

УДК: 616-089.843:611.013.68.018]:612.017.1:617.58-005.4

*Д.Б. Домбровський,**В.В. Савін,**В.В. Максим'юк*Буковинський державний медичний  
університет, Обласна клінічна лікарня  
м. Чернівці

## МОРФОЛОГІЧНА ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ КРОВІ ЗА УМОВ ІШЕМІЇ КІНЦІВОК В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**Ключові слова:** пуповинна кров,  
трансплантація, хронічна ішемія  
нижніх кінцівок.

**Резюме.** За умов експериментальної ішемії кінцівок проведено дослідження трансплантації клітин пуповинної крові. Доведено морфологічними та імуногістохімічними дослідженнями що трансплантація клітин пуповинної крові в умовах ішемічного ураження кінцівок призводить до активації компенсаторних реакцій, сприяє появі зрілих ендотеліоцитів кровоносних судин що є показником стимуляції ангиогенезу.

### Вступ

Актуальність проблеми лікування облітеруючих захворювань периферичних артерій у сучасній клінічній медицині обумовлено збільшенням їх поширеності. Облітеруючі захворювання нижніх кінцівок посідають одне з перших місць за клінічним значенням та частотою [1].

Одним із проявів цього захворювання є хронічна ішемія нижніх кінцівок, яка у всьому світі вважається надзвичайно важливою медикосоціальною проблемою із-за великого відсотка ампутацій та інвалідації пацієнта. Серед усіх серцево-судинних захворювань хронічна ішемія нижніх кінцівок за частотою захворюваності посідає друге місце і поступається лише ішемічній хворобі серця.

Сучасні підходи до лікування хронічної ішемії нижніх кінцівок включають консервативні та хірургічні методи. Велика частка облітеруючих захворювань припадає на ураження дистальних відділів судин нижніх кінцівок. У 50-75 % пацієнтів виконання реконструктивних операцій є неможливим через неоперабельне ураження дистального русла, тому проблема лікування дистального ураження судин нижніх кінцівок є досить актуальною.[11]

В останні 30 років цілком багатьох досліджень стало вивчення методів нормалізації кровопостачання нижніх кінцівок шляхом стимуляції ангиогенезу за допомогою непрямих методів ревазуляризації нижніх кінцівок таких як поперекова симпатектомія, фасціотомія, остеотрєпанация, пересадка шкірних клаптів на ніжці, ауто-трансплантація аспірата кісткового мозку, трансплантація мультипотентних клітин жирової тканини.[6]

Вивчаються можливості використання клітинних технологій для пошуку нових методів сти-

муляції ангиогенезу за допомогою стовбурових клітин пуповинної крові, периферичної крові, кісткового мозку та жирової тканини, амніотичної рідини, тканини пупкового канатика, шкіри, верхівки зубів, слизової носоглотки. [12]

Найбільш дослідженими джерелами стовбурових клітин дорослого організму є кістковий мозок, периферична кров, пуповинна кров, жирова клітковина.[5]

Сьогодні враховуючи величезну біологічну цінність пуповинної крові, її розглядають як альтернативне джерело стовбурових клітин порівняно з кістковим мозком та периферичною кров'ю. Пуповинна кров є більш доступною за кістковий мозок та клітини периферичної крові, має велику кількість активних стовбурових клітин які володіють високою репопуляційною властивістю. [9]

Як свідчать результати численних клінічних досліджень за останні 20 років пуповинна кров стала вагомим альтернативним джерелом стовбурових клітин, придатних для відновлення пригніченого кровотворення та ангиогенезу.

Значна кількість гемопоетичних та мезенхімальних стовбурових клітин, більш високий ступінь HLA (людський лейкоцитарний антиген) толерантності щодо клітин кісткового мозку, дозволили пуповинній крові стати цінним джерелом стовбурових клітин для трансплантації при онкогематології. [10]

У світі щорічно проводять понад 3000 трансплантацій пуповинної крові при різних захворюваннях (лейкоз, онкозахворювання, захворювання нервової системи, підшлункової залози та ін.) їхня кількість зростає з кожним роком.[8].

### Мета дослідження

Вивчити вплив стовбурових клітини пупо-

винної крові на процеси ангиогенезу в умовах змодельованої ішемії кінцівок дослідних тварин.

