

УДК 616-005.4-092.4:611.73:57.083

© Поляченко Ю.В., Дрюк М.Ф., Домбровський Д.Б., 2010

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ, ЯК МЕТОД КЛІТИННОЇ СТИМУЛЯЦІЇ АНГІОГЕНЕЗУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ІШЕМІЮ КІНЦІВОК

Поляченко Ю.В., Дрюк М.Ф., Домбровський Д.Б.

Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова АМН України

Поляченко Ю.В., Дрюк М.Ф., Домбровський Д.Б. Трансплантація мультипотентних стромальних клітин жирової тканини, як метод клітинної стимуляції ангиогенезу у хворих на хронічну ішемію кінцівок // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 152-155.

Питання застосування клітинних технологій з метою стимуляції процесів ангиогенезу за умов ішемії на сьогоднішньому етапі розвитку науки досить актуально, тому тривають пошуки нових джерел клітин-стимуляторів неоваскулогенезу. Проведені експериментальні дослідження на щурах із моделюванням ішемії кінцівки в рамках доклінічних досліджень, які показали доцільність застосування стромальних клітин, що виділені з жирової тканини за умов ішемії кінцівки. Метою роботи було дослідити гістологічні та імуногістохімічні зміни в м'язовій тканині після трансплантації мультипотентних стромальних клітин власної жирової тканини у хворих за умов ішемії кінцівки. Проведені гістологічні та імуногістохімічні дослідження (визначення експресії антитіл до фактору Віллебранда, колагену IV типу та виментину) процесів, що відбуваються в м'язовій тканині після введення мультипотентних стромальних клітин власної жирової тканини хворого. Показано зниження ішемічного ушкодження міофібрил, швидку активацію регенераторних сил м'язу. Імуногістохімічно виявлено чітку стимуляцію процесів ангиогенезу через 3 місяці після трансплантації клітин.

Ключові слова: хронічна ішемія, непряма реваскуляризація, жирова тканина.

Поляченко Ю.В., Дрюк Н.Ф., Домбровський Д.Б. Трансплантация мультипотентных стромальных клеток жировой ткани, как метод клеточной стимуляции ангиогенеза у больных хронической ишемией конечностей // Украинский морфологический альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 152-155.

Вопрос применения клеточных технологий с целью стимуляции процессов ангиогенеза на фоне ишемии на сегодняшний день достаточно актуален, поэтому продолжают поиски новых источников клеток-стимуляторов неоваскулогенеза. Проведены экспериментальные исследования на крысах с моделированием ишемии конечности в рамках доклинических исследований, которые показали целесообразность применения стромальных клеток, выделенных из жировой ткани, при ишемии конечности. Целью работы было исследовать гистологические и иммуногистохимические изменения в мышечной ткани после трансплантации мультипотентных стромальных клеток собственной жировой ткани у больных при ишемии конечности. Проведены гистологические и иммуногистохимические исследования (определение экспрессии антител к фактору Виллебранда, коллагену IV типа и виментину) процессов, происходящих в мышечной ткани после введения мультипотентных стромальных клеток собственной жировой ткани больного. Показано снижение ишемического повреждения миофибрил, быстрая активация регенераторных сил мышцы. Иммуногистохимически показана четкая стимуляция процессов ангиогенеза в через 3 месяца после трансплантации клеток.

Ключевые слова: хроническая ишемия, непряная реваскуляризация, жировая ткань.

Polyachenko U.V., Dryuk M.F., Dombrovsky D.B. Transplantation of multipotents stromal cells of fatty tissue, as a method of cellular stimulation of angiogenesis for patients with the chronic ischemia of extremities // Украинский морфологический альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 152-155.

