

ДВНЗ “ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ”

ВІСНИК

НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

науково-практичний журнал

Заснований у грудні 1993 р.
Виходить 4 рази на рік

Свідоцтво про державну реєстрацію:
серія КВ № 264 від 10.12.1993 р.

Рекомендовано до видання вченою
радою ДВНЗ “Тернопільський держав-
ний медичний університет імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України”
(протокол № 10 від 12.02.2013 р.)

Журнал включено до Переліку наукових
фахових видань України,
в яких можуть публікуватись
результати дисертаційних робіт
на здобуття наукового ступеня
кандидата та доктора наук (додаток
до Постанови Президії ВАК України від
09.06.1999 р. № 1 – 05/7). Перереєст-
ровано Президією ВАК України в 2010 р.

Засновник і видавець:
ДВНЗ “Тернопільський державний
медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”

Адреса редакції:
Журнал “Вісник наукових досліджень”
Майдан Волі, 1
м. Тернопіль, 46001
УКРАЇНА

Шеф-редактор – Жулкевич І. В.
Секретар – Лісовенко О. П.
Комп’ютерна верстка – Яскілка З. В.

©“Вісник наукових досліджень”
науково-практичний журнал, 2013

- ◆ **Огляди і власні дослідження**
- ◆ **Внутрішні хвороби**
- ◆ **Хірургія**
- ◆ **Акушерство та гінекологія**
- ◆ **Експериментальні дослідження**
- ◆ **Обмін досвідом**

1 (70)

УДК 617.57/58-005.4-092.4:57.083:612.397:616-089.843

©Д. Б. Домбровський¹, Р. В. Салютін², В. А. Шаблій², К. М. Запольська³, М. Ф. Соколов²Буковинська обласна клінічна лікарня¹Координаційний центр трансплантації органів, клітин і тканин МОЗ України²ДУ "Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України"³**ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСІВ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ ІШЕМІЇ КІНЦІВОК В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСІВ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ ІШЕМІЇ КІНЦІВОК В ЕКСПЕРИМЕНТІ – Жирову тканину останнім часом дослідники розглядають як доступне джерело аутологічних стовбурових клітин. Все більше з'являється повідомлень про застосування цих клітин при різних клінічних ситуаціях. Проведено експериментальні дослідження на щурах із моделюванням ішемії кінцівки. Дослідним тваринам в ішемізовану кінцівку вводили стромально-васкулярну фракцію жирової тканини. Проведено імуногістохімічні дослідження (визначення експресії антитіл до фактора Віллебранда, колагену IV типу та виментину) процесів, що відбуваються в ішемізованому органі після виконання трансплантації стромально-васкулярної фракції жирової тканини, що містить мультипотентні стромальні клітини. Дані результати дозволяють визначити перспективність подальшої розробки даного напрямку досліджень.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ – Жировую ткань в последнее время исследователи рассматривают как доступный источник аутологических стволовых клеток. Все больше появляется сообщений об использовании этих клеток при разных клинических ситуациях. Проведены экспериментальные исследования на крысах с моделированием ишемии конечности. Исследуемым животным в ишемизированную конечность вводилась стромально-сосудистая фракция жировой ткани. Проведены иммуногистохимические исследования (определение экспрессии антител к фактору Виллебранда, коллагена IV типа и виментина) процессов, которые происходят в ишемизированном органе после выполнения клеточной трансплантации. Данные результаты позволяют определить перспективность последующей разработки данного направления исследований.

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PROCESSES AFTER STROMAL CELLS TRANSPLANTATION OF FAT TISSUE AT ISCHEMIA OF EXTREMITIES IN THE EXPERIMENT – Fat tissue is lately examined by researchers, as an accessible source of autological of stem cells. Many reports appears about the use of these cells at different clinical situations. Experimental researches are conducted on rats with the design of ischemia of extremity. In ischemic extremity stromal-vascular fraction of fat tissue was entered in experimental animals. There were conducted the immunohistochemical researches (determination of expression of antibodies to the factor of Villebrand, collagen IV type and vimentin) of processes which take place in an ischemic organ after implementation of cellular transplantation. These results allow to define perspective of subsequent development of this direction of researches.

Ключові слова: ішемія, ангиогенез, стовбурові клітини, аутоліпотрансплантація.

Ключевые слова: ишемия, ангиогенез, стволовые клетки, аутолипотрансплантация.

Key words: ischemia, angiogenesis, stem cells, autolipotransplantation.