### Матеріал і методи

Проведено експериментальні дослідження з використанням 30 шурів, середня маса яких 240 г, вік  $6 \pm 1,2$  міс, що знаходились при кімнатній температурі, на звичайному лабораторному раціоні. Тварини поділені на 2 групи: I група - тварини, яким змодельовано ішемію, II група - тварини, яким на фоні змодельованої ішемії кінцівки введено клітини кордової крові. При проведенні досліджень зберігались всі умови асептики та антисептики. Моделювання ішемії тканини кінцівки у шура проводилось за методом Т.А.Князевої [2]. Кріоконсервовану клітинну суспензію отримували з банку пуповинної крові ТОВ "Інститут клітинної терапії". Зберігали заморожені зразки у рідкому азоті при температурі  $-196^\circ\text{C}$  у кріосховищі "38Kw/Kryos Controller".

Використовували клітинну суспензію з такими параметрами: вміст ядровмісних клітин - від  $0,11 \times 10^9$  до  $3,7 \times 10^9$ , кількість мононуклеарів - 15-60 %, КУО-ГМ -  $(50 \pm 10) \times 10^3$ /мл, вміст гемопоетичних клітин, що несуть на своїй поверхні маркери CD34+ CD45+ і CD117+ CD45+ [8], дорівнював відповідно  $(0,85 \pm 0,20)$  та  $(1,52 \pm 0,39)$  %. Життєздатність клітин -  $(80 \pm 10)$  %. Стовбурові клітини кордової крові водили в ішемізовані кінцівки на 3 добу після моделювання ішемії підфасціально тонкою смужкою на медіальній поверхні стегна. Загальна кількість введеної кордової крові становила  $(50 \pm 5)$  мл. Статистичну обробку отриманих даних проведено за Стьюдентом з визначенням t-критерію за програмою "BioStat".

На 3-5, 10-14, та 21-25 доби після моделювання ішемії на кінцівці взято м'язову тканину медіальної та латеральної поверхонь стегна на стороні проведення експерименту. Гістологічне дослідження проводилося за методом Н.З.Сліснченко, імуногістохімічне дослідження отриманої м'язової тканини - за допомогою визначення експресії віментину та фактору Віллебранда.

### Обговорення результатів дослідження

В I групі за допомогою гістологічних досліджень у м'язовій тканині на 3-5 доби відмічається набряк інтерстицію м'язу та некроз міоцитів, спостерігається прогресуюча десквамація та некроз ендотеліоцитів з облітерацією просвіту судин. Зустрічається розволокнення і набряк судинної стінки. На тлі набряку міжм'язових ділянок мають місце вогнища крововиливів та поодинокі мультипотентні клітини (рис. 1).

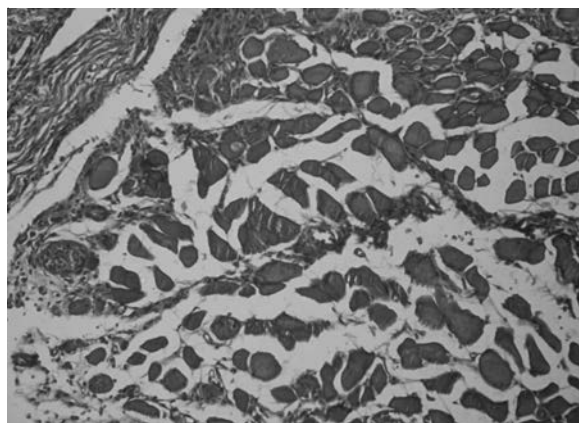


Рис. 1. Мікрофотографія. Третя доба змодельованої ішемії. Набряк інтерстицію м'язу та некроз міоцитів. Забарвлення за методом Н.З.Сліснченко. Об.10; Ок. 10.

Наростання набряку інтерстицію м'язу продовжувалося до 10-14 доби з подальшим його зменшенням до 21-25 доби (Рис. 2). Відмічались поодинокі ендотеліальні клітини, на відміну від перших діб експерименту.

Частина м'язових волокон залишається в стані некрозу чи заміщується сполучною тканиною. Це підтверджується і при постановці імуногістохімічної методики на віментин. На 3-5 доби експерименту окремі клітини мають віментин - позитивне забарвлення, що вказує на їх мезенхімальне походження; їх форма та розміри відповідають фібробластам та фіброцитам.

