

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(3)-03

УДК: 616.14-002-009.85-089.843-003.93:576.35

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТРОФІЧНОЇ ВИРАЗКИ ВЕНОЗНОГО ГЕНЕЗУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Домбровський Д. Б., Оліник Ю. В., Давиденко І. С.

¹ВДНЗ України "Буковинський державний медичний університет" (пл. Театральна, 2, м. Чернівці, Україна, 58002),

²ОКУ "Чернівецька обласна клінічна лікарня", відділення хірургії судин (вул. Головна, 137, м. Чернівці, Україна, 58000)

Відповідальний за листування:
e-mail: olinyur@gmail.com

Статтю отримано 6 червня 2018 р.; прийнято до друку 18 липня 2018 р.

Анотація. Венозна гіпертензія, яка лежить в основі розвитку трофічних розладів, ініціює повний каскад патологічних реакцій на молекулярному, клітинному та тканинному рівнях. Мета - за власною моделлю трофічної виразки, поєднаної з венозною гіпертензією, ми досліджували процеси, що відбуваються на гістологічному та імуногістохімічному рівнях до і після трансплантації стовбурових клітин пуповинної крові. Описовий спосіб фарбування гістологічних відділів, гістохімічний метод для колагенових волокон і фібрину, імуногістохімічний метод для виявлення віментину та фактора Віллебранда та елементів морфометрії. Проведено порівняльне оцінювання морфологічних процесів, що відбуваються при лікуванні виразкового дефекту м'яких тканин кінцівок на тлі хронічної венозної недостатності після трансплантації та без трансплантації стовбурових клітин пуповинної крові. Експериментальні трофічні виразки в контрольній групі тварин значно зменшились, деякі повністю загоїлися. У експериментальній групі тварин виразкові дефекти були вилікувані у всіх випадках. Таким чином, застосування стовбурових клітин пуповинної крові в трофічній виразці венозного генезу призводить до покращеної регенерації шляхом прискорення процесів диференціювання мезенхімальних клітин, активізації процесів ангиогенезу, прискорення дозрівання фіброзної складової стромы. Результати дослідження можуть слугувати основою для подальшого вивчення загоєння виразкового дефекту на тлі трансплантації клітин пуповинної крові та розробки нових методів комплексного лікування хворих з хронічними венозними виразками.

Ключові слова: трофічна виразка венозного генезу, пуповинна кров, трансплантація.

Вступ

Незважаючи на досягнення сучасної медицини, комплексне лікування трофічних виразок венозної етіології залишається актуальним та до кінця не вирішеним питанням сьогоденної хірургії. Венозна гіпертензія є одним з чинників розвитку трофічних порушень та ініціює цілий каскад патологічних реакцій на субклітинному, клітинному та тканинному рівнях. За даними літератури, трофічні венозні виразки становлять понад 70% усіх виразок нижніх кінцівок і виявляють у кожного п'ятого пацієнта з хронічною венозною недостатністю. При стандартній консервативній терапії тривалістю до 4-х місяців загоєння венозних трофічних виразок настає лише у 50% випадків, 20% не загоюється після 2-х років лікування, а після 5-ти років у 8% пацієнтів виразковий дефект залишається відкритим 1.

Пошук нових методів комплексного лікування трофічних виразок нижніх кінцівок є актуальним питанням сучасної флебології, адже незважаючи на постійну роботу гістопатологів, хірургів та фармацевтів над прогнозуванням розвитку ранового процесу, його загоєння залишається майже недосяжною ціллю. Все частіше сьогодні в медицині використовуються методи трансплантації стовбурових клітин різного походження при ішемії кінцівок, панкреонекрозі, цукровому діабеті, онкогематології та інших захворюваннях 4, 5. Завдяки величезній біологічній цінності кордової крові її розглядають як джерело стовбурових клітин на рівні з іншими джерелами: кістковим мозком, периферійною кров'ю, плацен-

тою, жировою тканиною та ін. 2. При вивченні спрямованого диференціювання стовбурових клітин було помічено певну схожість у послідовності експресії маркерних генів і білків *in vitro* та *in vivo*. Ці дані свідчать про те, що стовбурові клітини є адекватною експериментальною моделлю для вивчення механізмів диференціювання *in vitro*, що відкриває певні перспективи для аналізу регуляції цього процесу на окремих його етапах *in vivo* (Guan et al, 1999). Ці клітини мають здатність диференціюватися в різні типи клітин і відновлювати тканини пошкоджених органів: печінки, серця, шкіри, судин, кісток та ін. 3. Проте, в літературі є мало даних щодо ведення наукових пошуків можливості застосування клітинних технологій для лікування пацієнтів з трофічними виразками венозної етіології.