ВСТУП Клітинна і генно-клітинна терапія є одним з найпріоритетніших і багатобічючих напрямів у сучасній медицині. Її проводять з використанням як ауто-

логічних (власних), так і гетерологічних (отриманих від донора) клітин [1–3]. Трансплантацію аутологічних клітин після видалення ракових утворень, заміщення кісткових і хрящових дефектів, відновлення шкірного покриву після опіків, функціонального відновлення пошкоджень тканин серця і мозку, викликаних інфарктами, інсультами і дегенеративними захворюваннями, а також для лікування критичної ішемії нижніх кінцівок, відновлення функцій печінки і стимуляції кровотоку [4–6].

Хоча терапевтичний ефект було продемонстровано для цих типів клітин, складність їх отримання в достатній кількості, неможливість рутинного використання ембріональних стовбурових клітин з етичних причин, наявність серйозних побічних ефектів (порушень ритму серця) при використанні скелетних міобластів, а також болючість процедури отримання клітин в пацієнтів у випадку скелетних міобластів і мезенхімальних клітин кісткового мозку, приводять до необхідності пошуку інших джерел мультипотентних/стовбурових клітин.

Кілька років тому було виявлено, що в жировій тканині людини сконцентрована популяція клітин, що несуть антиген CD34-115 – мембранний глікофосфопротеїн, який вперше було ідентифіковано на гематопоетичних клітинах і мультипотентних клітинах, що відносяться до них [7–10]. Перевагами стромальних клітин жирової тканини для використання у терапевтичних цілях є відносна легкість їх виділення з тканини і можливість отримання в достатньо великій кількості [11, 12].

Метою роботи стало з допомогою імуногістохімічних методів на експериментальній моделі ішемії кінцівки дослідити процеси, що відбуваються після трансплантації стромальних клітин жирової тканини.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Всі операційні втручання на 50 щурах проводили під кетаміновим наркозом. Середня маса тварин складала (374,23±7,56) г, вік – (6±1,2) місяця, щури знаходились при кімнатній температурі на звичайному лабораторному раціоні. Тварин було поділено на дві групи: перша група – тварини, у яких було змодельовано ішемію кінцівки, друга група – тварини, яким на тлі ішемії кінцівки було введено васкулярно-стромальну фракцію жирової тканини. Всі операційні втручання проводили на базі експериментального відділу Національного інституту хірургії та трансплантології АМН України. При проведенні досліджень зберігались всі умови асептики та антисептики. Моделювання ішемії тканини кінцівки у щура проводили методом Т. А. Князевої [14], за даними авторів, ішемічні прояви виражені вже на 2–3 добу після моделювання.

Для отримання стромально-васкулярної фракції, збагаченої мультипотентними стромальними клітинами, жирову тканину щура, яку було отримано з передньої черевної стінки, – передчеревенний жир, після значного подрібнення обробляли колагеназою (фрагменти жирової тканини інкубували у 0,075 % розчині колагенази I типу протягом 30 хв), потім отриману суміш розводили трічі фосфатним буфером Дульбеко й інтенсивно струшували протягом 2–3 хв. Після центрифугування (10 хв при 2500 об./хв) жирове кільце і супернатант видаляли, а осад, що містив мультипотентні клітини строми, судин, лейкоцити, еритроцити, ресуспендували в фізіологічний розчин, після чого дану суміш вводили в ішемізовані кінцівки. Стромально-васкулярну фракцію жирової тканини вводили в ішемізовані кінцівки на 3 добу після моделювання ішемії підфасціально тонкою смужкою на медіальній поверхні стегна. У всіх дослідних та контрольних групах тварин після закінчення терміну дослідження було взято м'язову тканину медіальної та латеральної поверхонь стегна для проведення експерименту на 3, 5, 7, 14, 21 та 25 доби після моделювання ішемії на кінцівці, після чого було застосовано імуногістохімічні (визначення експресії віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда) методи дослідження отриманої м'язової тканини.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Імуногістохімічні параметри віментину, колагену IV типу і фактора Віллебранда у першій групі тварин були виражені нерівномірно і змінювалися в динаміці ішемії.

Так, експресія віментину була найбільшою на 7–14 добу від моменту моделювання ішемії у міжм'язових волокнах, що оточують судинні пучки, а також в мембранах стінки судин венозного і артеріального типів (рис. 1).

Виявлено вогнища фрагментації мезенхімальних структур на тлі дистрофії і деструкції міопласту, що зменшувалися і зникали до 20–25 доби після моделювання ішемії (рис. 2).

При цьому експресія колагену IV типу найбільш виражена в стінці артеріальних судин при їх повно-

кров'ї на 7–14 добу ішемії і вогнища в розволокнувній стінці венул (рис. 3).