The question of application of cellular technologies with the purpose of stimulation of processes of angiogenesis on a background an ischemia on the today's stage of development of science is actual enough, the searches of new sources of cells-stimulator of neovasculogenesis proceed therefore. Experimental researches are conducted on rats with the design of ischemia of extremity within the framework of beforclinics researches, which roined expedience of application of stromal cells, abstracted from fatty tissue, at the ischemia of extremity. The purpose of work was to investigate histological and immunohistochemical changes in muscular tissue after transplantation of multipotents stromal cells of own fatty tissue for patients at the ischemia of extremity. Histological and immunohistochemical researches (determination of expression of antibodies to the factor of Villebranda, collagen IV to the type and vimentin) of processes, what be going on in muscular tissue after introduction of multipotents stromal cells of own fatty tissue of patient are conducted. The decline of ischemic damage of patient of myofibril, rapid activating of regenerator myodynamias, is roined. Immunohistochemical is roined clear stimulation of processes of angiogenesis in a flow at 3 month after transplantation of cells.

Key words: chronic ischemia, indirect revascularization, fatty tissue.

Вступ. Лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок при оклюзійних та облітеруючих ушкодженнях судин залишається однією із складних проблем сучасної хірургії. Незадоволення хірургів існуючими методами лікування хронічної ішемії кінцівок змусило шукати нові методи лікування хворих з даною нозологією. Розвиток біотехнології, молекулярної і клітинної біології, в останні роки, зробило клітину засобом лікування багатьох захворювань [1] в тому числі лікування хронічних ішемічних станів [2, 3] і у поєднанні із шунтуючими операціями [4]. Майбутнє клітинної терапії і трансплантології пов'язано із використанням стовбурових клітин, які застосовуються з метою заміщення структурної і функціональної недостатності різних органів [5].

Переваги використання аутологічних стовбурових клітин для трансплантаційної медицини очевидні:

необмежена доступність, короткий час очікування результатів і відсутність імуносупресивної терапії з її негативними побічними ефектами [6]. В даний час опубліковані повідомлення про клінічне використання стовбурових клітин, виділених з пуповини, що є етично прийнятним і перспективним. Розробляються інші альтернативні шляхи одержання стовбурових клітин людини, які використовують як джерело гемопоетичних стовбурових клітин, і для відновлення кровоплини в ішемізованих органах і тканинах [7-9].

Мезенхімальні стромальні клітини, що отримуються при ферментативній обробці жирової тканини, володіють схожими з поліпотентними мезенхімальними стромальними клітинами кісткового мозку здатністю диференціюватися в клітини як мезенхімального, так і немезенхімального походження. За допомогою підбору спеціальних середовищ і умов

культування вдається диференціювати ендотеліальні клітини в гладком'язові, попередники ендотеліальних клітин - в кардіоміоцити [10]. Стромальні клітини жирової тканини представляють популяцію клітин, що володіють високою мірою пластичності, високою інтенсивністю проліферації, високим потенціалом диференціації і легко піддаються трансфекції. При чималому вмісті даного типу клітин в жировій тканині, відносній безпеці і низькій травматичності їх отримання ці клітини є перспективними кандидатами для аутологічної трансплантації.

Нами проведені експериментальні дослідження на щурах по вивченню впливу стромально-васкулярної фракції на експериментальну ішемію кінцівок. Робота проводилась в межах етапу доклінічного дослідження з оформленням протоколу доклінічного дослідження згідно з наказом МОЗ України від 10.10.2007 року, №630 "Про затвердження порядку проведення клінічних випробувань тканинних та клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань". Доклінічні дослідження підтвердили значну активацію процесів ангиогенезу, та суттєве зменшення ішемічного впливу в умовах експериментальної ішемії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана згідно із планом науково-дослідних робіт Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О.О.Шалімова АМН України і є фрагментом науково-дослідної роботи: ІН.14.01.03.19.09 "Клініко-експериментальне обґрунтування і розробка методів стимуляції ангиогенезу і репаративних процесів аутологічними і ембріональними клітинними культурами" (номер держреєстрації 0108U011015).

Метою нашої роботи було визначити гістологічні та імуногістохімічні зміни, що відбуваються в м'язах ішемізованої кінцівки хворих на облітеруючі захворювання артерій кінцівок після трансплантації мультипотентних стромальних клітин власної жирової тканини.