Мета дослідження - на розробленій нами моделі трофічної виразки, яка поєднана з венозною гіпертензією, дослідити процеси, що відбуваються на гістологічному та імуногістохімічному рівнях до та після трансплантації стовбурових клітин кордової крові, як основу для подальших досліджень клітинної терапії.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження проведені на білих щурах масою 200-240 грам. Всім тваринам, змодельовано трофічну виразку на задній кінцівці в поєднанні з венозною гіпертензією, за власною методикою, шляхом двоетапної перев'язки загальної стегнової вени. Кріо-

консервовану клітинну суспензію отримували з банку кордової крові ТОВ "Інститут клітинної терапії". Тварини розподілені на дві групи. Першій - на третю добу після формування "трофічної виразки" в м'язову тканину під виразку вводилася клітинна суспензія з наступними параметрами: вміст ядровмісних клітин - $0,11 \times 10^9$ 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+ та CD117+ CD45+, дорівнював відповідно $(0,85 \pm 0,20)$ та $(1,52 \pm 0,39)\%$. Життєздатність клітин - $(80 \pm 10)\%$.

Друга група тварин - контрольна, на третю добу після формування "трофічної виразки" в м'язову тканину під виразку вводився фізіологічний розчин. Морфологічні дослідження експериментального матеріалу проведені в динаміці експерименту (на 3, 5, 10, 14, 21 добу після моделювання виразки) на основі описового методу забарвлення гістологічних зрізів (забарвлення гематоксиліном і еозином), гістохімічного методу на колагенові волокна та фібрин (забарвлення хромотропом-водним блакитним за методом Н.З.Сліснченка) та імуногістохімічного методу для виявлення віментину (з антитілами до віментину) та фактору Вілебранда (з антитілами до фактору Вілебранда).

З метою кількісної оцінки процесів регенерації застосували елементи морфометрії, а саме планіметричним методом вимірювали питомий об'єм колагенових волокон сполучної тканини. Ці вимірювання проводили на цифрових копіях зображення у середовищі комп'ютерної програми Image 1.48V 6.

Результати. Обговорення

При дослідженні гістологічних особливостей виразки шкіри щурів першої групи на третю добу експерименту встановлено наступне. Виразки мають неоднакову глибину в різних ділянках, зокрема, по краям дефекти неглибокі, є повними дефектами багатощарового плос-

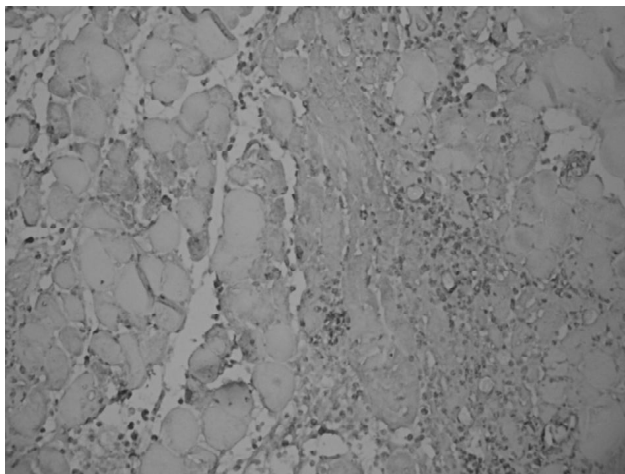


Рис. 1. Третя доба експерименту. Перша група. Центральні відділи виразки. Імуногістохімічне визначення віментину. Об. 20 \times . Ок. 10 \times .

кого епітелію із частковим захопленням сполучної тканини дерми з руйнуванням колагенових волокон, але не глибше за рівень залягання потових залоз. Крововиливів в цих місцях не відзначається. Ближче до центру і в центральних частинах виразки дефекти досягають місцями клітинину, при цьому потові та сальні залози, волосяні фолікули по ходу дефектів повністю зруйновані, в цих місцях локалізуються крововиливи. Навколо них розміщуються окремі клітини круглястої форми (типу лімфоїдних). Такі ж клітини у невеликій кількості розміщуються у підлеглих м'язах, але вони відсутні у клітинину. На серійних зрізах при постановці імуногістохімічної методики на віментин, видно, що вказані клітини мають слабе забарвлення (рис. 1), переважно в 1 бал за чотирибальною шкалою (від 0 до 3 балів).

