



Ю. В. Поляченко, М. Ф. Дрюк,  
Д. Б. Домбровський

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

© Ю. В. Поляченко, М. Ф. Дрюк,  
Д. Б. Домбровський

## МЕТОД НЕПРЯМОЇ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ КІНЦІВОК ШЛЯХОМ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

**Резюме.** Питання застосування клітинних технологій з метою стимуляції процесів ангиогенезу за умов ішемії на сьогодишньому етапі розвитку науки досить актуально, тому тривають пошуки нових джерел клітин-стимуляторів неоваскулогенезу. Проведені експериментальні дослідження на щурах із моделюванням ішемії кінцівки в рамках доклінічних досліджень, які показали доцільність застосування стромальних клітин, що виділені з жирової тканини за умов ішемії кінцівки. Метою роботи було дослідити гістологічні та імуногістохімічні зміни в м'язовій тканині після трансплантації мультипотентних стромальних клітин власної жирової тканини у хворих за умов ішемії кінцівки. Проведені гістологічні та імуногістохімічні дослідження (визначення експресії антитіл до фактора Віллебранда, колагену IV типу та віментину) процесів, що відбуваються у м'язовій тканині після введення мультипотентних стромальних клітин власної жирової тканини хворого. Показано зниження ішемічного ушкодження міофібрил, швидку активацію регенераторних сил м'яза. Імуногістохімічним методом виявлено чітку стимуляцію процесів ангиогенезу через 3 місяці після трансплантації клітин.

**Ключові слова:** *хронічна ішемія, непрямая реваскуляризація, жирова тканина.*

### Вступ

Лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок при оклюзійних та облітеруючих ушкодженнях судин залишається однією із складних проблем судинної хірургії. Незадоволення хірургів існуючими методами лікування хронічної ішемії кінцівок змусило шукати нові методи лікування хворих з даною нозологією. Розвиток біотехнології, молекулярної і клітинної біології в останні роки зробив клітину засобом лікування багатьох захворювань [1], в тому числі хронічних ішемічних станів [5, 7] у поєднанні із шунтуючими операціями [4]. Майбутнє клітинної терапії і трансплантології пов'язано із використанням стовбурових клітин, які застосовуються з метою заміщення структурної і функціональної недостатності різних органів [3].

Переваги використання аутологічних стовбурових клітин для трансплантаційної медицини очевидні: необмежена доступність, короткий час очікування результатів і відсутність імуносупресивної терапії з її негативними побічними ефектами [2]. У наш час опубліковані повідомлення про клінічне використання стовбурових клітин, виділених із пуповини, що є етично прийнятним і перспективним. Розробляються інші альтернативні шляхи одержання стовбурових клітин людини, які використовують як джерело гемопоетичних стовбурових клітин, і для відновлення кровотоку в ішемізованих органах і тканинах [9, 10].

Мезенхімальні стромальні клітини, що отримують при ферментативній обробці жирової ткани-

ни, мають схожу з поліпотентними мезенхімальними стромальними клітинами кісткового мозку здатність диференціюватися в клітини як мезенхімального, так і немезенхімального походження. За допомогою підбору спеціальних середовищ і умов культивування вдається диференціювати ендотеліальні клітини в гладком'язові, попередники ендотеліальних клітин — у кардіоміоцити [4]. Стромальні клітини жирової тканини є популяцією, що мають високу пластичність, високу інтенсивність проліферації, високий потенціал диференціації і легко піддаються трансфекції. При чималому вмісті даного типу клітин у жировій тканині, відносній безпеці і низькій травматичності вони є перспективними кандидатами для аутологічної трансплантації.

Нами проведені експериментальні дослідження на щурах з вивчення впливу стромально-васкулярної фракції на експериментальну ішемію кінцівок. Робота проводилася в межах етапу доклінічного дослідження з оформленням протоколу доклінічного дослідження згідно з наказом МОЗ України від 10.10.2007, № 630 «Про затвердження порядку проведення клінічних випробувань тканинних та клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань». Доклінічні дослідження підтвердили значну активацію процесів ангиогенезу та суттєве зменшення ішемічного впливу в умовах експериментальної ішемії.

Метою нашої роботи було визначити гістологічні та імуногістохімічні зміни, що відбуваються

у м'язах ішемізованої кінцівки хворих на облітеруючі захворювання артерій кінцівок після трансплантації мультипотентних стромальних клітин власної жирової тканини.

