

Р. В. Салютін

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

ВПРОВАДЖЕННЯ МЕТОДУ КЛІТИННОЇ НЕПРЯМОЇ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ В ЛІКУВАННІ ХВОРИХ З НЕОПЕРАБЕЛЬНИМ УРАЖЕННЯМ СУДИН НИЖНІХ КІНЦІВОК

Проблема лікування хворих з нереконструктабельним ураженням периферичного артеріального русла є актуальною та до кінця невирішеною. Результати проведеного експериментального дослідження зі змодельованою ішемією кінцівки, довели доцільність та ефективність застосування методу клітинної непрямой реваскуляризації з використанням прогеніторних клітин фетальної печінки з метою активації регенераторно-відновних процесів та ангиогенезу.

Мета дослідження: виявлення доцільності впровадження методу «непрямой» клітинної реваскуляризації на підставі дослідження гістологічних та імуногістохімічних процесів в м'язовій тканині у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок.

Результати: на підставі комплексних досліджень доведено, що введення прогеніторних клітин фетальної печінки людини призводить до зменшення ішемічного ушкодження міофібрил, швидкої активації регенераторних сил м'язу. Підтверджено стимуляцію ангиогенезу, у вигляді утворення неокапілярів, через 3 та 6 місяців після клітинної реваскуляризації.

Ключові слова: хронічна ішемія, непрямая реваскуляризація, прогеніторні клітини, фетальна печінка.

В умовах ураження дистального артеріального русла та мікроангіопатії, а також при не ефективності раніше виконаної «прямой» реваскуляризації або відсутності показів до її виконання важливого значення набуває впровадження методів непрямой реваскуляризації [1, 2].

Одним з напрямків сучасних досліджень є використання клітинних технологій з метою активації процесів ангиогенезу на рівні колатеральної артеріальної сітки, зокрема за допомогою стромальних аутологічних стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини [3, 4]. Однак широке клінічне застосування клітин кісткового мозку та жирової тканини обмежено певними технологічними проблемами та низьким потенціалом трансдиференціювання дорослих (adult) мезенхімальних клітин [5]. Прогеніторні клітини фетальної печінки людини 6–8 тижнів гестації експресують CD 34+, CD 38-, CD 45Ralow, CD 71low, що свідчить про високий потенціал трансдиференціювання до ангиобластів та ендотеліоцитів – основної складової капіляру, обумовлюючи значну потенцію до стимуляції процесів ангиогенезу ніж аутоклітини кісткового мозку або жирової тканини [6], та має підтвердження результатами експериментального дослідження проведеного на щурах.

Таким чином, впровадження методу «непрямой» реваскуляризації із застосуванням прогеніторних клітин фетальної печінки людини з метою стимуляції ангиогенезу за умов ішемії має теоретичне та експериментальне підґрунтя, та є досить

перспективним напрямком науково-практичних розробок.

Мета роботи: впровадження методу «непрямой» клітинної реваскуляризації, дослідження гістологічних та імуногістохімічних процесів в м'язовій тканині у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок.

Матеріали та методи

Клінічне дослідження проводилось у відділі мікросудинної та пластичної хірургії Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова.

Хронічна ішемія ПБ–IV ступеню обумовлена облітеруючим атеросклерозом (17 пацієнтів) або ендартеріїтом (4 пацієнта). Середній вік хворих складав 53,5 роки. У всіх пацієнтів було констатовано неможливість виконання реконструктивних оперативних втручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки.

Прогеніторні клітини фетальної печінки людини 6–8 тижнів гестації з фенотипом CD 34+, CD 38-, CD 45Ralow, CD 71low (кількість КУО-ГМ 140.0x103), отримували згідно договору з біотехнологічною лабораторією ТОВ «Інститут клітинної терапії». Клітинну трансплантацію виконували вводючи клітини локально (вздовж облітерованих судин) та системно (внутрішньовенно).

В якості підтвердження ефективності застосування прогеніторних клітин фетальної печінки використано визначення індексу якості життя

(визначали за W. O. Spitzer) та дистанції ходьби (за Walking Impairment Questionnaire).

Також алгоритм дослідження включав визначення стану мікроциркуляторного русла за допомогою лазерної доплерівської флуометрії. Окрім того, у хворих до та на 1–6–12 місяць після введення клітин, під місцевим знеболенням вилучали та досліджували за допомогою імуногістохімічного та електронно-мікроскопічного методів біоптати м'язової тканини з передньогомілкової та задньомедіальної групи м'язів.

Результати та їх обговорення

У результаті впровадження методу клітинної непрямой ревазуляризації, через 1–3 місяці після операції зафіксовано зменшення ступеню ішемії за Покровським-Фонтейном у 88,2% пацієнтів. Чотири пацієнти з IV ступенем перейшли до III ступеню, а у чотирьох пацієнтів характер клінічних проявів через 3 місяці після операції відповідав II A ступеню ішемії.