Дно виразок на всьому протязі представлено однорідними масами по типу фібриноїдного некрозу.

При виконанні імуногістохімічної методики на фактор Вілебранда, в цей період позитивного забарвлення не виявлено. У тварин другої групи на 3-ю добу експерименту картина аналогічна.

При дослідженні матеріалу на п'яту добу експерименту встановлено, що характеристика форми та розмірів виразкових дефектів аналогічна третій добі експерименту, однак, з'являються й нові особливості. Зокрема, по контуру виразкового дефекту видно, що частина дрібних кровоносних судин некротизована та просочена фібрином, кількість лімфоїдних клітин біля дна виразки зростає, вони розташовуються вже чітким валом (рис. 2).

Також дещо зростає число таких клітин у підлеглих м'язах. Імуногістохімічна методика на віментин проявляє гетерогенне забарвлення цих клітин - від 1 до 3 балів, що вірогідно, вказує на те, що частина з них диференціюється в звичайні клітини фіброзної тканини, з'являються окремі фіброласти - клітини веретеноподібної форми з видовженим ядром та підтверджує наявність про-

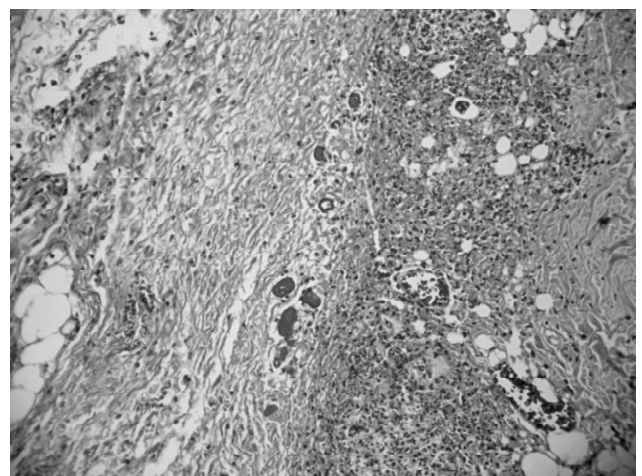


Рис. 2. П'ята доба експерименту. Друга група. Центральні відділи виразки. Забарвлення хромотропом-водним блакитним за методом Н.З.Сліснченка. Об. 20 \times . Ок. 10 \times .

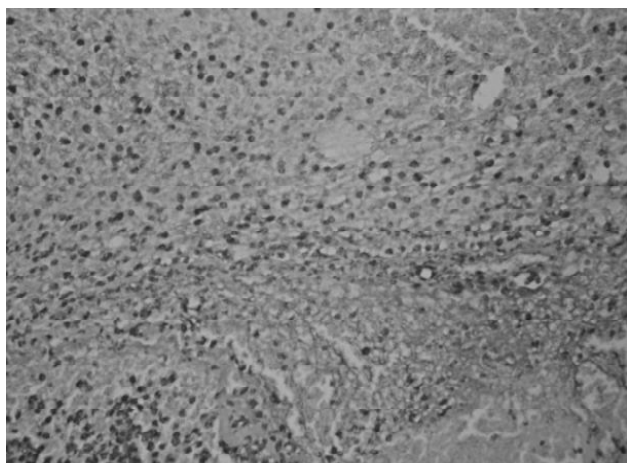


Рис. 3. П'ята доба експерименту. Друга група. Центральні відділи виразки. Імуногістохімічне визначення віментину та фактору Вілебранда. Об. 20[×]. Ок. 10[×].