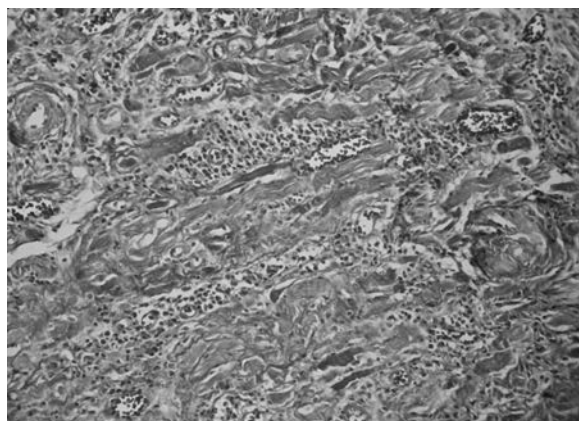


Рис. 2. Мікрофотографія. Двадцять п'ять доба змодельованої ішемії. Склероз (фіброз) м'язової тканини. Забарвлення за методом Н.З.Сліснченко. Об.10; Ок. 10.

Експресія віментину була найбільшою до 14 доби від моменту моделювання ішемії, в міжм'язових волокнах, що оточують судинні пучки, а також в мембранах стінки судин венозного й артеріального типів (рис. 3), що свідчить про наявність проміжних мезенхімальних філаментів.

З 3 по 21 доби експерименту позитивного забарвлення на фактор Віллебранда у тварин I групи не виявлено, що вказує на відсутність неангіогенезу. Лише на 25 добу визначається пози-

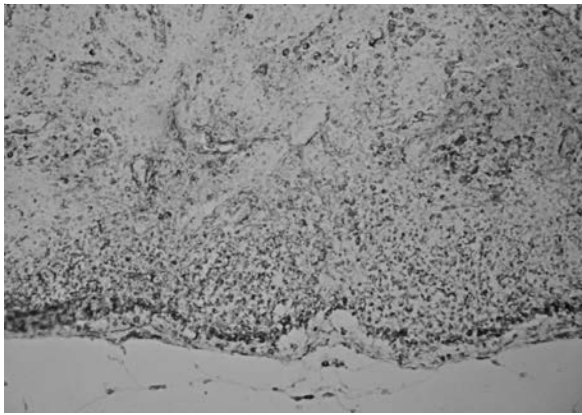


Рис. 3. Мікрофотографія. Десята доба змодельованої ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональне антитіло проти віментину, V9) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодином. Ок. 10, Об. 10. тивне забарвлення, що свідчить про початкові процеси неоангіогенезу.

Отже, у тварин I групи внаслідок моделювання ішемії спостерігались виражені зміни до 14 доби, які характеризуються розладом кровообігу в судинах, набряком інтерстицію м'язової тканини, що зменшуються лише на 25 добу, проте з'являється виражений склероз м'язової тканини.

У тварин II групи на 3 добу після трансплантації в міопласті мали місце мозаїчні зміни - явища дистрофії, деструкції міопласту та набряку інтерстицію, схожі на зміни в першій групі. На 10-14 добу експерименту ендотеліальні клітини густо заселяють інтерстицій, відмічається збільшення числа фіброblastів на відміну від першої групи.

На 10-25 доби виявлені вогнища ангіогенезу і регенерації, відмічено грануляційну тканину, із невеликою кількістю клітин (переважно фіброblastів) та кровоносних судин, в яких здійснюється кровотік (рис. 4).

При проведенні імуногістохімічної методики на віментин виявлено зрілі віментин-позитивні ен-

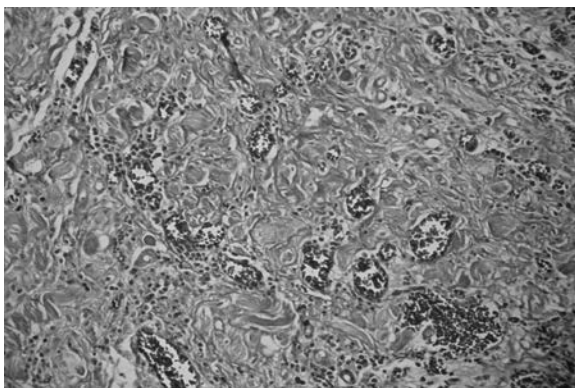


Рис 4. Мікрофотографія. Двадцять п'ята доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Кровоносні судини, в яких здійснюється кровотік. Забарвлення за методом Н.З.Слінченко. Об.10; Ок. 10.