Матеріали та методи. Розроблена технологія проведення трансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини хворим на хронічну ішемію кінцівок, яка включає в себе на першому етапі отримання жирової тканини шляхом ліпоаспірації. Консервована жирова тканина транспортувалась в Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), де на кафедрі біохімії (зав. кафедрою професор Петренко А.Ю.) проводилось виділення стромально-васкулярної фракції жирової тканини. Частина з отриманих клітин у відповідних умовах транспортували для введення хворому. Отримані клітини стромально-васкулярної фракції вводили внутрішньом'язово в кінцівку (сегмент гоміла-стопа). Інша частина отриманих клітин залишалась для подальшого культивування та експансії на питоному середовищі. Через 2-3 тижні, після 3 пасажу клітини знімали з питоного середовища та транспортували для повторної пересадки хворому в ішемізовану кінцівку. Перед трансплантацією та через 3 місяці після першої трансплантації отримували біопсійний матеріал м'язів ішемізованої кінцівки для наступного проведення гістологічних та імуногістохімічних досліджень.

При проведенні дослідження застосовували загальногістологічний метод, який проводили за стандартною схемою. Тканини готували за загальноприйнятою методикою. Після фіксації в формаліні і спиртах матеріал обробляли в парафіновій заливці, зрізи фарбували гематоксилін-еозином та пікрофуксинном по Ван-Гізон.

При проведенні імуногістохімічних досліджень застосовували непрямий стрептавидін-пероксидазний метод виявлення рівня експресії антигенів вімєнтину, фактору Віллебранда та колагену IV типу. Протокол забарвлення: депарафінізація шматочків тканини на скло, промивають дистильованою водою, демаскують протеїназою К, блокують пероксидазним блоком, промивають в PBS-буфері, наносять Ультра блок, знову промивають в PBS-буфері, наносять первинні антитіла до відповідного антигену на одну годину, промивають в PBS - буфері, наносять посилювач первинних антитіл і потім вторинні антитіла. Промивка в PBS-буфері наносять АЕС - хромоген розчин на 10 хвилини, промивають дистильованою водою і красять метиленовим зеленим.

Методика трансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини застосована у 7 пацієнтів з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок, у хворих на облітеруючий ендартеріїт (3 пацієнтів), облітеруючий атеросклероз (2) та постемболічну оклюзію (2) артерій в стегнево-підколінному сегменті. Чоловіків було 6, жінок - 1. Середній вік хворих склав 42,5 роки. Обстеження хворих до операції включало доплерографію артерій рентгенконтрастну ангиографію, лазерну флуометрію мікроциркуляторного русла. У всіх хворих було констатовано неможливість виконання реконструктивних оперативних втручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки. Трансплантацію клітин проводили внутрішньом'язово у зону ішемії в ділянках оклюзованих артерій.

Результати та їх обговорення. При дослідженні м'язової тканини ішемізованої кінцівки до введення мультипотентних стромальних клітин жирової тканини, в м'язових симпластах мають місце виражені зміни мозаїчного характеру: вогнища пошкоджень з наявністю фіброзних структур з порушенням архітекtonіки оточують деструктивні і дистрофічні симпласти (рис. 1), або судинні "пучки", судини в яких утворюють клубочки або розташовуються окремо. Вище зазначені судини оточені фіброзними, колагеновими волокнами, просвіт судин в цих утвореннях звужений або закритий, тобто спостерігається початкове формування сполучнотканинних вогнищ рубця з невеликою кількістю м'язових волокон, що вказує на спотворення регенераторних процесів з переважанням деструкції над регенерацією м'яких.

У рихлій сполучній тканині перимізію найчастіше виявляються фіброласти, частина яких дегенерує і руйнується. Оновлення популяції фіброластів, клітин ендотелію і проміжних структур рихлої сполучної тканини спостерігається рідко. Постійна перебування рихлої сполучної тканини не виражена.

Мезенхімоподібні клітини переважно розташовуються в периваскулярних зонах. Таку периваскулярну локалізацію займають також періцити. Останні складають особливу лінію розвитку периваскулярних клітин і вони були сполучнотканинними відростачами клітинами, що розташовані в розщеплюючих базальній мембрані ендотелію судин мікроциркуляторного русла. Такі зони рихлої сполучної тканини перимізія, мабуть, є "мезенхімальним резервом" материнського ложа.