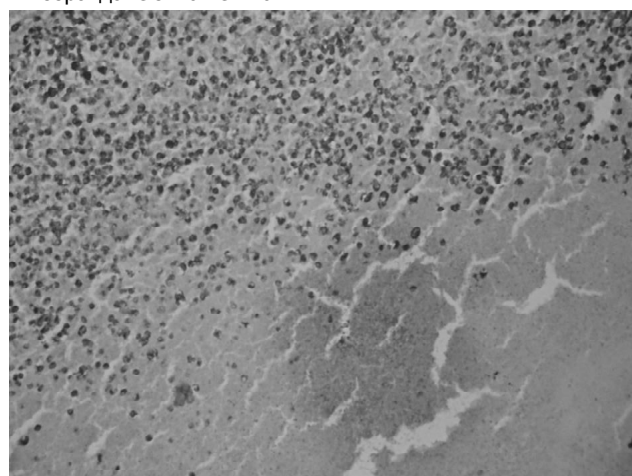
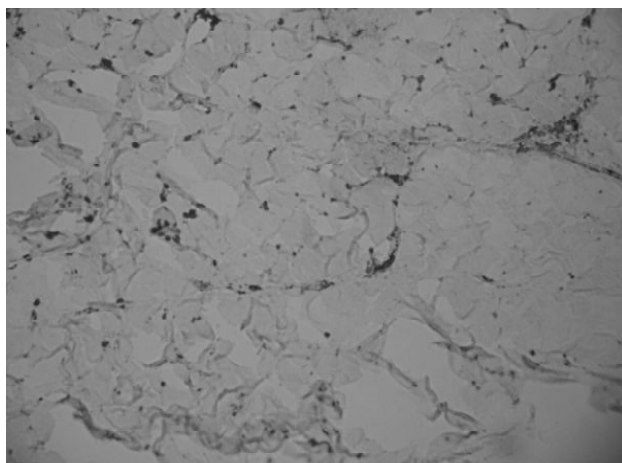


Рис. 4. П'ята доба експерименту. Перша група. Центральні відділи виразки. Імуногістохімічне визначення віментину. Об. 20[×]. Ок. 10[×].



Рис. 5. 21-а доба експерименту. Друга група. Центральні відділи виразки. Забарвлення хромотропом-водним блакитним за методом Н.З.Сліпченко. Об. 20[×]. Ок. 10[×].

цесів диференціювання поліпотентних клітин у сполучнотканинні. Імуногістохімічна методика на фактор Вілебранда на п'яту добу дозволила виявити невеликі компактні групи позитивно забарвлених клітин (рис. 3), які слід оцінити як осередки ангиогенезу (початок утворення нових кровоносних судин).

У щурів, яким вводили стовбурові клітини на 5-у добу експерименту у характеристиці форми та розмірів виразкових дефектів відзначено суттєві відмінності. Так, по контуру виразкового дефекту не знайдено судин з некротичними явищами і просяканням фібрину, що слід оцінити як позитивний ефект, який свідчить про явища загоєння виразки. Вал лімфоїдних клітин також присутній, але він у 2-3 рази потужніший, а лімфоїдні клітини у середньому більш диференційовані, на що вказує більший ступінь імуногістохімічного забарвлення на віментин разом з набуванням частини з даних клітин видовженої форми, характерної для клітин фібробластичного ряду (рис. 4). Ще слід відмітити, що лімфоїдні клітини густо інфільтрують периульцерозну клітковину.

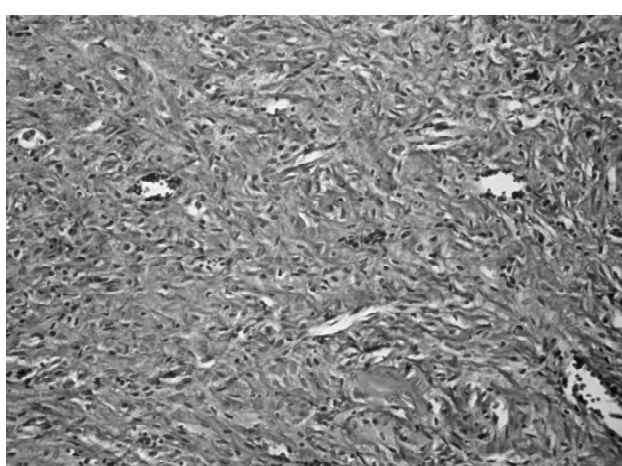


Рис. 6. 21-ша доба експерименту. Перша група. Введення стовбурових клітин. Центральні відділи виразки. Забарвлення хромотропом-водним блакитним за методом Н.З.Сліпченко. Об. 20[×]. Ок. 10[×]. Імуногістохімічна методика на фактор Вілебранда дозволила виявити компактні групи позитивно забарв-

