

УДК 617.57/58-005.4-092.4:612.1:576.354

Д. Б. Домбровський  
Є. Б. Медведський  
М. Ф. Дрюк

Національний інститут хірургії та  
трансплантології ім. О. О. Шалімова  
АМН України, м. Київ

## СТИМУЛЯЦІЯ ПРОЦЕСІВ АНГІОГЕНЕЗУ МУЛЬТИПОТЕНТНИМИ СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ ІШЕМІЇ КІНЦІВКИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**Ключові слова:** ішемія кінцівок,  
реваскуляризація, жирова тканина.

**Резюме.** Проведені експериментальні дослідження на лабораторних тваринах з моделювання ішемії кінцівки. Застосовуючи методи гістологічних досліджень м'язової тканини та методи електронної мікроскопії ендотеліоцитів капілярів, доведено активацію процесів ангіогенезу в експерименті при застосуванні аутотрансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини при ішемії кінцівки.

### Вступ

Кількість хронічних облітеруючих захворювань артерій кінцівок неухильно прогресує. Лікування такої патології є однією з найбільш складних проблем ангіології, особливо при ураженні артерій гомілки і стопи. За даними авторів 40% хворих, що страждають на захворювання судин, мають периферійну форму ураження магістральних артерій [1, 2].

Для поліпшення кровообігу активно розробляються методи стимуляції неоангіогенезу шляхом введення в організм ангіогенних чинників [3–5]: судинного ендотеліального фактора росту, фактора росту фібробластів, тромбоцитозалежного фактора росту, фактора росту гепатоцитів.

Іншим напрямком досліджень є використання клітинних технологій, стимуляції хемотаксису ангіогенних клітин у вогнищі ураження, або введення ззовні клітин, що стимулюють процеси ангіогенезу.

Із жирової тканини пацієнтів, отриманої при косметичній операції ліпосакції, отримана васкулярно-стромальна фракція і виділена популяція мультипотентних стромальних клітин [6, 7]. Обробка 300 мл ліпоаспірата дозволяє отримати  $2-6 \times 10^8$  таких клітин [8] або, за даними інших авторів,  $404 \pm 206$  тис. клітин на 1 мл аспірату.

### Мета дослідження

Вивчити результати стимуляції процесів ангіогенезу мультипотентними стромальними клітинами жирової тканини за умов ішемії кінцівки в експерименті.

### Матеріал і методи

Проведені експериментальні дослідження на 50 нелінійних білих щурах. Тварини поділені на

дві групи: I група – тварини, в яких змодельована ішемія кінцівки, II група – тварини, яким на фоні ішемії кінцівки вводилися васкулярно-стромальна фракція жирової тканини. Усі оперативні втручання на щурах проводилися під кетаміновим наркозом. Середня маса щурів складала  $374,23 \pm 7,56$  г., вік  $6 \pm 1,2$  місяці, що утримувались при кімнатній температурі, на звичайному лабораторному раціоні. Оперативні втручання проводилися на базі експериментального відділу Національного інституту хірургії та трансплантології АМН України. Моделювання ішемії тканини кінцівки у щура проводилося за методом Т.А.Князевої [9].

Для отримання стромально-васкулярної фракції збагаченої мультипотентними стромальними клітинами жирову тканину щура, яка отримана з передочеревенного жиру передньої черевної стінки. Після значного подрібнення жирову тканину обробляли колагеназою (фрагменти жирової тканини інкубували у 0,075% розчині колагенази тип I впродовж 30 хв). Потім отриману суміш розводили втричі фосфатним буфером Дульбеко і інтенсивно струшували впродовж 2–3 хв. Після центрифугування (10 хв. при 2500 об/хв) жирове кільце і супернатант видаляли, а осад, який містив мультипотентні клітини строми, судин, лейкоцити, еритроцити ресуспендували в фізіологічний розчин. Стромально-васкулярну фракцію жирової тканини вводили в ішемізовані кінцівки на 3 добу після моделювання ішемії підфасціалью тонкою смужкою на медіальній поверхні стегна. У всіх дослідних та контрольних груп тварин по закінченню терміну дослідження взята м'язова тканина медіальної та латеральної поверхонь стегна на боці проведення експериме-

нту на 3, 5, 7, 14, 21 та 25 доби після моделювання ішемії на кінцівці для гістологічного та електонномікроскопічного дослідження.