Гістологічно в досліджуваних тканинах на цьому етапі спостережень також мають місце невеликі вогнища зі "збереженими" міосимпластами, в яких окремі м'язові волокна гіпертрофовані, тобто виявляються вогнища з наявністю компенсаторних реакцій (рис. 2), проте в перимізії формуються фіброзні вогнища.

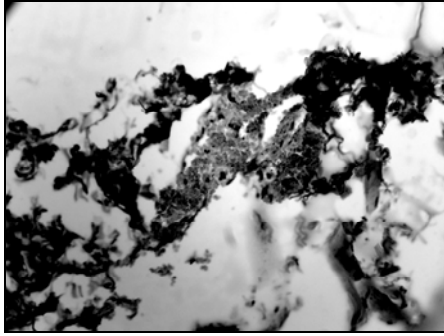


Рис. 1. Фіброзна тканина, що оточена дістрофічно змінним симпластом. Забарвлення пікрофуксином по Ван-Гізон. Мікрофотографія. Ок.10; Об.10.

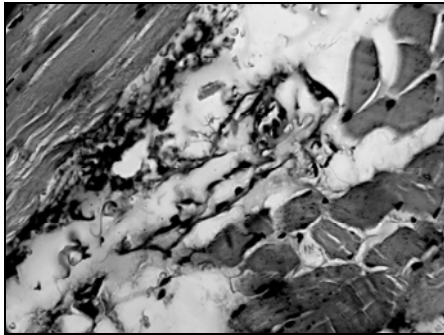


Рис. 2. Вогнища гіпертрофії міонів, периваскулярний набряк, формування фіброзних вогнищ. Забарвлення пікрофуксином по Ван-Гізон. Мікрофотографія. Ок.10; Об.20.

При імуногістохімічному дослідженні експресія віментину у вогнищах судинних пучків пери- і ендомізії нерівномірна (рис. 3).

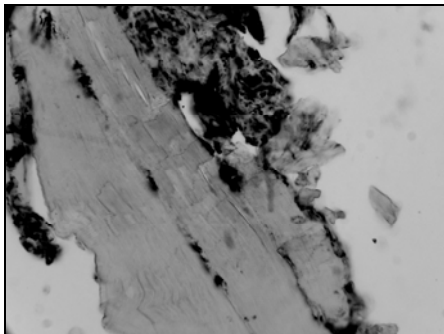


Рис. 3. Міосимпласт. Експресія мезенхімального фактору віментину в судинних пучках перимізії з порушенням їх архітекtonіки. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням гематоксиліном Масра. Мікрофотографія. Ок. 10; Об. 20.

Імуногістохімічне визначення експресії фактору Віллебранда, що є маркером ангиогенезу в цій групі виявило відсутність експресії даного фактору (рис. 4).

Гістологічно при дослідженні м'язової тканини через 3 місяці після проведення трансплантації клітин в більшості випадків має місце переважання ділянок міосимпластів у супроводі новоутворених судин, що знаходяться в перимізії (рис. 5), структура симпластів протягом великої відстані не порушена.

Клітинна інфільтрація в місцях активної проліферації мезенхімоподібних клітин не яскраво виражена. Ріст судин йде відносно рівним фронтом в зонах, що мають волокнистий каркас з однотипних волокон, і сповільнюється при зустрічі з крупнішими пучками.

У цих ділянках судинна і клітинна інфільтрація йде по прошарках рихлої сполучної тканини між

пучками колагенових волокон. Інфільтрат утворений поліморфноядерними лейкоцитами, макрофагами і фібробластами.

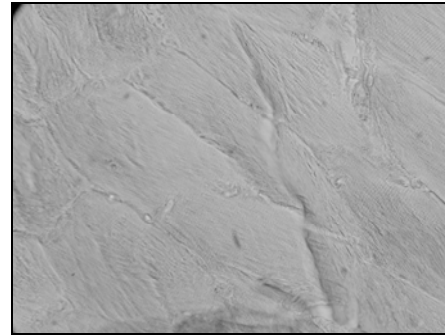


Рис. 4. Експресія фактору Віллебранда Ок. 10; Об. 20.

