© В. К. Гринь, А. Г. Попандопуло, А. В. Оберемко, П. Л. Варшавер

УДК 576.3/.7.086.83:616.13:617.58

В. К. Гринь, А. Г. Попандопуло, А. В. Оберемко, П. Л. Варшавер

ВПЛИВ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН НА АНГІОГЕНЕЗ ЩУРІВ З ІШЕМІЄЮ НИЖНІХ КІНЦІВОК ПРИ РІЗНИХ СПОСОБАХ ВВЕДЕННЯ КЛІТИННОГО МАТЕРІАЛУ

ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В. К. Гусака НАМН України» (м. Донецьк)

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», № держ.реєстрації 0111U002051.

Вступ. Хронічні облітеруючі захворювання артерій нижніх кінцівок складають 2-3% від загальної чисельності населення [5], а експерти ВОЗ прогнозують, що найближчими роками очікується зростання цієї патології на 5-7 %. Основною метою сучасної тактики лікування хворих на хронічні оклюдуючі захворювання судин кінцівок є вирішення питання про можливість виконання оперативного втручання, спрямованого на відновлення кровопостачання ішемізованої кінцівки [1]. У випадку відсутності анатомічних можливостей або важкого супутнього стану хворого, коли немає можливості виконати реконструктивно–відновне оперативне втручання, для хворих залишається фактично єдиний метод лікування – консервативна терапія [4,6], а саме - використання медикаментозних препаратів, що не тільки не усуває наслідків основного захворювання, але й не є етіопатогенетичним лікуванням. Також реконструктивно–відновні втручання, які проводяться, не завжди призводять до відновлення кровотоку та покращення стану хворого, що в подальшому вимушує до виконання ампутації ураженої кінцівки [6].

Ідея клітинної трансплантації для лікування ішемії нижніх кінцівок на сьогодення є одним із найбільш перспективних напрямків терапії критичної ішемії при дистальному порушенні кровообігу. Вивчення цього питання у Західній Європі, США та Японії проводиться протягом 7-8 років, а в клініках тих же країн - протягом 3-4 років. В різних країнах в експерименті (перев`язка стегнової артерії) вивчались різні клітини-кандидати для неоангіогенезу - мононуклеари кісткового мозку [9,10], тромбоцити периферичної крові разом з мононуклеарами [7] та ін. Трансплантація клітинного матеріалу поліпшувала в експерименті показники колатерального кровообігу в ураженій кінцівці. Достатня експериментальна база дозволила перейти вище означеним дослідникам до клінічних випробувань, які почались з поодинокого застосування внутрішньом`язового введення різних клітинних матеріалів [9,10]. Але не визначено, яким чином діють клітини на неоангіогенез кінцівки. На даний час відсутні також 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 кісткового мозку на неоангіогенез нижніх кінцівок щурів за умов експериментальної хронічної ішемії нижніх кінцівок при різних способах введення клітинного матеріалу.

Об'єкт і методи дослідження. 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.

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини отримували з кісткового мозку. Виділенні клітини при маркуванні антитілами ("BD Biosciences Pharmingen", Сполучені штати Америки) мали фенотип: $CD105^+$, $CD73^+$, $CD90^+$ (> 95 % позитивних) і $CD45^-$, $CD34^-$, $CD79a^-$, $HLA\text{-}DR^-$ (< 2 % позитивних) та були здатні диференціюватись в остео-, адипо- та хондрогенному напрямку при спрямованій індукції *in vitro*. Культивування проводили за стандартною методикою [2].

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 артерии було підтверджено наявність хронічної ішемії кінцівки у всіх щурів. Клінічне підтвердження було основане на появі трофічних виразок на оперованих кінцівках та кульгавості у щруів. Інструментальне підтвердження було отримане шляхом порівняння графічних зображень, отриманих за допомогою лазерного доплеровського флоуметрування 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. Зазначені ознаки хронічної ішеміі, такі як набряк перимізію, вогнища некрозу міофіламентів та компенсаторний фіброз м'язів.

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 мезенхімальних стовбурових клітин, як джерела ангіогенезу. П'ята група – інтраваскулярне введення мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

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

Дослідження стану мікроциркуляції у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок проводилось за допомогою лазерної допплерівської флоуметрії.

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 досліджень та їх обговорення. Встановлено, що у тварин, яким була виконана трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку внутрішньом`язово та інтраваскулярно, показник мікроциркуляції на 1-й тиждень експерименту складав 1,01 ± 0,54 та 0,97 ± 0,61 перфузійних одиниць відповідно (**рис.**) і не відрізнявся від показника тварин, яким не надавалось лікування або вводився фізіологічний розчин чи аутокров. Починаючи з 2-го тижня, показник мікроциркуляції збільшувався і становив 2,03 ± 0,53 та 1,56 ± 0,45 перфузійних одиниць відповідно, вірогідно відрізняючись від показників I, II та III груп тварин в цей же термін дослідження ($p < 0,05$). Наприкінці дослідження показник тесту складав вже 9,4 ± 0,62 та 7,8 ± 0,51 перфузійних одиниць відповідно. Показники тесту у тварин IV та V груп були подібні та вірогідно відрізнялись між собою ($p < 0,001$) лише на 5-й тиждень експерименту.