дотеліоцити кровоносних судин. Починаючи з 5 і особливо з 10-14 доби після введення пуповинної крові, ознаки характерні для гіпоксії поступово зникали. Інтерстицій густо заселений віментин-позитивними мультипотентними клітинами. Спостерігали наявність макрофагів та формування первинних судинних структур.

На 21 добу наявні вогнища ангіогенезу і регенерації з множинними дрібними судинами, розташованими в сполучнотканинних і фіброзних вогнищах. Виявлено зрілі віментин-позитивні ендотеліоцити кровоносних судин, як показник стимульованого ангіогенезу (Рис. 5).

При дослідженні м'язів ішемізованої кінцівки

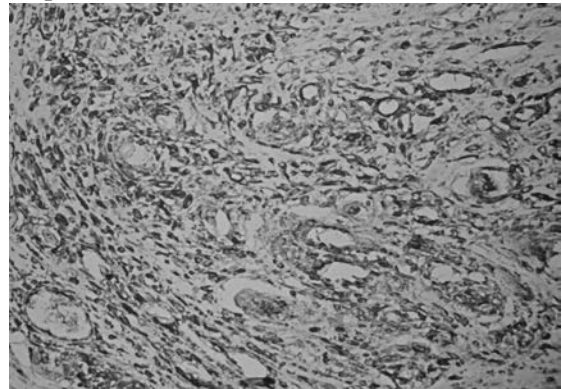


Рис. 5. Мікрофотографія. Двадцять перша доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Вогнища ангіогенезу з множинними судинами. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональне антитіло проти віментину V9) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодином. Ок. 10, Об. 10.

тварин II групи відмічаються дрібні дисеміновані групи клітин з чітким позитивним забарвленням на фактор Віллебранда (рис. 6), що дозволяє констатувати виражений неоангіогенез у цих щурів вже на 10-14 добу і подальший термін.

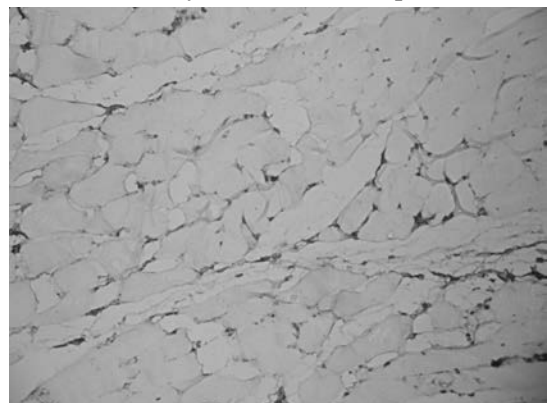


Рис. 6. Мікрофотографія. Десята доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія фактору Віллебранда в перимізії із новоутвореними ендотеліоцитами. Полімерний метод визначення експресії фактору фон Віллебранда (поліклональне антитіло проти фактору фон Віллебранда) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодином. Ок. 10, Об. 10.

Отже, у тварин II групи при введенні кордової крові на тлі ішемії кінцівок виявлено постійну структурну стимуляцію регенераторних процесів і ангиогенезу. На 10-14 добу експерименту з наявний кровотік в "молодих" судинах, що підтверджувалося дослідженням експресії фактору Віл-лебранда. Разом з цим відмічені позитивні дані про зменшення і відсутність фіброзування, які характерні для розвитку ішемії, що підтверджується дослідженнями мезенхімального фактору віментину.

### Висновок

Можна стверджувати, що трансплантація стовбурових клітин пуповинної крові призводить до активації компенсаторно-відновної реакції в ішемізованій м'язовій тканині та стимуляції процесів ангиогенезу de novo, що підтверджується за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів дослідження.

### Перспективи подальших досліджень

Проведений експеримент вказує на суттєву активацію процесів неоангиогенезу на тлі ішемії, що доцільно розглядати як доклінічний етап даного дослідження з подальшим продовженням вивчення цих процесів в клінічній практиці у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок.