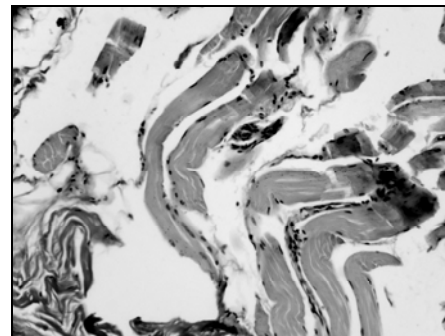


Рис. 5. Міосимпласт з вогнищами новоутворених капілярів. Забарвлення пікрофуксином по Ван-Гізон. Мікрофотографія. Ок. 10; Об.40.

Найбільш виражені скупчення клітин розташовуються в колі новоутворених капілярів. На окремих ділянках спостерігався яскраво виражений поліморфізм клітин. Зона проліферації характеризується безліччю недиференційованих і малодиференційованих клітин, кровоносних судин. Молода сполучна тканина має добре виражену судинну мережу, артеріоли і венули розташовані попарно, впорядковано, орієнтовані переважно паралельно ходу колагенових волокон, мають направлений хід. У багатьох спостереженнях виявляються мікровогнища, що "насичені" ліпідними компонентами в проміжній, перимізіальній тканині.

Імуногістохімічно експресія віментину (рис. 6) та колагену IV типу (рис. 7) виявлена в більшості спостережень у вигляді окремих мікровогнищ в ділянках формування новоутворених судин, в окремих клітинних структурах пери- і ендомізії.

Найбільш виражена в цей термін саме експресія фактору Віллебранда у вигляді виражених кровоносних капілярів та мікросудин (рис. 8) в перимізії міосимпластів та мікровогнища в ендомізії.

У всіх досліджуваних хворих отримані позитивні клінічні результати. При проведенні інструментальних досліджень мало місце збільшення сегментарного тиску на ішемізованій кінцівці в середньому на 15-20%. Дані лазерної флуометрії свідчили про покращання мікроциркуляції в дистальних відділах кінцівок вже через місяць після проведення клітинної трансплантації.

Висновки. 1. Трансплантація мультипотентних стромальних клітин жирової тканини у хворих на хронічну ішемію кінцівок призводить до активації регенераторних процесів з утворенням молодих міонів та зменшенням фібро-дистрофічних змін м'язової тканини.

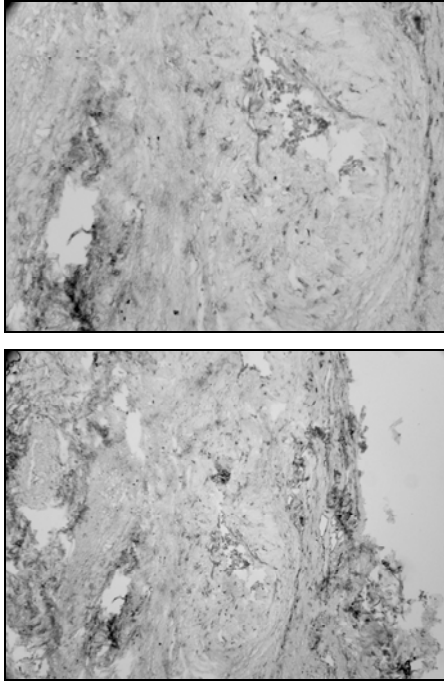


Рис. 6. Експресія мезенхімального фактору віментину в структурах пери- і ендомізія. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням гематоксиліном Масра. Ок. 10; Об. 20.