Індекс якості життя в дослідній групі пацієнтів до лікування складав ($4,12 \pm 0,13$) бали, відповідає середньому показнику у хворих, яким проводилась консервативна терапія. Однак вже на 3-й місяць після ведення клітинного аспірату вище наведений показник перевищував індекс життя хворих, яким проводили курс консервативної терапії в 1,12 рази, а на 12-й місяць індекс якості життя перевищував аналогічний показник контрольної групи в 1,5 рази.

Дистанція без больової ходьби та швидкість руху у пацієнтів дослідної групи також поступово зростала, відрізняючись від аналогічного показника контрольної групи на 6 міс спостереження в 1,1 рази, а на 12 міс в 1,4 рази (складаючи $29,5 \pm 1,02$ бала).

Вже наприкінці першого місяця після клітинної «непрямой» ревазуляризації засвідчено покращення мікроциркуляторних показників

та впродовж року після операції відмічено стійку тенденцію до подальшої нормалізації стану мікроциркуляторного русла.

За результатами гістологічного дослідження, м'язова тканина у хворих з хронічною ішемією кінцівок характеризувалась наявністю виражених мозаїчних змін, а саме вогнищ деструктивних міосимпастів, які оточувались фіброзними структурами (рис. 1).

Результати імуногістохімічного аналізу свідчили про відсутність експресії фактору Віллебранда, що є первинним маркером ангиогенезу, а експресія колагену IV типу спостерігалась лише в зруйнованій базальній мембрані судин. Тобто, ішемічне ураження призводило до пригнічення процесів фізіологічного ангиогенезу та руйнації базальної мембрани ендотеліоцитів капілярів.

Результати гістологічного дослідження біоптатів м'язової тканини отриманих на 3 місяць після клітинної ревазуляризації свідчили про позитивні зміни структури міосимпасту. В м'язових волокнах з'являлись вогнища поперечної счерченості, в міосимпасті переважали ділянки без ознак дистрофії та набряку та значно збільшувалась кількість новоутворених капілярів та зон регенерації.

Активне утворення неокіплярів (на 50–70% більше ніж в попередній термін дослідження) супроводжувалось значно вираженою експресією фактору Віллебранда. Активну фазу ангиогенезу підтверджувала виражена експресія колагену IV в базальних мембранах новоутворених капілярів та експресія мезенхімального фактору віментин, що була вираженою переважно в судинних пучках та ангиогенних ділянках.

На 6 місяць після клітинної трансплантації відмічено нормалізацію структури міосимпасту – появу поперечної счерченості м'язових волокон та зменшення ознак їх дистрофії. В отриманих зразках фіксували наявність багаточисленних судинних пучків що мали фізіологічну структуру (рис. 2.).

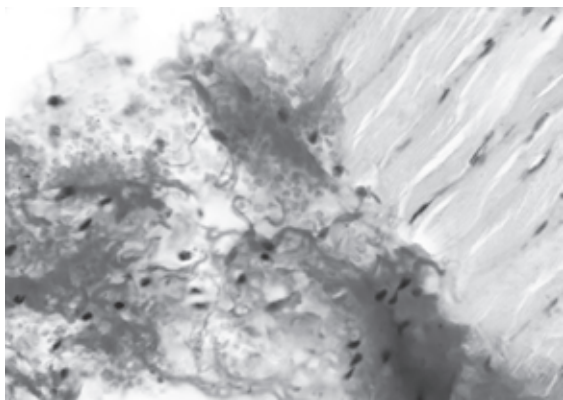


Рис. 1. Ішемізована м'язова тканина. Ділянки склерозу та фуксифілії нерівномірно розташовані в міопласті. Забарвлення пікрофуксином по Ван-Гізон. Мікрофотографія. Ок.10; Об.10

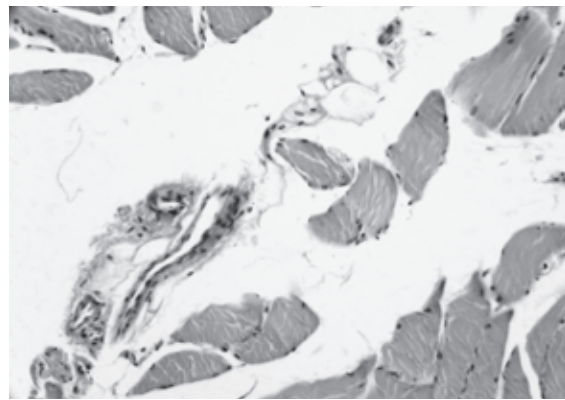


Рис. 2. Шостий місяць після клітинної трансплантації. Міосимпаст з незначними ознаками дистрофії та судинними пучками, що мають фізіологічну структуру. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофото. Ок. 10; Об.20

Результати імуногістохімічного аналізу свідчили про триваючу активність процесів регенерації та ангиогенезу. Фіксували наявність значно вираженої експресії фактору Вільбранда та мезенхімального фактору віментин, особливо в ділянках ендомізію та міосимпласту. Та посилення експресії колагену IV типу в стінці новоутворених капілярів.