Фактор Віллебранда експресувався в ендотеліальних структурах судин (рис. 4). Особливо виражена реакція в повнокровних судинах, в ендомізії, перимізії на 2 і 7 доби ішемії.

Отже, внаслідок моделювання ішемії спостерігали виражені зміни на 2–10 добу, що характеризуються розладом кровообігу в судинах, особливо венозного типу, деструкцією і дистрофією м'язових волокон, які зменшуються на 20–25 добу, проте з'являється фіброзування і склероз стінки судин в перимізії як показник регенерації.

При дослідженні м'язів ішемізованої кінцівки тварин другої групи вже на 14 добу в ділянках перимізії в мезенхімальних структурах спостерігають наявність новоутворених капілярів і судинних тяжів, при цьому імуногістохімічно виражена експресія фактора Віллебранда в ендотеліальних клітинах (рис. 5), що вказує на активний ангиогенез на 14 добу і подальший термін.

На 14–21 добу виявлені вогнища ангиогенезу і регенерації з розташованими в сполучнотканинних і фіброзних вогнищах, множинними дрібними судинами, які зустрічаються постійно у всіх спостереженнях.

При проведенні імуногістохімічної реакції слабо позитивну експресію віментину (рис. 6) визначали в мезенхімальних структурах.

Виразу імуногістохімічну реакцію на колаген IV типу з 14, особливо з 21 доби спостерігали в потовщеній базальній мембрані судин, що розташовані в перимізії, особливо артеріального типу. У вогнищах перимізії ніжно-волокнисті структури базальних мембран (рис. 7).

Новоутворені капілярні структури було виявлено зрідка на 7 добу, систематично на 14 добу в ендоперимізіальних структурах, судини повнокровні або з одиничними еритроцитами, тобто в них здійснюється кровотік.

Отже, введення васкулярно-стромальної фракції ліпідної тканини, що містить мультипотентні клітини, на тлі ішемії виявила постійну структурну стимуляцію

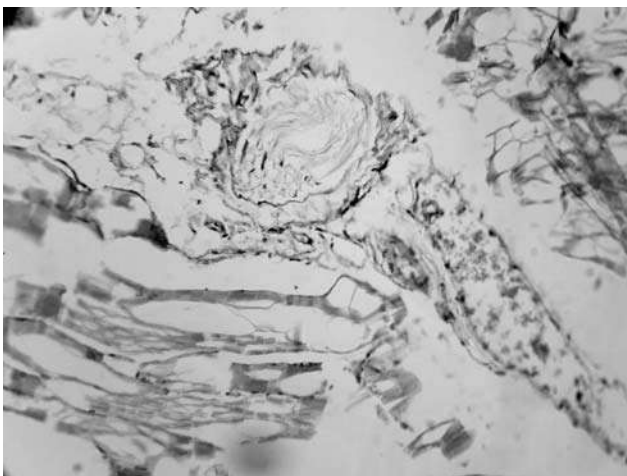


Рис. 1. Перша група. Сьома доба ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 20.

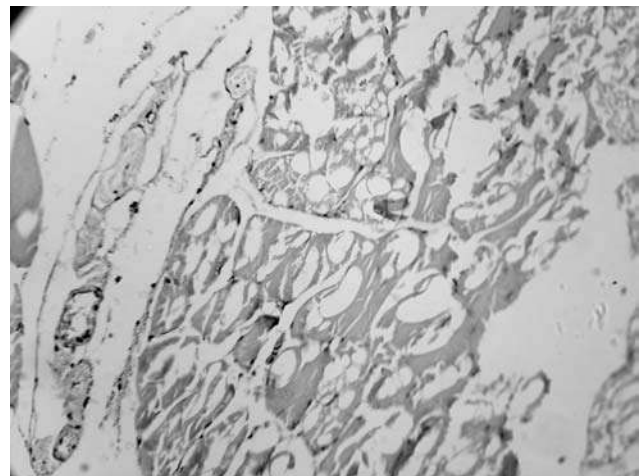


Рис. 2. Друга група. Двадцять п'ята доба. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 20.