**Література.** 1. Боднар П.Я. Прямая та непряма реваскуляризація при стегно-підколінно-гомількової оклюзії в умовах хронічної критичної ішемії: автореф. Дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.03 "Хірургія" / П.Я. Боднар. - Тернопіль, 2011. - 54 с. 2. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани // Князева Т.А. // Вестн. Акад. Мед. наук СССР. - 1974. - №12. - С.3-8. 3. Літвінова Н.Ю. Перспективи використання пуповинної крові для лікування ішемії нижніх кінцівок / Н.Ю. Літвінова, Р.В. Салютін, Л.А. Панченко // Кардіологія і кардіохірургія. - 2013. - № 1 (41). - С. 85-93. 4. Ткаченко А.Н. Прогностические критерии летальных исходов при проведении ампутаций нижней конечности у больных пожилого и старческого возраста / А.Н. Ткаченко и др. // Medical Sciences. - 2011. - №9. - С. 304 - 308. 5. Hipp J. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine / Jennifer Hipp, Anthony Atala // Stem Cell Reviews - 2008, Vol. 4, № 1, P 3-11/ 6. Sotturrai V. Extensive revascularization or primary amputation: which patients with critical limb ischemia should not be revascularized? / V. Sotturrai, J. White // Vasc. Surg. - 2007. - Vol.20, №1. - P. 68-72. 7. Suzanne E. Concise Review: Mesoangioblast and Mesenchymal Stem Cell Therapy for Muscular Dystrophy: Progress, Challenges, and Future Directions / E. Suzanne //

Stem Cells Trans Med. - 2015. - Vol. 4. - P.91-98. 8. Насадюк Х.М. та співаавт. 2010; Chov S. et al., 2010; Delahey C. et al., 2010; Gratwohl A. et al., 2010; Petersdozf E.W., 2010; Perez L.E., 2011. 9. Reiman V., Creutzig V. (2009) Stem cells derived from cord blood in regenerative medicine. Dtsch. Arztebl. Int., 106 ( 50) : 831-836. 10. Brown S.A., Boussions V.A., 2008; Smith A.R., Wagner S.E., 2009; Білько Д.І. та співаавтори., 2010. 11. Руднев Н.Є., 2003; Демидова О.А., 2006; Баженов М.С., 2008. Особенности консервативной терапии и ее роль в комплексном лечении хронической ишемии нижних конечностей у геронтологических больных. Дис. ... д-ра мед. наук, Москва, 246 с. 12. Поляченко Ю.В., Салютін Р.В., Мартиненко С.І., Паляниця С.С. (2011б) Гістологічна та імуногістохімічна характеристика стимульованого ангиогенезу внаслідок трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки. Буковин. мед. вісн., 1(15): 69-72.

### МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ПРИ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Д.Б. Домбровский, В.В. Савин, В.В. Максимюк*

**Резюме.** В условиях экспериментальной ишемии конечностей проведено исследование трансплантации клеток пуповинной крови.

Доказано морфологическими и иммуногистохимическими исследованиями что трансплантация клеток пуповинной крови в условиях ишемического поражения конечностей приводит к активации компенсаторных реакций, способствует появлению зрелых эндотелиоцитов кровеносных сосудов что является показателем стимуляции ангиогенеза.

**Ключевые слова:** пуповинная кровь, трансплантация, хроническая ишемия нижних конечностей.

### THE MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF TRANSPLANTATION OF STEM CELLS OF CORD BLOOD AT AN ISCHEMIA OF EXTREMITIES IN EXPERIMENT

*D.B. Dombrowsky, V.V. Savin, V.V. Maksimyk*

**Abstract.** We conducted the research of the transplantation cord blood cells in experimental limb ischemia.

Shown morphological and immunohistochemical studies that transplantation of cord blood cells in conditions of limb ischemia damage leads to activation of compensatory reactions, contributes to the appearance of mature endothelial cells of blood vessels which is a measure of angiogenesis stimulation.

**Key words:** cord blood, transplantation, chronic ischemia of the lower extremities.

**Bukovyna State Medical University (Chernivtsi)**

*Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №1 (51). - P.51-54.*

*Надійшла до редакції 01.02.2015*

*Рецензент – проф. І.С. Давиденко*

*© Д.Б. Домбровский, В.В. Савин, В.В. Максимюк, 2015*