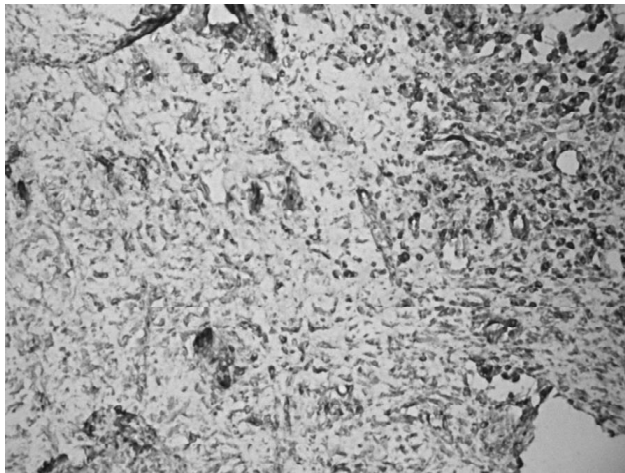


Рис. 7. 21-а доба експерименту. Друга група. Центральні відділи виразки. Імуногістохімічне визначення віментину. Об. 20 \times . Ок. 10 \times . Об. 40 \times . Ок. 10 \times .

лених клітин, більш крупних розмірів та більш інтенсивно забарвлені, що можна розцінити, як більш активний ангіогенез, у порівнянні з групою тварин, яким не вводили стовбурові клітини.

На 10-ту добу експерименту характерною відмінністю від 5-ої доби експерименту є те, що кількість лімфоїдних клітин продовжує зростати як по контуру виразки, так і в підлеглих м'язах, причому у тварин, яким вводили стовбурові клітини, їх присутність і надалі є більш потужною. Ступінь диференціювання цих клітин згідно імуногістохімічної методики на віментин зростає, що більше виражено у щурів, яким вводили стовбурові клітини. Імуногістохімічна методика на фактор Вілебранда виявила, що позитивні об'єкти на 10-у добу зустрічаються зрідка, що відповідає рівню нестимульованого неангіогенезу.

На 14-у добу експерименту в порівнянні з 10-ю добою експерименту помітної динаміки не відмічено.

На 21-у добу експерименту у тварин першої та другої груп виразкові дефекти вкриті багат шаровим плоским епітелієм. Місце виразки заміщено сполучною тканиною з великою кількістю колагенових волокон, але рубцева тканина ще не сформована до кінця, адже містить велику кількість фібробластів та кровоносних судин. При порівнянні щурів першої та другої груп можна відзначити, що в останніх ступінь зрілості рубцевої тканини є нижчим, що проявляється в більшому питомому об'ємі кровоносних судин (12 \pm 0,6% проти 8 \pm 0,4%), але меншому питомому об'ємі колагенових волокон (10 \pm 1,2% проти

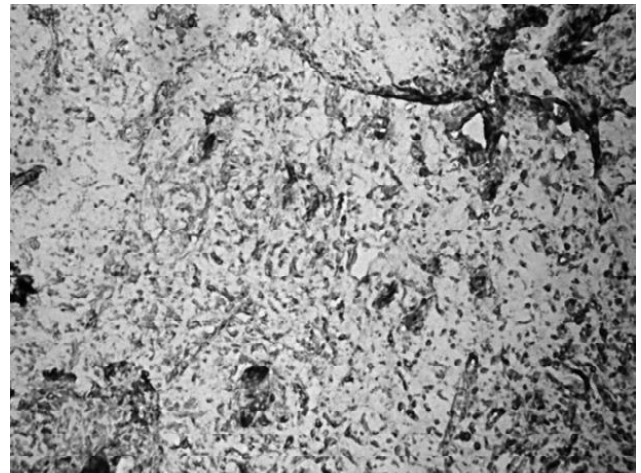


Рис. 8. 21-а доба експерименту. Перша група. Центральні відділи виразки. Імуногістохімічне визначення віментину. Об. 20 \times . Ок. 10 \times . Об. 40 \times . Ок. 10 \times .

38 \pm 2,4%) - рис. 5 та рис. 6). Віментин-позитивні клітини переважно мають фібробластне диференціювання (рис. 7 та рис. 8).