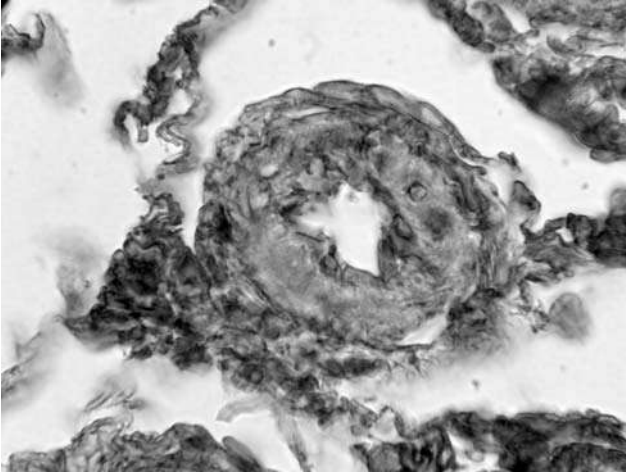


Рис. 3. Перша група. Десята доба ішемії. Експресія колагену IV типу в стінці артеріальної і венозної судини, в якій спостерігають повнокров'я і стази еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 40.

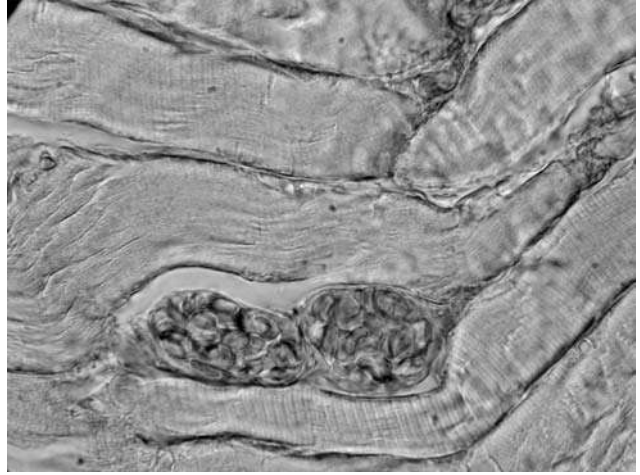


Рис. 4. Друга група. Друга доба ішемії. Експресія фактора Віллебранда на 2 добу ішемії на тлі повнокров'я капілярів і судин венозного типу, стази еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 40.

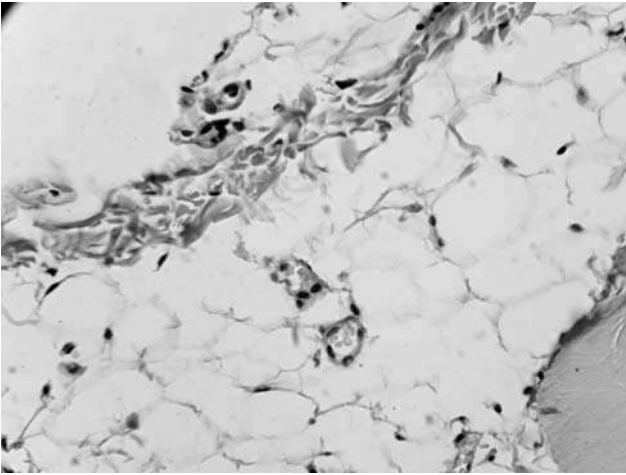


Рис. 5. Чотирнадцята доба. Експресія фактора Віллебранда в ендотелії новоутворених капілярів і судинних тяжів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 40.

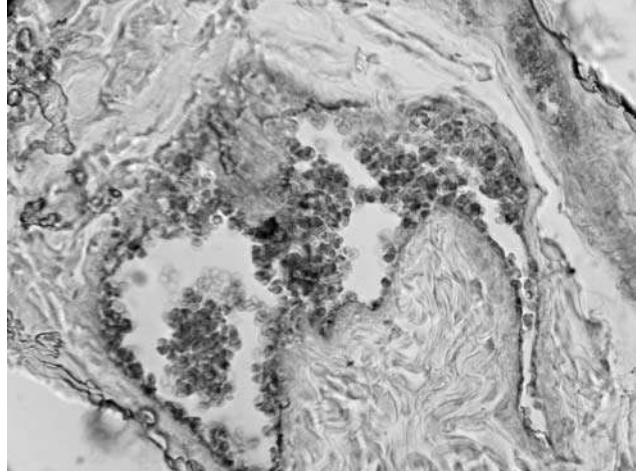


Рис. 6. Чотирнадцята доба. Слабо виражена експресія віментину в мезенхімальних структурах (а), докола судин (б) в перимізії. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія: а) ок. 10, об. 40; б) ок. 10, об. 10.