Висновки

1. Застосування методу клітинної непрямой ревазуляризації у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок призводить до зменшення проявів ішемічного ураження, збільшення дистанції безбольової ходи та покращення показників мікроциркуляції.

2. Введення прогениторних клітин фетальної печінки людини активізує регенераторні процеси, про що свідчить утворення молодих міонів та зменшення фібро-дистрофічних змін

м'язової тканини.

3. Імуногістохімічні тести вказують на активацію в після трансплантаційному періоді процесів ангиогенезу, про що свідчить експресія фактору Вільбранда в вогнищах перимізію та ендомізію, експресія мезенхімального фактору віментин та колагену IV типу в ділянках новоутворених судинних пучків.

3. Метод клітинної непрямой ревазуляризації з використанням прогениторних клітин фетальної печінки є перспективним та ефективним. Може бути впроваджений в комплексному лікуванні хворих з хронічною ішемією кінцівок.

Перспектива подальших досліджень: отримані позитивні результати дослідження обґрунтовують перспективність клінічного використання стовбурових клітин фетального походження та обумовлюють доцільність впровадження клітинної непрямой ревазуляризації в лікуванні хворих з «нереконструктабельним» ураженням судинного русла.

Список літератури

1. Никоненко А. С., Губка А. В., Перцов В. И. и др. Выбор метода реконструктивной операции при дистальной окклюзии артерий нижних конечностей // Клин. хирургия. – 2005. – № 4–5. – С. 57–59.
2. Косенков А. Н., Черепанин А. И., Удовиченко С. В. Хроническая критическая ишемия нижних конечностей и сахарный диабет у лиц пожилого и старческого возраста // Клин. геронтология. – 2007. – № 5. – С. 34–38.
3. Русин В. І., Корсак В. В., Попович Я. М. Хірургічне лікування дистальних форм атеросклеротичного ураження артерій нижніх кінцівок // Практична медицина. – 2008. – Т. 14, № 5. – С. 210–213.
4. Lachmann N., Nikol S. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery disease: stem cell therapy // Vasa. – 2007. – vol. 36, № 4. – P. 241–251
5. Delp M.D., Collieran P.N., Wilkerson M.K., McCurdy M.R. Structural and functional remodeling of skeletal muscle microvasculature is induced by simulated microgravity // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 5 № 4 – P. 278–299.
6. Григорян А. С. Выделение мультипотентных прогениторных клеток из фетальной печени человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; Том I (4):18–19

Стаття надійшла до редакції: 17.01.2014 р.

Р. В. Салютин

Координационный центр трансплантации органов, тканей и клеток МОЗ Украины

ВНЕДРЕНИЕ МЕТОДА КЛЕТОЧНОЙ НЕПРЯМОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С НЕОПЕРАБЕЛЬНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ СОСУДОВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Проблема лечения больных с нереконструктабельным повреждением периферического артериального русла является актуальной и до конца не решенной. Результаты проведенного экспериментального исследования с моделированной ишемией конечности обосновали целесообразность и эффективность применения метода клеточной непрямой ревазуляризации с использованием прогениторных клеток фетальной печени с целью активации регенераторно-восстановительных процессов и ангиогенеза.

Цель исследования: выявление целесообразности применения метода «непрямой» клеточной ревазуляризации на основании исследования гистологических и иммуногистохимических процессов в мышечной ткани у больных хронической ишемией нижних конечностей.

Результаты: на основании комплексных исследований обосновано, что введение прогениторных клеток фетальной печени человека приводит к уменьшению ишемического повреждения миофи-

брилл, быстрой активации регенераторных сил мышцы. Подтверждена стимуляция ангиогенеза в виде создания неокapилляров через 3 и 6 месяцев после клеточной реваcкyляризации.

Ключевые слова: хроническая ишемия, непрямая реваcкyляризация, прогениторные клетки, фетальная печень.

R. V. Salyutin

Coordination Center transplantation of organs, tissues and cells Ministry of Health of Ukraine

IMPLEMENTATION METHOD OF CELL INDIRECT REVASCULARIZATIONS IN PATIENTS WITH UNRESECTABLE DAMAGED VESSELS OF LOWER LIMB

The problem of treatment patients with inoperable damage to the peripheral arterial bed is relevant and not fully resolved. The results of the pilot study simulated limb ischemia brought the feasibility and effectiveness of the method of cell indirect revascularization with using fetal liver progenitor cells to activate the regenerative-reduction processes and angiogenesis.

The purpose: to identify the appropriateness of “indirect” cell revascularization method, histological and immunochemical study processes in muscle tissue in patients with chronic lower limb ischemia.

Results: based on comprehensive research informed that the introduction of human fetal liver progenitor cells reduces ischemic damage myofibrils, rapid activation of the regenerative forces muscles. Confirmed as a stimulation of angiogenesis by creating new capillaries, after 3 and 6 months after cell revascularization.

Keywords: chronic ischemia, indirect revascularization, progenitor cells, fetal liver.