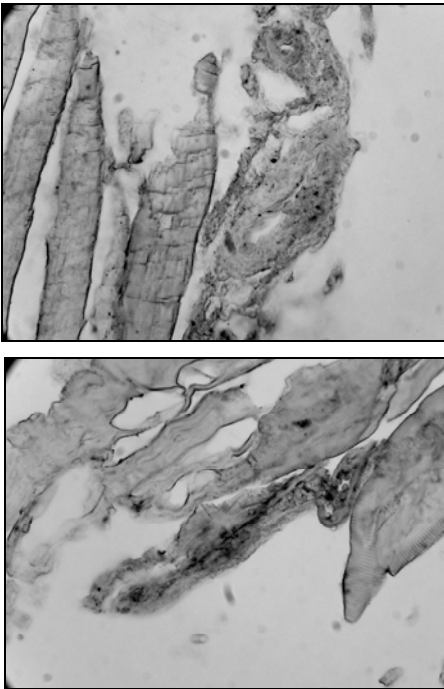


Рис. 7. Експресія колагену IV типу. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення колагену IV типу з дофарбовуванням гематоксиліном Масра. Ок. 10; Об. 20.

2. Імуногістохімічні дослідження підтверджують активацію через 3 місяці після трансплантації процесів ангиогенезу, про що свідчить експресія фактору Віллебранда в вогнищах перимізію, експресія віментину та колагену IV типу в ділянках новоутворених судинних пучків.

3. Трансплантація мультипотентних стромальних клітин жирової в зону ішемії у хворих із облітеруючими захворюваннями артерій кінцівок може

бути застосована як ефективний метод непрямой ре-васкуляризації кінцівки.

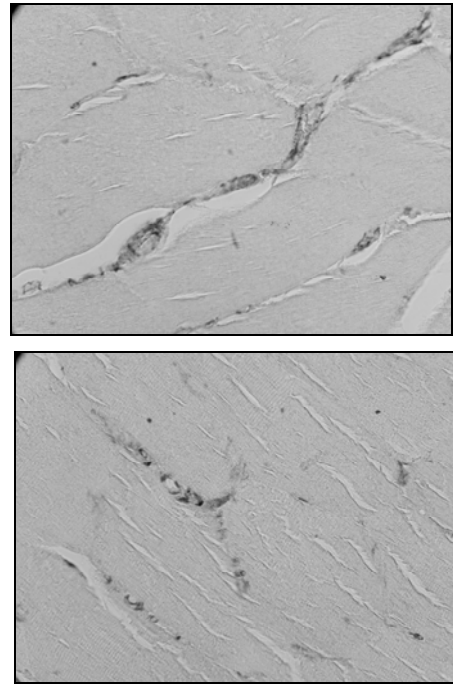


Рис. 8. Значно виражена експресія фактору Віллебранда у сформованих судинах через 3 місяці після трансплантації Ок. 10; Об. 20.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Андожская Ю. С., Гирина М. Б., Васина Е.Ю. Современные методы оценки микроциркуляции в эфферентной терапии при лечении больных с атеросклерозом // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2002. - Т. 1, №21. - С. 52-59.
2. Dulak J, Jozkowicz A. Angiogenic gene therapy with vascular endothelial growth factor - Hope or Hype? // European Surg. - Acta Chirurgica Austriaca. - 2002. - Vol. 34, №2. - P. 101-104.
3. Rissanen T, Yajanto I, Yla-Herttuala S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb - on the way to the clinic // European J. of Clinical Investigation. - 2001. - №31. - P. 651-658.
4. Diehm N, Pattynama P.M., Jaff M.R., Cremonesi A. Clinical endpoints in peripheral endovascular revascularization trials: a case for standardized definitions // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2008. – Vol. 36, №4. – P. 409-419.
5. Решин В.С. Эмбриональная стволовая клетка: от фундаментальных исследований в клинику // Патол. Физиол. и Эксп. Тер. - 2001. - №2. - С. 3-8.
6. Кордюм В.А., Дерябина Е.Г. Стволовые клетки и их терапевтический потенциал // Мистецтво лікування. - 2004. - №2. - С. 7-9.
7. Nizankowski R, Petriczek T, Skotnicki A, Szczeklik A. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation // Kardiol. Pol. – 2005. – Vol. 63, №4. – P. 351-360.
8. 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, №1. – P. 59-63.
9. Di Stefano R, Limbruno U, Barone D, Balbarini A. Therapeutic angiogenesis of critical lower limb ischemia. Review of the literature and prospects of research on stem cells // Ital. Heart. J. Suppl. – 2004. – Vol. 5, №1. – P. 1-13.
10. 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.