### Обговорення результатів дослідження

При гістологічному дослідженні матеріалу I групи тварин зміни м'язових волокон і судин можна об'єднати в декілька підгруп: 1–3 доба ішемії; 7–15 доба і 20–25 доба за характером морфологічних змін структури тканин.

Слід зазначити, що на 1–3 добу перебігу експериментальної ішемії спостерігалися зміни у вигляді розладу кровообігу і реологічних властивостей крові в судинах, особливо венозних у всіх спостереженнях. На першу, частіше в другу і третю добу, у венозних судинах виражено вогнищеве повнокрів'я та стаз еритроцитів (рис. 1).

Разом з периваскулярним набряком, частина ендотеліальних клітин судин некротизована, злущена. Стінка судин нерівномірно інфільтрована макрофагами, лімфоцитами. Дистрофія і периваскулярний набряк м'язових волокон, носила вогнищевий, нерівномірний характер, зникала поперечна посмугованість. На 7-15 добу спостерігаються зростання деструктивних процесів у м'язових волокнах з наявністю вогнищ некрозу, ліпідної дистрофії, вакуолізації і набряку. У стінці судин спостерігалось зростання десквамації ендотеліальних клітин, їх некроз, облітерація судин. Траплялися вогнища крововиливів на тлі набряку між м'язових ділянок, разволокнення і набряк стінки судин. В окремих спостереженнях (10 доба) виникали вогнища лімфо-макрофагальної гістіоцитарної реакції.

На 20-25 добу експериментальної ішемії розлади кровообігу спостерігали в судинному руслі зна-

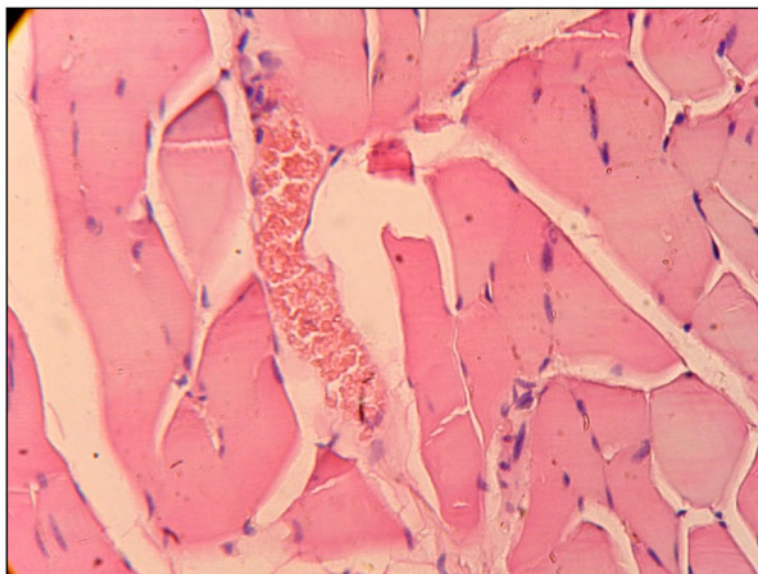
чно менше повнокрів'я і стаз у більшості спостережень (рис. 2). Проте в багатьох спостереженнях траплялися вогнища фуксінофілії і периваскулярного склерозу (фіброзу). Слід зазначити, що до 20-25 доби, з'являлися фібропластичні зміни стінки судин, потовщення і фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучної тканини.

При проведенні ультраструктурних досліджень I групи тварин у цитоплазмі ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини траплялися поодинокі вільні рибосоми, пластинчастий комплекс Гольджі у вигляді сплоснених цистерн і дрібних везикул, які часто розташовувалися компактно поблизу ядра. Навколяядерна зона містить різко просвітлений матрикс.

