

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЯК МЕТОД НЕПРЯМОЇ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ У ХВОРИХ ІЗ ХРОНІЧНОЮ ІШЕМІЄЮ КІНЦІВКИ

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЯК МЕТОД НЕПРЯМОЇ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ У ХВОРИХ ІЗ ХРОНІЧНОЮ ІШЕМІЄЮ КІНЦІВКИ – Методи непрямой реvascularization, що ґрунтуються на використанні клітинних технологій, є перспективним напрямком у комплексному лікуванні хворих із хронічною ішемією кінцівок. Метою наукової роботи було дослідити за допомогою імуногістохімічного та електронно-мікроскопічного методів процеси, що відбуваються у м'язовій тканині хворих із хронічною ішемією кінцівок після трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки. Проведені дослідження свідчать про активацію у післятрансплантаційному періоді процесів неангіогенезу в ішемізованій м'язовій тканині, при чому процеси стимуляції ангіогенезу фіксуються протягом року після введення клітин фетальної печінки.

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЯК МЕТОД НЕПРЯМОЇ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ У БОЛЬНИХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ КОНЕЧНОСТИ – Методи непрямой реvascularization, что основываются на использовании клеточных технологий, являются перспективным направлением в комплексном лечении больных с хронической ишемией конечностей. Проведено исследование, целью которого было изучить с помощью иммуногистохимического и электроно-микроскопического методов процессы, которые происходят в мышечной ткани больных с хронической ишемией конечности, после трансплантации прогеніторных клеток фетальной печени. Результаты исследования свидетельствуют об активации в послетрансплантационном периоде процессов неангиогенеза в ишемизованной мышечной ткани, причем процессы стимуляции ангиогенеза фиксируются на протяжении года после введения клеток фетальной печени.

TRANSPLANTATION OF FETAL LIVER PROGENITOR CELLS AS A METHOD OF INDIRECT REVASCULARIZATION IN PATIENTS WITH CHRONIC LIMB ISCHEMIA – The methods of indirect revascularization based on the use of cellular technologies are a very promising type of complex treatment of patients with chronic limb ischemia. The goal of the research work was to study the processes occurring in the muscular tissue of the patients with chronic limb ischemia after transplantation of fetal liver progenitor cells by means of immunohistochemical and electron microscopic methods. The performed studies have shown the activation of neoangiogenesis processes within the post-transplantation period in ischemic muscular tissue, where the stimulation processes of angiogenesis remain in place for one year following the administration of fetal liver cells.

Ключові слова: хронічна ішемія, непрямая реvascularization, фетальна печінка.

Ключевые слова: хроническая ишемия, непрямая реvascularization, фетальная печень.

Key words: chronic ischemia, indirect revascularization, fetal liver.

ВСТУП Розвиток біотехнології та клітинної біології зробило клітину засобом лікування багатьох захворювань [1], у тому числі лікування хронічних ішемічних станів [2, 3].

Прогеніторні клітини фетальної печінки людини 6–8 тижнів гестації експресують CD34⁺, CD38⁻, CD45Ra^{low}, CD71^{low}, що свідчить про високий потенціал трансди-

ференціювання до ангіобластів та ендотеліоцитів – основної складової капіляра, зумовлюючи значну потенцію до стимуляції процесів ангіогенезу, ніж автоклітини кісткового мозку або жирової тканини [5].

Метою роботи стало дослідити за допомогою імуногістохімічного та електронно-мікроскопічного методів процеси, що відбуваються у м'язовій тканині хворих із хронічною ішемією кінцівок після трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Клінічне дослідження проводили у відділі мікросудинної та пластичної хірургії Національного інституту хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова та клінічній базі ТОВ “Інститут клітинної терапії”. Хронічна ішемія II Б–IV ступенів була зумовлена облітеруючим атеросклерозом або ендартеріотом, середній вік хворих складав 53,5 року. У всіх хворих було констатовано неможливість виконання реконструктивних операційних втручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки. Клітинну трансплантацію виконували вводячи клітини локально (вздовж облітерованих судин) та системно (внутрішньовенно).

Алгоритм дослідження включав загальноклінічні тести, артеріографічне дослідження та визначення стану мікроциркуляторного русла за допомогою лазерної доплерівської флуометрії. Окрім того, у хворих до та на 1–6–12 місяць після клітинної трансплантації, під місцевим знеболюванням вилучали біоптати м'язової тканини з передньомілковою та задньомедіальної груп м'язів. Надалі біоптати досліджували за допомогою імуногістохімічного та електронно-мікроскопічного методів. При проведенні імуногістохімічних досліджень застосовували непрямий стрептавідинпероксидазний метод виявлення рівня експресії антигенів віментину, фактора Віллебранда та колагену IV типу. Зрізи біоптату м'язової тканини товщиною 40–60 нм, які отримали на ультратомі LKB-III, вивчали в електронному мікроскопі ПМ-125К.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Ішемічне ураження призводить до ультраструктурних змін ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини, зменшення та набряку. В зв'язку з порушенням базального шару має місце підвищення проникності капіляра та “пропотівання” компонентів крові в периваскулярну зону. Фіксували капіляри з різко зжуженим просвітом, що зумовлено збільшеною кількістю колагенових волокон і сполучної тканини та розвитком перекапілярного фіброзу. Просвіт деяких капілярів був цілком заповнений цитоплазматичним детритом десквамованих клітин, що свідчить про пошкодження цитоплазматичної мембрани ендотеліальних клітин. Суттєві зміни фіксуються в мітохондріях та плазматичному ретикулумі, що є свідченням значного зниження внутрішньоклітинних енергетичних процесів. Наявні поодинокі ендотеліоцитоподібні молоді клітини є функціонально неактивними та не забезпечують компенсаторну відповідь м'язової тканини на ішемічне ураження.

