пацієнтам при облітеруючих захворюваннях артерій кінцівок може бути застосована як ефективний метод непрямой реваскуляризації кінцівки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андожская Ю. С. Современные методы оценки микроциркуляции в эфферентной терапии при лечении больных с атеросклерозом / Ю. С. Андожская, М. Б. Гирина, Е. Ю. Васина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2002. — Т. 1, № 21. — С. 52 — 59.
2. Dulak J. Angiogenic gene therapy with vascular endothelial growth factor — hope or hype? / J. Dulak, A. Jozkowicz // Acta Chir. Austr. — 2002. — Vol. 34, N 2. — P. 101 — 104.
3. Репин В. С. Эмбриональная стволовая клетка: от фундаментальных исследований в клинику / В. С. Репин // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 2001. — № 2. — С. 3 — 8.
4. Кордюм В. А. Стволовые клетки и их терапевтический потенциал / В. А. Кордюм, Е. Г. Дерябина // Мистецтво лікування. — 2004. — № 2. — С. 7 — 9.
5. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation / R. Nizankowski, T. Petriczek, A. Skotnicki, A. Szczeklik // Kardiolog. Pol. — 2005. — Vol. 63, N 4. — P. 351 — 360.
6. Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation / A. Kawamura, T. Horie, I. Tsuda [et al.] // Ther. Apher. Dial. — 2005. — Vol. 9, N 1. — P. 59 — 63.
7. Transdifferentiation of blood—derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes / C. Badorff, R. P. Brandes, R. Popp [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 107. — P. 1024 — 1031.