### Матеріали та методи

Розроблена технологія проведення трансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини хворим на хронічну ішемію кінцівок, яка включає в себе на першому етапі отримання жирової тканини шляхом ліпоаспірації. Консервована жирова тканина транспортувалася в Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), де на кафедрі біохімії (зав. кафедрою проф. А. Ю. Петренко) проводилося виділення стромально-васкулярної фракції жирової тканини. Частину з отриманих клітин у відповідних умовах транспортували для введення хворому. Отримані клітини стромально-васкулярної фракції вводили внутрішньом'язово в кінцівку (сегмент «гомілка-стопа»). Інша частина отриманих клітин залишалася для подальшого культивування та експансії на живильному середовищі. Через 2—3 тижні, після 3-го пасажу клітини знімали з середовища та транспортували для повторної пересадки хворому в ішемізовану кінцівку. Трансплантацію клітин проводили внутрішньом'язово у зону ішемії в ділянках оклюзованих артерій. Перед трансплантацією та через 3 місяці після першої трансплантації отримували біопсійний матеріал м'язів ішемізованої кінцівки для наступного проведення гістологічних та імуногістохімічних досліджень.

При проведенні дослідження застосовували загальногістологічний метод за стандартною схемою. Тканини готували за загальноприйнятою методикою. Після фіксації у формаліні та спиртах матеріал обробляли в парафіновій заливці, зрізи фарбували гематоксилін-еозином та пікрофуксином за Ван-Гізеном.

При проведенні імуногістохімічних досліджень застосовували непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення рівня експресії антигенів віментину, фактора Віллебранда та колагену IV типу. Протокол забарвлення: депарафінізація шматочків тканини на скло, промивають дистильованою водою, демаскують протейназою К, блокують пероксидазним блоком, промивають в PBS-буфері, наносять Ультра-блок, знову промивають в PBS-буфері, наносять первинні антитіла до відповідного антигену на одну годину, промивають в PBS-буфері, наносять посилювач первинних антитіл і потім вторинні антитіла. Промивають в PBS-буфері, наносять АЕС — хромоген-розчин на 10 хвилин, знов промивають дистильованою водою і фарбують метиленовим зеленим.

Методика трансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини застосована у 7 пацієнтів із проявами хронічної іше-

мії нижніх кінцівок, у хворих на облітеруючий ендартеріїт (3 пацієнтів), облітеруючий атеросклероз (2) та постемболічну оклюзію (2) артерій в стегнево-підколінному сегменті. Чоловіків було 6, жінок — 1. Середній вік хворих складав 42,5 року. Обстеження хворих до операції включало доплерографію артерій, рентгенконтрастну ангіографію, лазерну флуометрію мікроциркуляторного русла. У всіх хворих було констатовано неможливість виконання реконструктивних оперативних утручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки.

### Результати дослідження та їх обговорення

При дослідженні м'язової тканини ішемізованої кінцівки до введення мультипотентних стромальних клітин жирової тканини, в м'язових симпластах мають місце виражені зміни мозаїчного характеру: вогнища пошкоджень з фіброзними структурами з порушенням архітекtonіки оточують деструктивні і дистрофічні симпласти (рис. 1), або судинні «пучки», судини в яких утворюють клубочки або розташовуються окремо. Зазначені судини оточені фіброзними, колагеновими волокнами, просвіт судин в цих утвореннях звужений або закритий, тобто спостерігається початкове формування сполучнотканинних вогнищ рубця з невеликою кількістю м'язових волокон, що вказує на спотворення регенераторних процесів з переважанням деструкції над регенерацією міонів.

У пухкій сполучній тканині перимізію найчастіше виявляються фібробласти, частина яких дегенерує і руйнується. Оновлення популяції фіброblastів, клітин ендотелію і проміжних структур пухкої сполучної тканини спостерігається рідко. Постійна перебудова пухкої сполучної тканини не виражена.

Мезенхимоподібні клітини переважно розташовуються в периваскулярних зонах. Таку периваскулярну локалізацію займають також перицити. Останні складають особливу лінію розвитку периваскулярних клітин, і вони були сполучнотканинними відросчатими клітинами, що розташовані в розщеплюваннях базальної мембрани ендотелію судин мікроциркуляторного русла. Такі зони пухкої сполучної тканини перимізію, мабуть, є «мезенхімальним резервом» материнського ложа.