Результати електронно-мікроскопічного дослідження корелювали з імуногістохімічними тестами. Імуногістохімічна експресія фактора віментин в ділянках судинних пучків пери- та ендомізію була нерівномірною, а колагену IV типу експресувався лише в зруйнованій базальній мембрані судин. Експресія фактора Віллебранда, який є маркером ангиогенезу, в зразках м'язової тканини хворих із хронічною ішемією була негативною.

За даними ультраструктурного дослідження, на 6 місяць після трансплантації спостерігають значну кількість молодих ендотеліоцитів та низькодиференційованих ендотеліоподібних клітин, що мають ознаки активної диференціації. Для молодих ендотеліальних клітин характерне розширення ендоплазматичного ретикулуму, наявність мітохондрій з гіперосмованим матриксом, піноцитозних везикул та електронно-щільних тілець (Вейбеля-Палладе), збільшення кількості полісом та окремих фібрилярних структур (рис. 1).

Фіксується суттєве збільшення просвіту мікросудин, збільшується також кількість оточуючих їх ендотеліоцитів, які мали значну кількість цитоплазматичних виростів та піноцитозних бульбашок. У процесі руху ендотеліальних клітин або їх відособлення формуються міжклітинні просвіти та тяжі. В подальшому ці клітинні тяжі завдяки процесу каналізації перетворюються у своєрідні клітинні трубочки, з яких формуються зрілі функціональні капіляри.

Результати імуногістохімічного аналізу свідчили про тривалу активність процесів регенерації та ангиогенезу. Фіксували наявність вираженої експресії фактора Віллебранда та мезенхімального фактора віментин, особливо в ділянках ендомізію та мiosимпласту. Експресія колагену IV типу була дещо посиленою, особливо в стінці новоутворених капілярів (рис. 2).

Результати електронно-мікроскопічного дослідження на 12 місяць після трансплантації свідчили про наявність у біоптатах молодих ендотеліоцитів. Останні характеризувались різним ступенем електронно-щільної цитоплазми, в якій містяться полісоми, помірно розвинутий ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії з щільним матриксом. З боку базальної мембрани виявлялись низькодиференційовані ендотеліоподібні клітини з вираженими піноцитозними везикулами. В деяких клітинах вакуолі містили мембранні обривки та мієлінові фігури. Інші ендотеліальні клітини мали ознаки дегенерації, що проявлялось у вигляді просвітлення цитоплазматичного матриксу, втратою мітохондріями крист, зайвою вакуолізацією. Найбільш активними деструкціями були підтверджені мікрорости та люмінальні ділянки цитоплазми. Зміни ультраструктури ендотеліальної клітини пов'язані з формуванням гранул ендоплазматичної сітки, багато численних везикул та комплексу Гольджі.

Загалом результати електронно-мікроскопічного дослідження на прикінцевий термін дослідження свідчили про поступову стабілізацію процесів стимульованого ангиогенезу та функціонування розвинутої капілярної сітки.

ВИСНОВКИ 1. Хронічний ішемічний стан призводить до пригнічення компенсаторного тканинного ангиогенезу та обтурації просвіту капілярів десквамованими ендотеліальними клітинами, що призводить до порушення кровообігу на мікроділяційному рівні.

2. Трансплантація прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки призводить вже до першо-

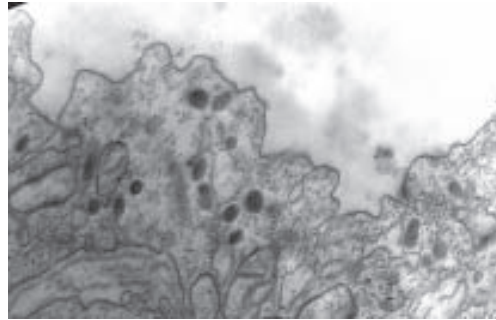


Рис. 1. Фрагменти молодих ендотеліальних клітин, що містять електронно-щільні гранули (тілець Вейбеля-Палладе), піноцитозні бульбашки та зигзагоподібну люмінальну поверхню цитоплазми. x 23 000.



Рис. 2. Експресія колагену IV типу. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення колагену IV типу з дофарбовуванням гематоксилином Майєра. Ок. 10. Об. 20.

го місяця після введення клітинного транспланта до суттєвої активації процесів ангиогенезу.

3. Стимульований ангиогенез характеризується появою молодих ендотеліальних клітин різного ступеня диференціації, які утворюють активно функціональну капілярну сітку, що підтверджується результатами електронно-мікроскопічного дослідження та імуногістохімічними тестів.

4. Трансплантація прогеніторних клітин фетальної печінки може розглядатися як ефективний і перспективний метод непрямой ревазуляризації кінцівки та застосовуватись в комплексному лікуванні хворих із хронічною ішемією кінцівок.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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 // European Surg. – Acta Chirurgica Austriaca. – 2002. – Vol. 34, № 2. – P. 101–104.
3. Rissanen T. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb - on the way to the clinic / T. Rissanen, I. Yajanto, S. Yla-Herttuala // European J. of Clinical Investigation. – 2001. – № 31. – P. 651–658.
4. 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.
5. Кухарчук А. Л. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман. – Черновцы : Золоті литаври, 2004. – 505 с.

Отримано 09.06.14