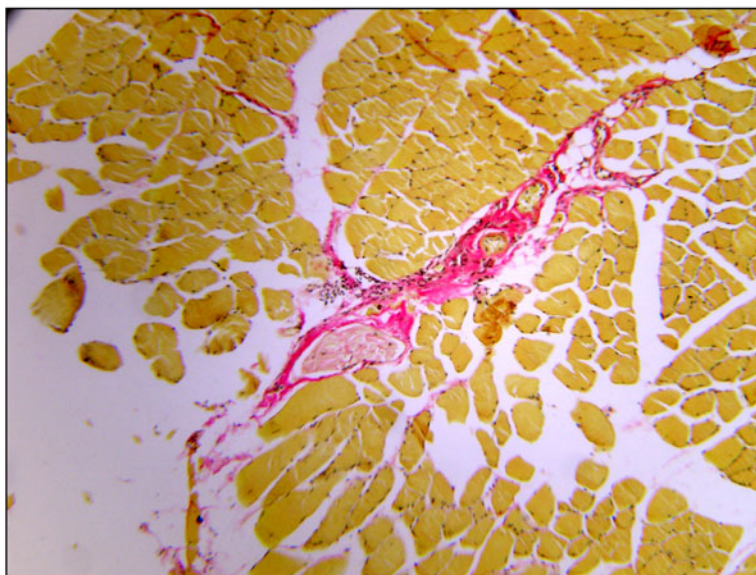
У деяких клітинах вільний край цитоплазми з незначною кількістю широких і коротких цитоплазматичних відростків, в яких відсутні мікропіноцитозні везикули. На люмінальній поверхні ендотеліоцитів з'являлися поодинокі ворсинки і брунькоподібні вирости, що збільшували робочу поверхню капілярів (рис. 3).

Ущільнені ділянки цитоплазми в межах однієї клітини чергувалися з ділянками низької щільності. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум майже у всіх клітинах слабо розвинений і розширений, його профілі заокруглені. Гранули глікогену не виявляли. Мітохондрії клітин зберігали нетипову структуру у вигляді дрібних, не чисельні крист з розширеними інтракристними проміжками.

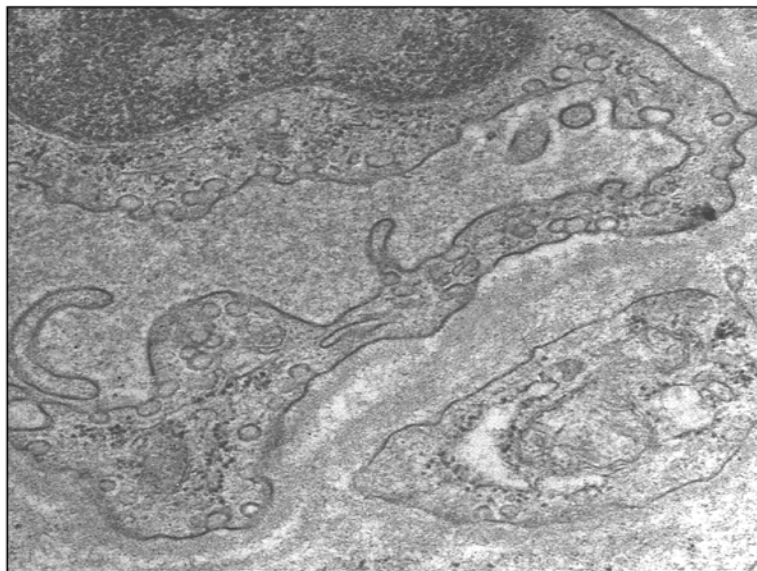
Наслідком неконтрольованого підвищення проникності стінки судини є субендотеліальний набряк з відшаруванням ендотеліальних острівців, що збереглися, деструкцією фібрилярної структури аморфної речовини субендотеліальної зони, накопиченням великодисперсних білків



**Рис. 1.** Група I. Друга доба після ішемії. Вогнище повнокрів'я і стази у венулі, периваскулярний набряк. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофотографія. Об.10; Ок. 40.



**Рис. 2.** Група I. Двадцять п'ять доба ішемії. Звичайна структура судин і міопласта з ділянками периваскулярного фіброзу. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван-Гісона. Мікрофотографія. Об.10; Ок. 10.



**Рис. 3.** Наявність на люмінальній поверхні ендотеліоцитів великих мікрроворсинок і виступів. x 18000.

плазми і продуктів порушеного тканинного метаболізму.