Гістологічно в досліджуваних тканинах на цьому етапі спостережень також є невеликі вогнища зі «збереженими» міосимпластами, в яких окремі м'язові волокна гіпертрофовані, тобто виявляються вогнища з компенсаторними реакціями (рис. 2). Проте в перимізії формуються фіброзні вогнища.

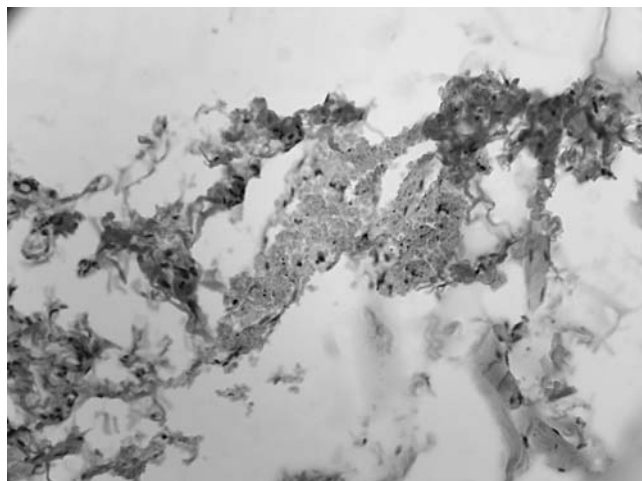
При імуногістохімічному дослідженні експресія віментину у вогнищах судинних пучків перимізію нерівномірною (рис. 3).

Імуногістохімічне визначення експресії фактора Віллебранда, що є маркером ангіогенезу в цій групі, виявило відсутність його експресії (рис. 4).

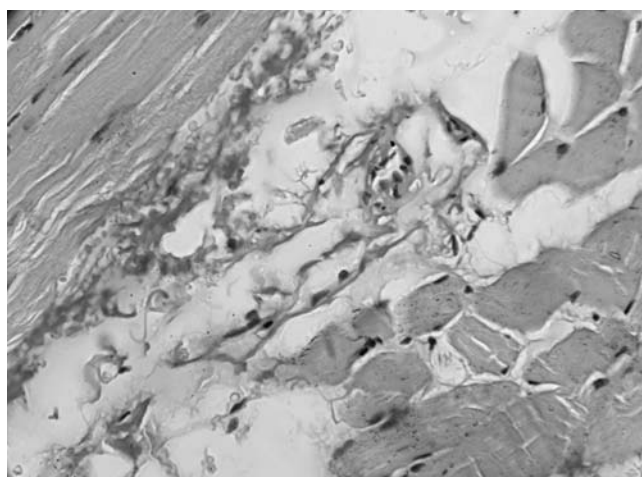


Гістологічно при дослідженні м'язової тканини через 3 місяці після проведення трансплантації клітин в більшості випадків має місце переважання ділянок міосимплатів у супроводі новоутворених судин, що знаходяться в перимізії (рис. 5), структура симплатів протягом великої відстані не порушена.

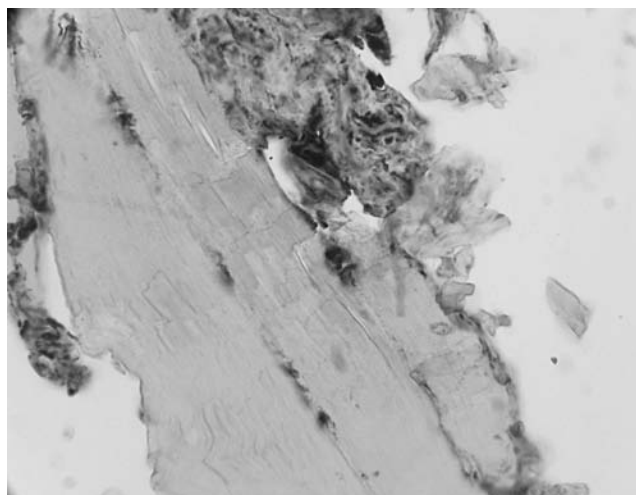
Найбільш виражені скупчення клітин розташовуються в колі новоутворених капілярів. На окремих ділянках спостерігався яскраво виражений поліморфізм клітин. Зона проліферації характеризується безліччю недиференційованих і малодиференційованих клітин, кровоносних судин. Молода сполучна тканина має добре виражену судинну мережу, артеріоли і венули розташовані попарно, впорядковано, орієнтовані переважно паралельно колагеновим волокнам, мають направлений хід. У багатьох спостереженнях виявляються мікровогнища, що «насичені» ліпідними компонентами в проміжній перимізіальній тканині.