Експериментально сформовані виразкові дефекти в контрольній та дослідній групі тварин значно зменшились в об'ємі, деякі загоїлися повністю. У дослідній групі тварин виразкові дефекти загоїлись у 100% випадків.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Активність процесів відновлення та загоєння експериментально-створеного виразкового дефекту різняться у тварин дослідної та контрольної групи.

2. Встановлено, що трансплантація клітин кордової крові активує процеси регенерації та загоєння виразкового дефекту, зокрема, за рахунок прискорення диференціювання клітин мезенхімального ряду та активації ангіогенезу.

3. Отримані результати дослідження показали, що завдяки прискоренню дозрівання волокнистого компонента строми темпи регенерації тканин у тварин дослідної групи зростають у 1,5-2 рази.

Потребує подальшого дослідження питання впливу стовбурової крові на редукцію венозної гіпертензії. Результати дослідження можуть слугувати основою для подальшого вивчення процесів розвитку виразкового дефекту на тлі трансплантації клітин кордової крові та розробки нових методів комплексного лікування хворих із хронічними венозними виразками.

Список посилань

1. Домбровський, Д. Б. & Пшиборовська, Ю. Р. (2014). Характеристика та шляхи використання стовбурових клітин кордової крові (огляд літератури). *Буковинський медичний вісник*, 18 (1), 151-155. Взято з <https://www.bsmu.edu.ua/files/BMV/BMV-2014-18-01%2869%29/pdf/41.pdf>.
2. Обзор докладов, представленных на Всемирном конгрессе по пуповинной крови и инновационным подходам к

лечению серповидноклеточной анемии в Монако 24-27 октября 2013 года. (2014). *Клеточная и органная трансплантология*, 2 (1), 90-94.

3. Пиптюк, О. В., Телемуха, С. Б. & Пиптюк, В. О. (2012) Шляхи покращання лікування хворих із хронічними трофічними виразками нижніх кінцівок різного генезу. *Наук. вісн. Ужгород. ун-ту, серія "Медицина"*, 2 (44), 86-91.
4. Поляченко, Ю. В., Ніконенко, О. С., Салютін, Р. В., Комаров,

- М. П., Паляниця, С. С. & Борис, Р. М. (2013). Клітинна трансплантація: нормативно-правові аспекти, перспективи та напрямки клінічного використання. *Клітинна та органна трансплантологія*, 1 (2), 28-34. http://nbuv.gov.ua/UJRN/ktot_2013_1_1_11.
5. Русин, В. І., Корсак, В. В., Діккер, Г. М. & Митровка, Б. А. (2011). Лікування венозних трофічних виразок. *Науковий вісник Ужгородського університету, серія "Медицина"*, 2 (40), 222-225.
6. Ferreira, T. & Rasband, W. (2012). ImageJ User Guide. New York: National Institute of Health, 187
- Cell and organ transplantation*, 2 (1), 90-94.
3. Pytiuk, O. V., Telemukha, S. B. & Pytiuk, V. O. (2012) Shliakhy pokrashchannia likuvannia khvorykh iz khronichnymy trofichnymy vyrazkami nyzhnikh kintsivok riznoho genezu [Ways of improvement of treatment of patients with chronic trophic ulcers of the lower extremities of different genesis]. *Naukovyi visnyk Uzhhorodskoho universytetu, serii "Medytsyna" - Scientific herald of Uzhgorod University, series "Medicine"*, 2 (44), 86-91.
4. Poliachenko, Yu. V., Nikonenko, O. S., Saliutin, R. V., Komarov, M. P., Palianytsia, S. S. & Borys, R. M. (2013). Klitynna transplantatsiia: normatyvno-pravovi aspekty, perspektyvy ta napriamky klinichnoho vykorystannia [Cell Transplantation: Regulatory Aspects, Prospects and Directions of Clinical Use]. *Klitynna ta orhanna transplantolohiia - Klitynna ta orhanna transplantolohiia*, 1 (2), 28-34. http://nbuv.gov.ua/UJRN/ktot_2013_1_1_11.
5. Rusyn, V. I., Korsak, V. V., Dikker, H. M. & Mytrovka, B. A. (2011). Likuvannia vnoznykh trofichnykh vyrazok [Treatment of venous trophic ulcers]. *Naukovyi visnyk Uzhhorodskoho universytetu, serii "Medytsyna" - Scientific herald of Uzhgorod University, series "Medicine"*, 2 (40), 222-225.
6. Ferreira, T. & Rasband, W. (2012). ImageJ User Guide. New York: National Institute of Health, 187.