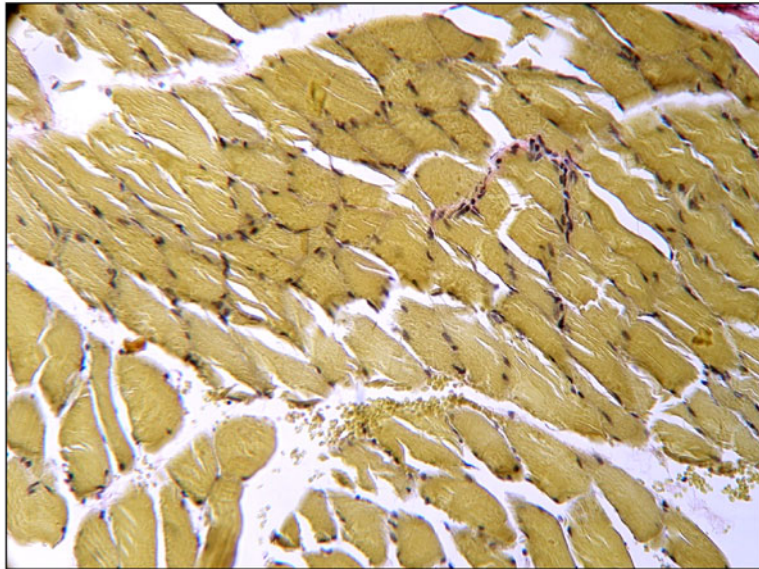
Виявляли зміни мітохондріальної системи, а саме: дисконкомплексція і вирівнювання крист, дисоціація їх мембран. В інших клітинах, де спостерігалася гіперосмія, відбувалося порушення білкового обміну. У таких клітинах мітохондрії не піддавалися значним змінам. Неклітинний компонент базального шару стає чіткішим, особливо його фібрилярна частина.

Ультраструктурні зміни мали місце у всіх термінах спостереження I групи тварин з незначною тенденцією до зменшення проявів на 20-25 добу перебігу експерименту.

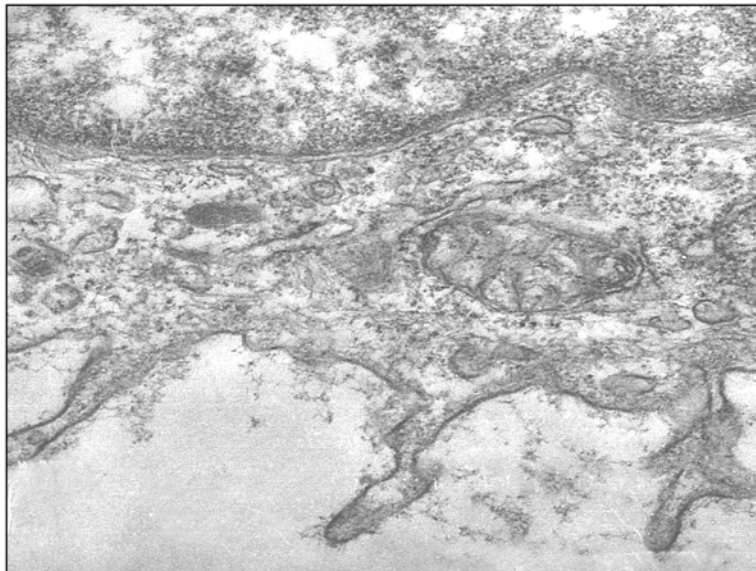
Гістологічно при дослідженні міосимпласту щурів II групи виявлені зміни, які, в основному, представлені розладом кровообігу і дистрофією з нерівномірним повнокрів'ям і стазами в судинах венозного типу. У всіх спостереженнях відмічені на 7 добу проведення експерименту зміни, що стосуються розладу кровообігу, які носили вогнищевий характер і перебігали на тлі дистрофії м'язових волокон, втрати поперечної посмугованості (рис. 4).

На 10-15 і 20-25 доби відбулися структурні зміни характерні для гіпоксії. Поступово зникали і, в більшості досліджень, вже не виявлялися. Паралельно, відмічені початкові прояви регенерації з проліферацією фіброblastів і вираженою





**Рис. 4.** Група II. Сьома доба. Вогнища макрофагальної і фібробластної проліферації в міопласті. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван-Гізона. Мікрофотографія. Ок. 10; Об. 10.



**Рис. 5.** Фрагмент ендотеліоцита з ознаками вираженої функціональної активності. x 28000.

макрофагальною реакцією в ендомізії і перимізії м'язової тканини.