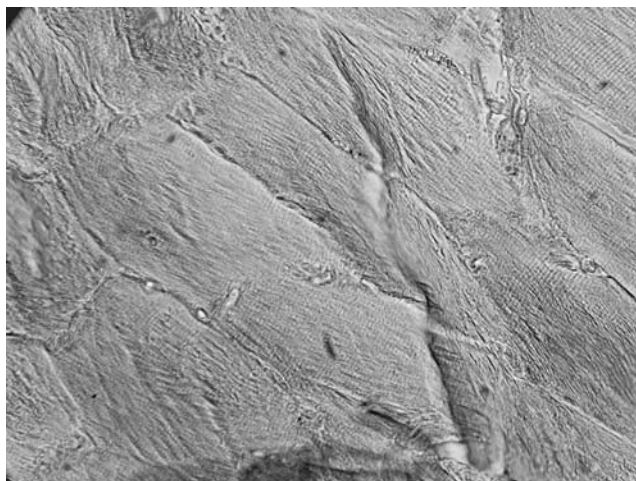
**Рис. 1.** Фіброзна тканина, що оточена дистрофічно зміненим симплатом. Фарбування пікрофуксином за Ван-Гізоном. Мікрофотографія. Ок.10; Об.10.



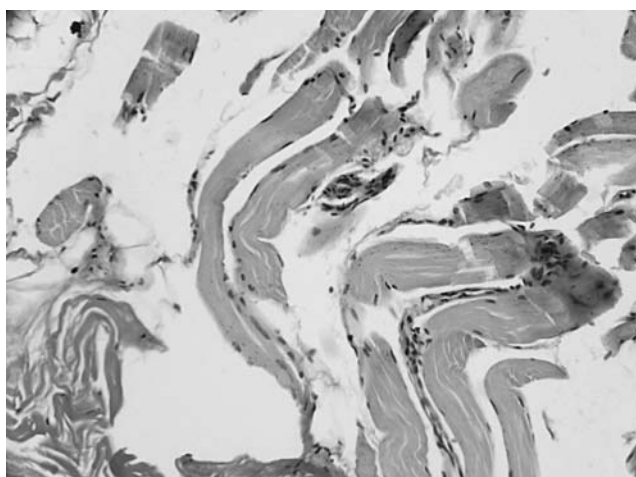
**Рис. 2.** Вогнища гіпертрофії м'язів, периваскулярний набряк, формування фіброзних вогнищ. Фарбування пікрофуксином за Ван-Гізоном. Мікрофотографія. Ок.10; Об.20.



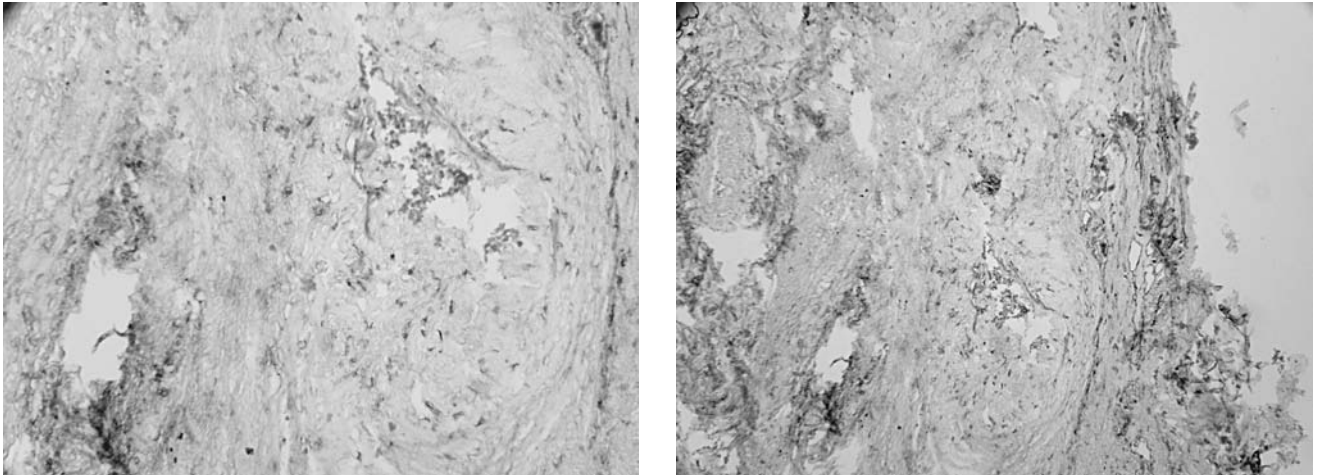
**Рис. 3.** Міосимплат. Експресія мезенхімального фактора віментину в судинних пучках перимізії з порушенням їх архітекτονіки. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбуванням гематоксилином Маєра. Мікрофотографія. Ок. 10; Об. 20.