References

1. Dombrovskiy, D. B. & Pshyborovska, Yu. R. (2014). Kharakterystyka ta shliakhy vykorystannia stovburovykh klityn kordovoi krovi (ohliad literatury) [Characteristics and ways of using cord blood stem cells (review of literature)]. *Bukovynskiy medychnyi visnyk - Bukovinsky medical bulletin*, 18 (1), 151-155. Vziato z <https://www.bsmu.edu.ua/files/BMV/BMV-2014-18-01%2869%29/pdf/41.pdf>.
2. Obzor dokladov, predstavlenykh na Vsemirnom kongresse po pupovinoj krovi i innovacionnym podhodam k lecheniyu serpovidnokletочноj anemii v Monako 24-27 oktyabrya 2013 goda. (2014). *Kletochnaya i organnaya transplantologiya* -

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ТРОФИЧЕСКОЙ ЯЗВЫ ВЕНОЗНОГО ГЕНЕЗА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Домбровский Д.Б., Олиник Ю.В., Давиденко И.С.

Аннотация. Венозная гипертензия, лежащая в основе развития трофических нарушений, инициирует полный каскад патологических реакций на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. Цель - на нашей собственной модели трофической язвы в сочетании с венозной гипертензией мы исследовали процессы, происходящие на гистологическом и иммуногистохимическом уровнях до и после трансплантации стволовых клеток пуповинной крови. Описательный метод окрашивания гистологических разрезов, гистохимический метод для коллагеновых волокон и фибрина, иммуногистохимический метод определения виментина и фактора Виллебранда и элементов морфометрии. Проведено сравнительное описание морфологических процессов, возникающих при лечении язвенного дефекта мягких тканей конечностей на фоне хронической венозной недостаточности после трансплантации и без трансплантации стволовых клеток пуповинной крови. Экспериментальные язвенные дефекты в контрольной группе животных значительно уменьшились, некоторые были полностью излечены. В экспериментальной группе животных язвенные дефекты исцелялись во всех случаях. Применение стволовых клеток пуповинной крови в трофической язве венозного генеза приводит к улучшению регенерации путем ускорения процессов дифференциации мезенхимальных клеток, активизации процессов ангиогенеза, ускорения созревания волокнистого компонента стромы. Результаты исследования могут послужить основой для дальнейшего изучения исцеления язвенного дефекта на фоне трансплантации клеток пуповинной крови и разработки новых методов комплексного лечения пациентов с хроническими венозными язвами.

Ключевые слова: трофическая язва венозного генеза, пуповинная кровь, трансплантация.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE REGENERATION OF VENOUS TROPHIC ULCERS WITH THE USE OF CORD BLOOD STEM CELLS IN THE EXPERIMENT

Dombrovskiy D. B., Olinyk Yu. V., Davydenko I. S.

Annotation. Venous hypertension, which underlies the development of trophic disorders, initiates a complete cascade of pathological reactions at the molecular, cellular and tissue levels. Objectives - on our own model of the trophic ulcer, combined with venous hypertension, we investigated the processes occurring on the histological and immunohistochemical levels before and after stem cells of cord blood transplantation. Descriptive method for coloring histological sections, histochemical method for collagen fibers and fibrin, the immunohistochemical method for the detection of vimentin and the Villebrand factor and elements of morphometry were used. A comparative description of the morphological processes occurring in the treatment of the ulcerative defect of the soft tissues of the limbs on the background of chronic venous insufficiency after the transplantation and without the transplantation of stem cells of the cord blood was carried out. Experimental ulcer defects in the control of animals significantly decreased, some were completely healed. In the experimental group of animals ulcerative defects were healed in all cases. So, the application of stem cells of cord blood in a trophic ulcer of venous genesis leads to improved regeneration by accelerating the processes of differentiation of mesenchymal cells, activating the processes of angiogenesis, accelerating the maturation of the fibrous component of the stroma. The results of the study can serve as the basis for further study of the healing of ulcerative defect on the background of transplantation of cord blood cells and the development of new methods for complex treatment of patients with chronic venous ulcers.

Keywords: trophic ulcer of venous genesis, cord blood, transplantation.