Також мало місце незначне підвищення показника мікроциркуляції і в III групі тварин, яким була проведена трансплантація аутокрові на тлі ішемії кінцівки, проте, на відміну від тварин IV та V груп, він був нижчим, складаючи від 0,89 ± 0,65 до 4,83 ± 0,75 перфузійних одиниць, відмінності між III та IV, V групами вірогідні з 2-го тижня експерименту на рівні значущості $p < 0,05$.

Результати проведеного дослідження засвідчили про клінічне покращення кровотоку в ішемізованих кінцівках після як інтраваскулярного, так і внутрішньом`язового введення суспензії мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин порівняно з тими тваринами, яким не проводилась трансплантація клітин в ішемізовані тканини, та тими тваринами, яким внутрішньом`язово вводили фізіологічний розчин. Застосування мультипотентних

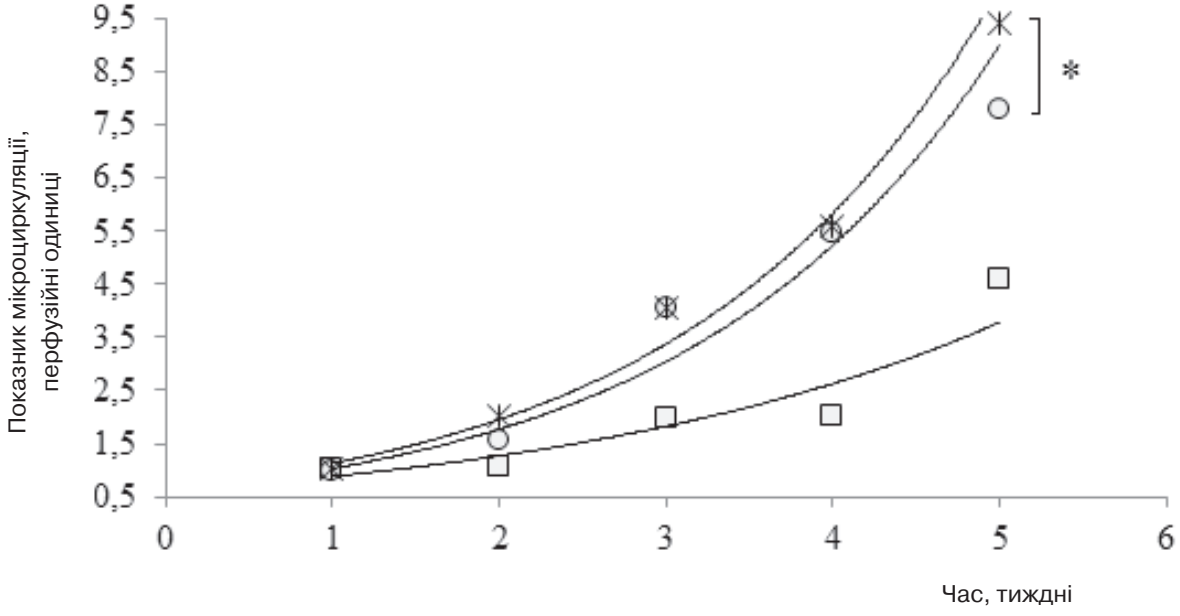

Рис. Залежність показника мікроциркуляції від часу для кінцівок тварин, яким було внутрішньом`язово (позначено сніжинками) та інтраваскулярно (позначено колами) трансплантовано мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, введена аутокров (позначено квадратами), * - $p<0,05$.

мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку порівняно з внутрішньом`язовим введенням аутокрові в експерименті на фоні ішемії дало більш швидке відновлення нормальної функції м'язів кінцівки.

Результати експериментальних досліджень показали, що вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку на покращення кровотоку нижньої кінцівки щурів подібний до впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини, дослідженому в роботі [3]. В роботі [8] також показано, що трансплантація клітинного матеріалу, а саме стовбурових клітин периферичної крові, поліпшувала в експерименті показники колатерального кровообігу в ураженій кінцівці.

Висновки.

1. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку в ішемізовані кінцівки дослідних тварин дозволила на 5-й тиждень в 1,7 разу (для інтраваскулярного введення) і 2 разу (для внутрішньом`язового введення) збільшити показник мікроциркуляції, порівняно з контрольною групою та групою тварин, яким внутрішньом'язово вводився фізіологічний розчин.