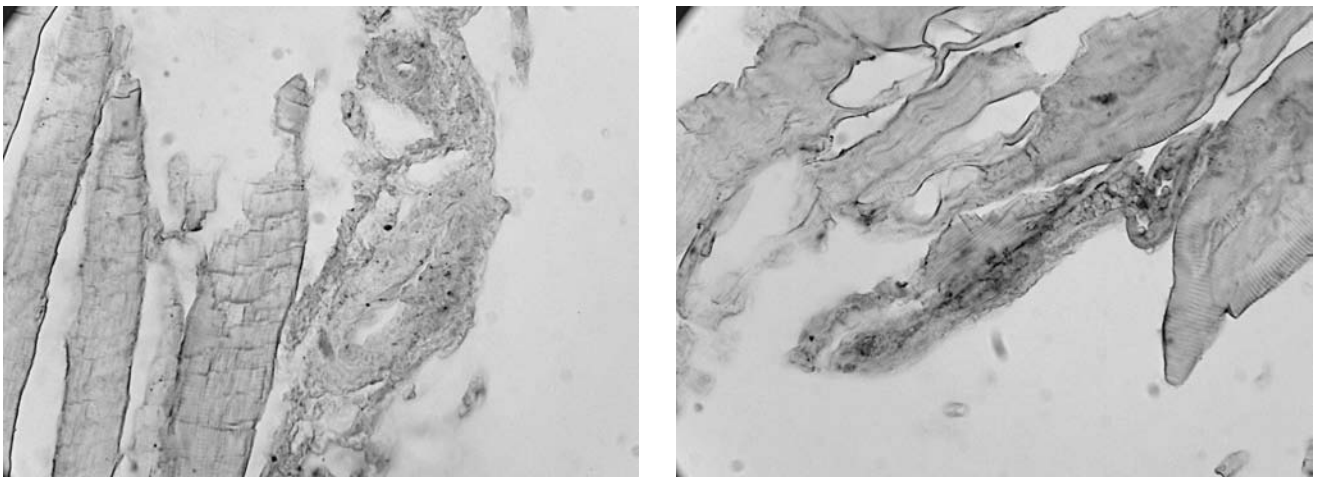
**Рис. 4.** Експресія фактора Віллебранда через 3 місяці після трансплантації Ок. 10; Об. 20.