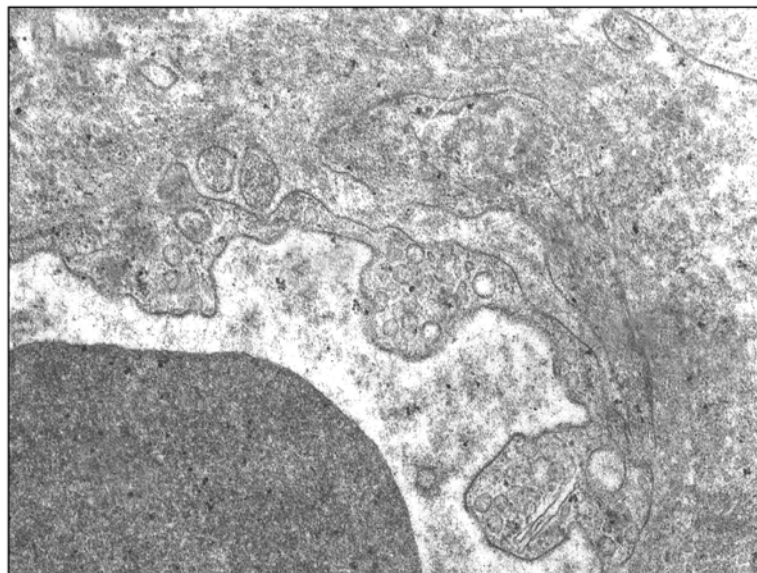
При проведенні електронномікроскопічних досліджень на 3 добу після трансплантації стромальної фракції жирової тканини спостерігалось збільшення просвіту існуючих капілярів, поява клітинних тяжів, що складаються з ендотеліоцитів. Також мало місце появи великої кількості активно функціонуючих мезенхімальних клітин та ендотеліоцитів, про що свідчила наявність великої кількості виростів клітинної мембрани.

Про посилення білкового обміну в ендотеліоцитах свідчить розширений гранулярний ретикулум, гіперосмований матрикс мітохондрій та поява досить значної кількості полісом, окремих

везикулярних структур в цитоплазмі та великих мікроворсинок (рис. 5).

Хроматин розташовується в центральних ділянках ядра відносно рівномірно, а по периферії - концентрується у вигляді суцільних електронно-щільних мас. Звертало на себе увагу звивини ядерної оболонки.

Новоутворені ендотеліоцитоподібні клітини мають великі ядра, чітко виражені структури матриксу цитоплазми, наявність вільних рибосом і поодиноких піноцитозних везикул. У цитоплазмі ендотеліоцитів спостерігалися мітохондрії із звичайною щільністю матриксу; профілі зернистої ендоплазматичної мережі, мікротрубочки, множинні рибосоми і тельця Вейбеля – Палладе.



**Рис. 6.** Молодий капіляр, що містить високодиференційований ендотелій з наявністю функціонально активних ендотеліоцитів. x 20000.

На 22-25 добу спостереження новоутворені судини починають анастомозувати і утворюють судинну мережу за рахунок злиття капілярів, що ростуть. Бічні межі клітин звивисті і в розширених ділянках міжклітинного простору спостерігався електроннощільний матеріал. Тонка базальна мембрана переважно в найдрібніших капілярах характеризувалися шаруватістю. Зовнішня оболонка представлена адвентиціальними клітинами.

Молоді клітини характеризувалися помірною осміофілією, наявністю цитоплазматичних відростків, великих мітохондрій і вакуолярних структур. Ядро має електроннощільну нуклеоплазму, грубозернистий хроматин, зібраний в скупчення і розташований ексцентрично біля внутрішньої ядерної мембрани. Краї ядер нерівні, перинуклеарний простір місцями розширений. Ядра компактної або пухкої структури (рис. 6).

Ендоплазматичний ретикулум представлений короткими нечисленними трубочками. Пластинчастий комплекс має як дрібні везикули, так і розширені цистерни, розташовані в різних ділянках цитоплазми.

### Висновки

1. В ендотелії капілярів ішемізованих м'язів спостерігаються деструктивні зміни, які характеризуються як порушення ультраструктури клітинних органел, так і повною руйнацією клітин і базальної мембрани. Процеси деструкції клітин і капілярів загалом продовжуються до 20 доби перебігу експерименту, після чого відмічається незначне фізіологічне відновлення структури капілярів, змінами в органах ендотеліоцитів і, лише на 25 добу спостерігаються перші прояви

регенераторних процесів, які поєднуються з розвитком фібродистрофічних змін тканини.

2. Трансплантація мультипотентних стромальних клітин жирової тканини на фоні ішемії м'язів на 3 добу спричиняє активні процеси компенсування ішемічного ураження. На 7 добу з'являються молоді ендотеліоцитоподібні клітини з ознаками активних пластичних та енергетичних процесів. На 12 і на 14 доби експерименту з'являються молоді ендотеліоцити, утворюються "бруньки росту" нових капілярів, а також утворюються трубочки ендотеліоцитів, які в подальшому вже на 22 добу після трансплантації утворюють розгалужену, активно функціонуючу мережу новоутворених капілярів.