2. Середньоарифметичні значення показника мікроциркуляції були дещо кращими (достовірні розрізнення спостерігались лише на 5-й тиждень експерименту) у тих тварин, яким внутрішньом'язово вводилась суспензія мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, ніж для тих, яким ті ж клітини вводились інтраваскулярно.

Перспективи подальших досліджень. Для визначення безпосередніх процесів, що відбуваються в ділянці ураження, та визначення механізмів впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин необхідно проведення подальших досліджень (наприклад, гістологічних досліджень в усіх групах тварин).

Список літератури

1. Отдаленные результаты хирургического лечения поздних окклюзий аортобедренных трансплантатов у больных с рецидивом критической ишемии нижних конечностей / Ю. Э. Восканян, А. В. Вырвыхвост, Ю. П. Таций [и др.] // Ангиология и сосуд. хирургия. – 2000. – Т. 6, № 4. – С. 81 – 85.
2. 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.
3. Домбровський Д. Б. Комплексне лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок із використанням трансплантацій мультипотентних стромальних клітин аутоліпоаспірату (експериментально-клінічне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук : спец. 14.01.03 «Хірургія», 14.01.08 «Трансплантологія та штучні органи» / Д.Б. Домбровський. – Київ, 2011. – 40 с.
4. Золоев Г. К. Тактика хирургического лечения в процессе двигательной реабилитации больных с ишемией единственной нижней конечности / Г. К. Золоев, С. В. Литвиновский, О. А. Коваль // Ангиология и сосуд. хирургия. – 2003. – Т. 9, № 2. – С.106 – 111.
5. Покровский А. В. Клиническая ангиология: руководство для врачей. В 2 т. Т. 1. Под ред. А. В. Покровского. – М.: Медицина, 2004. – 808 с.
6. Вазонит–ретард в лечении больных с перемежающейся хромотой при облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей / А. В. Покровский, А. В. Чупин, А. А. Калинин [и др.] // Ангиология и сосуд. хирургия. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 19 – 26.
7. Angiogenesis by Implantation of Peripheral Blood Mononuclear Cells and Platelets Into Ischemic Limbs / O. Iba, H. Matsubara, MD, Y. Nozawa [et al.] // Circulation. – 2002. – 106. – P. 2019-2025.
8. 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. – № 17(2). – P. 11-15.
9. Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia using autologous bone marrow cell transplantation / H. Matsubara // Nippon Naika Gakkai Zasshi. – 2003. – № 10. – P. 877 – 883.
10. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone–marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial / E. Tuteishi–Yuyama, H. Matsubara, T. Murohara [et al.] // Lancet. – 2002. – Vol. 360. – P. 427 – 435.

УДК 576.3/.7.086.83:616.13:617.58

ВПЛИВ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН НА АНГІОГЕНЕЗ ЩУРІВ З ІШЕМІЄЮ НИЖНІХ КІНЦІВОК ПРИ РІЗНИХ СПОСОБАХ ВВЕДЕННЯ КЛІТИННОГО МАТЕРІАЛУ

Гринь В. К., Попандопуло А. Г., Оберемко А. В., Варшавер П. Л.

Резюме. Хронічні облітеруючі захворювання артерій нижніх кінцівок досить часто призводять до інвалідізації пацієнтів, що являє собою серйозну медико-соціальну проблему. Метою даної роботи було визначити вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку на неоангіогенез щурів за умов експериментальної хронічної ішемії нижніх кінцівок при різних способах введення клітинного матеріалу. Результати проведених досліджень були дещо кращими у тих щурів, яким мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку вводились внутрішньом`язово, ніж для тих тварин, яким клітини вводились інтраваскулярно.

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

УДК 576.3/.7.086.83:616.13:617.58

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА АНГИОГЕНЕЗ КРЫС С ИШЕМИЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА

Гринь В. К., Попандопуло А. Г., Оберемко А. В., Варшавер П. Л.

Резюме. 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 мзенхимальных стромальных клеток костного мозга на неоангиогенез нижних конечностей крыс при экспериментальной хронической ишемии и при разных способах введения клеточного материала. Данные показателя микроциркуляции были несколько лучше у тех крыс, которым мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга вводились внутримышечно, чем у тех животных, которым клетки вводились интраваскулярно.

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

UDC 576.3/.7.086.83:616.13:617.58

Mesenhymal Stromal Cells Influence On Rats Angiogenesis With Lower Limb Ischemia By Different Cell Matherial Introduction

Gryn V.K., Popandopulo A.G., Oberemko A.V., Varshaver P.L.

Summary. Chronic lower limb ischemia represents a serious problem in Ukraine. The purpose of this work was to determine influence of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells on rat`s angiogenesis at experimental chronic ischemia. Rats of the Wistar-Kioto line were divided into 5 groups, 2 of which – with transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells. Results showed fast increase of microcirculation criteria of rats with transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells.

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

Стаття надійшла 16.05.2012 р.

Рецензент – проф. Проніна О.М.