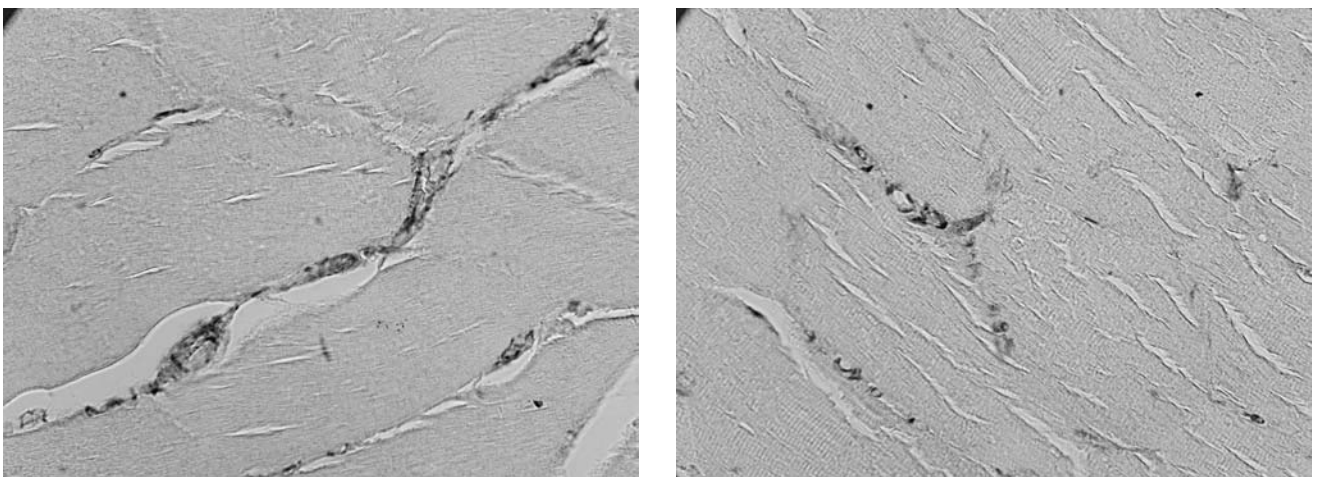
**Рис. 5.** Міосимплат із вогнищами новоутворених капілярів. Фарбування пікрофуксином за Ван-Гізоном. Мікрофотографія. Ок. 10; Об.40.



**Рис. 6.** Експресія мезенхімального фактора віментину в структурах пери- і ендомізію. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбуванням гематоксиліном за Маєром. Ок. 10; Об. 20.



**Рис. 7.** Експресія колагену IV типу. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення колагену IV типу з дофарбуванням гематоксиліном за Маєром. Ок. 10; Об. 20.



**Рис. 8.** Значно виражена експресія фактора Віллебранда у сформованих судинах через 3 місяці після трансплантації. Ок. 10; Об. 20.



Клітинна інфільтрація в місцях активної проліферації мезенхімоподібних клітин неясково виражена. Зростання судин відбувається відносно рівним фронтом у зонах, що мають волокнистий каркас з однотипних волокон, і сповільнюється при зустрічі з крупнішими пучками.

У цих ділянках судинна і клітинна інфільтрація відбувається по прошарках пухкої сполучної тканини між пучками колагенових волокон. Інфільтрат утворений поліморфноядерними лейкоцитами, макрофагами і фібробластами.

Імуногістохімічно експресія віментину (рис. 6) та колагену IV типу (рис. 7) виявлена в більшості спостережень у вигляді окремих мікровогнищ в ділянках формування новоутворених судин, в окремих клітинних структурах пери- і ендомізію.

Найбільш виражена в цей термін саме експресія фактора Віллебранда у вигляді виражених кровеносних капілярів та мікросудин (рис. 8) у перимізії міосимпластів та мікровогнища в ендомізії.

У всіх досліджуваних хворих отримані позитивні клінічні результати. При проведенні інструментальних досліджень мало місце збільшення сегментарного тиску на ішемізованій кінцівці

у середньому на 15—20%. Дані лазерної флуометрії свідчили про покращання мікроциркуляції в дистальних відділах кінцівки вже через місяць після проведення клітинної трансплантації.

### Висновки

1. Трансплантація мультипотентних стромальних клітин жирової тканини у хворих на хронічну ішемію кінцівок приводить до активації регенераторних процесів з утворенням молодих міонів та зменшенням фібро-дистрофічних змін м'язової тканини.

2. Імуногістохімічні дослідження підтверджують активацію через 3 місяці після трансплантації процесів ангиогенезу, про що свідчить експресія фактора Віллебранда у вогнищах перимізію, експресія віментину та колагену IV типу в ділянках новоутворених судинних пучків.

3. Трансплантація мультипотентних стромальних клітин жирової в зону ішемії у хворих із облітеруючими захворюваннями артерій кінцівок може бути застосована як ефективний метод прямої реваскуляризації кінцівки.

### ЛІТЕРАТУРА

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. *Кордюм В.А.* Стволовые клетки и их терапевтический потенциал / В.А. Кордюм, Е.Г. Дерябина // Мистецтво лікування. — 2004. — №2. — С. 7—9.