### Перспективи подальших досліджень

Проведені експериментальні дослідження дозволяють зробити висновок про ефективність застосування за ішемічних розладів м'язів трансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини з метою стимуляції процесів ангиогенезу та вказують на доцільність проведення досліджень цього напрямку в клінічних умовах.

**Література.** 1. Покровский А.В. Артериализация венозного кровотока стопы в спасении конечности от ампутации у больных облитерирующим тромбангиотом с окклюзией артерий голени и стопы при критической ишемии / А.В.Покровский, В.Н.Дан, А.В.Чупин // *Ангиология и сос. хирургия.* – 2000. – Т.6, №1. – С.86-88. 2. Wasiak K. Surgical results of leg amputation according to Ghormley's technique in the treatment of chronic lower limb ischaemia / K. Wasiak, P.M. Paczkowski, J.M. Garlicki // *Acta Chir. Belg.* – 2006. – №106(1). – P.52-56. 3. Вачев А.Н. Микрохирургическая ауто-трансплантация большого сальника на нижнюю конечность при критической ишемии у больных с облитерирующим тромбангиотом / А.Н.Вачев, М.С.Михайлов, А.В.Новожилов // *Ангиология и сосудистая хирургия.* – 2008. – Т. 14, №3. – С. 107-110. 4. Зусманович Ф.Н. Ревас-

куляризирующая остеотрeпанация (РОТ) в лечении хронической критической ишемии / Ф.Н.Зусманович // Хирургия. – 1999. - №4. – С. 10-12. 5. *Rissanen T.* Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb - on the way to the clinic / T.Rissanen, I.Yajanto, Yla- S. Herttuala // European J. of Clinical Investigation. - 2001. - №31. - P. 651-658. 6. *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. 7. *Zuk P.A.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P.A.Zuk, M.Zhu, P.Ashjian // Mol. Biol. Cell. – 2002. - №13. – P. 4279-4295. 8. *Zuk P.A.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A.Zuk, M.Zhu, H. Mizuno // Tissue. Eng. - 2001. - vol. 7. - P. 211–218. 9. *Князева Т.А.* Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т.А.Князева // Вестн. Акад. Мед. наук СССР. – 1974. - №12. – С.3-8.

#### СТИМУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ АНГИОГЕНЕЗА МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Д. Б. Домбровский, Е. Б. Медведский, М. Ф. Дрюк*

**Резюме.** Продолжаются поиски новых методов прямой ревазуляризации при ишемии конечностей, когда выполнение реконструктивных оперативных вмешательств на артериях невозможно. Жировая ткань, является доступным и достаточным источником мультипотентных клеток. Проведены экспериментальные исследования на лабораторных животных с моделированием ишемии конечности. Применяемые методы гистологических исследований и методы элек-

тронной микроскопии доказана активация процессов ангиогенеза в эксперименте при применении аутотрансплантации мультипотентных стромальных клеток жировой ткани при ишемии конечности.

**Ключевые слова:** ишемия конечностей, ревазуляризация, жировая ткань.

#### STIMULATION OF ANGIOGENESIS PROCESSES WITH MULTIPOTENT STROMAL CELLS OF ADIPOSE TISSUE UNDER CONDITIONS OF EXTREMITY ISCHEMIA IN EXPERIMENT

*D. B. Dombrovsky, Ye. B. Medvedsky, M. F. Druk*

**Abstract.** The searches of new methods of indirect revascularisation in case of ischemia of extremities, when implementation of reconstructive operative interferences on arteries is not possible. Adipose tissue, is the accessible and sufficient source of mesenchymal stem cells. Experimental researches are conducted on laboratory animals with the design of ischemia of extremity. Applying methods of histologic investigations and electronic microscopy activation of angiogenesis processes in the experiment applying autotransplantation of mesenchymal stem cells of adipose in case of extremity ischemic has been proved.

**Keywords:** ischemia of extremities, revascularisation, adipose tissue.

**O. O. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantation of AMS of Ukraine (Kyiv)**

*Clin. and experim. pathol. - 2009. - Vol.8, №4 (30). - P.28-33.*

*Надійшла до редакції 20.12.2009*

*Рецензент – проф. В. П. Польовий*

*© Д. Б. Домбровский, Е. Б. Медведський, М. Ф. Дрюк, 2009*