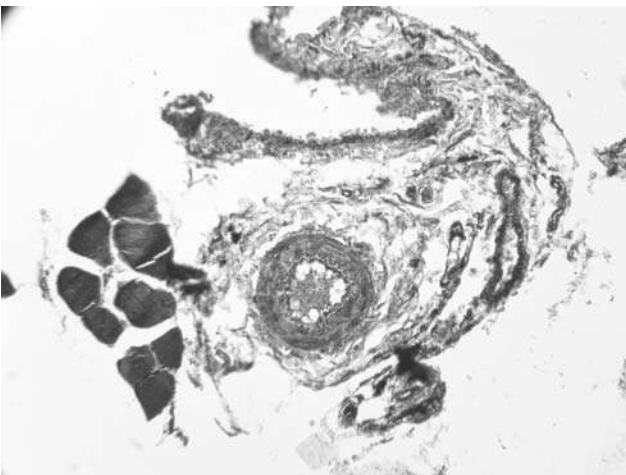


Рис. 7. Експресія колагену IV типу в базальній мембрані судини. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 40.

регенераторних процесів і ангиогенезу. На 7–14 добу експерименту з наявністю кровотоку в «молодих» судинах, що підтверджувалося дослідженням експресії фактора Віллебранда. Разом з цим, відмічено позитивні дані про зменшення і відсутність фіброзування, що характерно для розвитку ішемії, яка підтверджується дослідженнями колагену IV типу і мезенхімального чинника віментину.

ВИСНОВКИ Трансплантація стромальної фракції жирової тканини, що містить велику кількість мультипотентних клітин на тлі ішемії кінцівки, призводить до того, що на 3 добу після трансплантації починаються активні процеси компенсування ішемічного ураження. На 7–14 добу з'являються молоді ендотеліоцити, утворюються «бруньки росту» нових капілярів. Також у цей термін мають місце характерні ознаки макроструктурних змін, зокрема збільшення експресії віментину та фактора Віллебранда. В цей же термін утворюються трубочки ендотеліоцитів, які в подальшому вже на 22 добу після трансплантації утворюють розгалужену, активно функціональну мережу новоутворених капілярів.

Перспективи подальших досліджень Проведені експериментальні дослідження доводять суттєву активацію процесів новоутворення судин на тлі ішемії, що доцільно розглядати як доклінічний етап даного дослідження з подальшим продовженням вивчення цих процесів у клінічній практиці.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pena Duque M. A. Angiogenesis / M. A. Pena Duque. // Arch. Cardiol. Mex. – 2003. – Vol. 73. – P. 109–111.
2. Baumgartner I. Lessons learned from human gene therapy in patients with chronic critical limb ischemia / I. Baumgartner // J. Invasive Cardiol. – 2001. – Vol. 13, № 4. – P. 330–332.
3. Current perspectives in therapeutic myocardial angiogenesis / T. Kinnaird, E. Stabile, S. E. Epstein, S. Fuchs // J. Interv. Cardiol. – 2003. – Vol. 16, № 4. – P. 289–297.
4. Rosell-Novel A. Angiogenesis in human cerebral ischemia / A. Rosell-Novel, J. Montaner, J. Alvarez-Sabin // Rev. Neurol. – 2004. – Vol. 38, №11. – P. 1076–1082.
5. Rajnoch J. Angiogenesis and organ transplantation / J. Rajnoch, O. Viklicky // Folia. Microbiol. – 2004. – Vol. 49, №5. – P. 499–505.
6. Uzan G. Therapeutic use of stem cells. II. Adult stem cells / G. Uzan // Rev. Prat. – 2004. – Vol. 54, №14. – P. 1515–1527.
7. Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin / M. Stashower, K. Smith, J. Williams, H. Skelton // Dermatol. Surg. – 1999. – № 25. – P. 945–952.
8. Стромальные клетки предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании / А. Ю. Петренко, Ю. А. Петренко, Н. Г. Скоробогатова [и др.] // Журн. АМН України. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 354–365.
9. Katz A. J. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal cells / A. J. Katz, A. Tholpady, S. S. Tholpady // Stem Cells. – 2005. – Vol. 23. – P. 412–423.
10. Andrews R. G. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors / R. G. Andrews, J. W. Singer, I. D. Bernstein // Blood. – 1986. – Vol. 67. – P. 842–849.
11. Hirose M. Treatment of osteo-articular diseases using cultured autologous mesenchymal cells / M. Hirose, H. Ogushi // Nippon Naika Gakkai Zasshi. – 2003. – Vol. 92, №9. – P. 1781–1786.
12. Mizuno H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells / H. Mizuno, H. Hyakusoku // J. Nippon Med. Sen. – 2003. – Vol. 70, № 4. – P. 300–306.
13. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т. А. Князева // Вестн. акад. мед. наук СССР. – 1974. – № 12. – С. 3–8.

Отримано 30.11.12