3. *Репин В.С.* Эмбриональная стволовая клетка: от фундаментальных исследований в клинику / В.С. Репин // Патол. физиол. и эксп. тер. — 2001. — №2. — С. 3—8.

4. *Diehm N. Cremonesi A.* Clinical endpoints in peripheral endovascular revascularization trials: a case for standardized definitions / N. Diehm, P.M. Pattynama, M.R. Jaff // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. — 2008. — Vol. 36, №4. — P. 409—419.

5. *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.

6. Prevention of limb amputation in patients with limb ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation / A. Kawamura, T. Horie, I. Tsuda [et al.] // Ther. Apher. Dial. — 2005. — Vol. 9, №1. — P. 59—63.

7. *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.

8. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes / C. Badorff, R.P. Brandes, R. Popp [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 107. — P. 1024—1031.

9. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation / R. Nizankowski, T. Petriczek, A. Skotnicki, A. Szczeklik // Kardiol. Pol. — 2005. — Vol. 63, №4. — P. 351—360.

10. Therapeutic angiogenesis of critical lower limb ischemia. Review of the literature and prospects of research on stem cells / R. Di Stefano, U. Limbruno, D. Barone, A. Balbarini // Ital. Heart. J. Suppl. — 2004. — Vol. 5, №1. — P. 1—13.

МЕТОД НЕПРЯМОЙ  
РЕВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ  
КОНЕЧНОСТЕЙ ПУТЕМ  
ТРАНСПЛАНТАЦІЇ  
МУЛЬТИПОТЕНТНИХ  
СТРОМАЛЬНИХ КЛІТОК  
ЖИРОВОЇ ТКАНИ

*Ю. В. Поляченко, Н. Ф. Дрюк,  
Д. Б. Домбровский*

**Резюме.** Вопрос применения клеточных технологий с целью стимуляции процессов ангиогенеза на фоне ишемии на современном этапе развития науки достаточно актуален, поэтому продолжают поиски новых источников клеток-стимуляторов неоваскулогенеза. Проведены экспериментальные исследования на крысах с моделированием ишемии конечности в рамках доклинических исследований, которые показали целесообразность применения стромальных клеток, выделенных из жировой ткани, при ишемии конечности. Целью работы было исследовать гистологические и иммуногистохимические изменения в мышечной ткани после трансплантации мультипотентных стромальных клеток собственной жировой ткани у больных при ишемии конечности. Проведены гистологические и иммуногистохимические исследования (определение экспрессии антител к фактору Виллебранда, коллагену IV типу и виментину) процессов, происходящих в мышечной ткани после введения мультипотентных стромальных клеток собственной жировой ткани больного. Показано снижение ишемического повреждения миофибрилл, быстрая активация регенераторных сил мышцы. Иммуногистохимически показана четкая стимуляция процессов ангиогенеза через 3 месяца после трансплантации клеток.

**Ключевые слова:** *хроническая ишемия, непрямая реваскуляризация, жировая ткань.*

THE METHOD OF INDIRECT  
REVASCULARIZATION  
OF THE EXTREMITIES  
BY TRANSPLANTATION  
OF MULTIPOTENT STROMAL  
CELLS OF ADIPOSE TISSUE

*U. V. Polyachenko, M. F. Dryuk,  
D. B. Dombrovsky*

**Summary.** The applications of cellular technologies to stimulate angiogenesis on the background of ischemia at the current stage of development of science rather urgent, so the search for new sources of cells stimulants of neovasculogenesis proceeds therefore. Experimental studies on rats with the simulation of extremities ischemia in the preclinical studies that demonstrated the suitability of stromal cells defined from adipose tissue, with ischemia of extremities. Goal was to investigate the histological and immunohistochemical changes in muscle tissue after transplantation of multipotent stromal cells of their own adipose tissue in patients with ischemia of extremities. The histological and immunohistochemical studies (determination of the expression of antibodies to von Willebrand factor, collagen type IV and vimentin) of the processes occurring in muscle tissue after administration of multipotent stromal cells of the patient's own fat tissue were done. The reduction of ischemic damage of myofibrils, rapid activation of the regenerative forces of the muscles is shown. Immunohistochemical analysis shows a clear stimulation of angiogenesis in 3 months after transplantation of cells.

**Key words:** *chronic ischemia, indirect revascularization, adipose tissue.*