

УДК 616-005.4-092.4:616-089.843:612.356

*Ю.В.Поляченко\**, *Р.В.Салютін\*\**, *С.І.Мартиненко\*\*\**, *С.С.Паляниця\*\**

## ГІСТОЛОГІЧНА ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТИМУЛЬОВАНОГО АНГІОГЕНЕЗУ ВНАСЛІДОК ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ

\* Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О.Шалімова АМН України

\*\* Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

\*\*\* ТОВ «Інститут клітинної терапії»

**Резюме.** Досліджено гістологічні та імуногістохімічні зміни в м'язовій тканині в осіб із хронічною ішемією кінцівки, після трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки. Доведено, що клітинна трансплантація призводить до зменшення ішемічного ушкодження міофібрил, швидкої активації регенераторних

сил м'яза. Імуногістохімічно підтверджена стимуляція ангиогенезу, у вигляді утворення неоканалів, через три та шість місяців після клітинної трансплантації.

**Ключові слова:** хронічна ішемія, непрямая реваскуляризація, прогеніторні клітини, фетальна печінка.

**Вступ.** В умовах ураження дистального артеріального русла та мікроангіопатії, а також при неефективності раніше виконаної «прямої» реваскуляризації або відсутності показів до її виконання важливого значення набувають методи непрямой реваскуляризації [1, 2].

Одним із напрямів сучасних досліджень є використання клітинних технологій з метою активації процесів ангиогенезу на рівні колатеральної артеріальної сітки, зокрема за допомогою трансплантації стромальних автологічних стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини [3, 4]. Однак широке клінічне використання клітин кісткового мозку та жирової тканини обмежено певними технологічними проблемами та низьким потенціалом трансдиференціювання дорослих (adult) мезенхімальних клітин [5]. Прогеніторні клітини фетальної печінки людини 6-8 тижнів гестації експресують CD 34<sup>+</sup>, CD 38<sup>-</sup>, CD 45Ra<sup>low</sup>, CD 71<sup>low</sup>, що свідчить про високий потенціал трансдиференціювання до ангиобластів та ендотеліоцитів – основної складової капіляра – зумовлюючи значну потенцію до стимуляції процесів ангиогенезу, ніж автоклітини кісткового мозку або жирової тканини [6], та має підтвердження результатами експериментального дослідження проведеного на щурах.

Таким чином, застосування з метою стимуляції ангиогенезу за умов ішемії клітинних культур фетального походження має теоретичне та експериментальне підґрунтя, є досить перспективним напрямом науково-практичних розробок.

**Мета дослідження.** Визначити за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів дослідження характер змін, що відбуваються в м'язах ішемізованої кінцівки осіб із хронічною ішемією кінцівок після трансплантації прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки.

**Матеріал і методи.** Прогеніторні клітини фетальної печінки людини 6-8 тижнів гестації з фенотипом CD 34<sup>+</sup>, CD 38<sup>-</sup>, CD 45Ra<sup>low</sup>, CD 71<sup>low</sup> (кількість КУО-ГМ 140.0x10<sup>3</sup>), отримували згідно з договором з біотехнологічної лабораторії ТОВ «Інститут клітинної терапії». Клітинний транспла-

нтат вводили внутрішньом'язово в кінцівку (сегмент гомілка-стопа), у вигляді доріжки вздовж оклюзійних артерій, додатково поєднуючи із системою (внутрішньовенно) трансплантацією.

Методика застосована у 12 пацієнтів (всі чоловіки) з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок, у хворих на облітеруючий ендартеріт (один пацієнт), облітеруючий атеросклероз (11), які перебували на лікуванні у відділі мікросудинної та пластичної хірургії Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова та клініці ТОВ «Інститут клітинної терапії». Середній вік пацієнтів складав 53,5 року. Обстеження пацієнтів до операції включало доплерографію артерій рентгенконтрастну ангиографію, лазерну флуометрію мікроциркуляторного русла. У всіх осіб констатовано неможливість виконання реконструктивно-відновних оперативних втручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки.

Перед трансплантацією та через три і шість місяців після уведення клітин отримували біопсійний матеріал м'язів ішемізованої кінцівки для наступного проведення гістологічного та імуногістохімічного дослідження.

Загальногістологічний метод проводили за стандартною схемою. Тканини готували за загальноприйнятою методикою. Після фіксації у формаліні і спиртах матеріал обробляли в парафіновій заливці, зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином та пікрофуксином за методом Ван-Гізона.

При проведенні імуногістохімічних досліджень застосовували непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення рівня експресії антигенів віментину, фактору Віллебранда та колагену IV типу.

**Результати дослідження та їх обговорення.** За результатами гістологічного дослідження м'язова тканина в осіб із хронічною ішемією кінцівок характеризувалася наявністю виражених мозаїчних змін, а саме – вогнища деструктивних м'ясопластів оточувалися фіброзними структурами (рис. 1).

Просвіт судин був здавлений прилеглою фіброзною тканиною та колагеновими волокна-

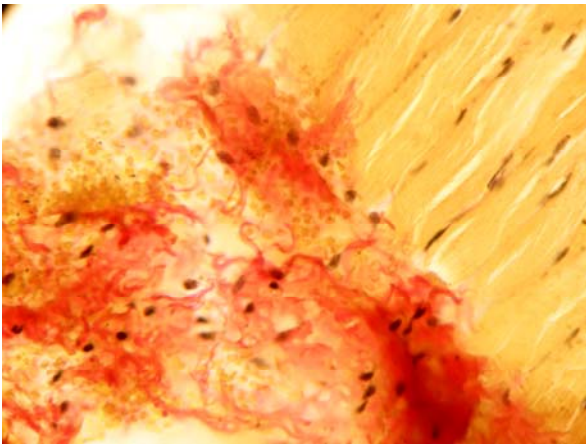


Рис. 1. Ішемізована м'язова тканина. Ділянки склерозу та фуксифілії нерівномірно розташовані в міопласті. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван-Гізона. Мікрофотографія. Ок.10; Об.10

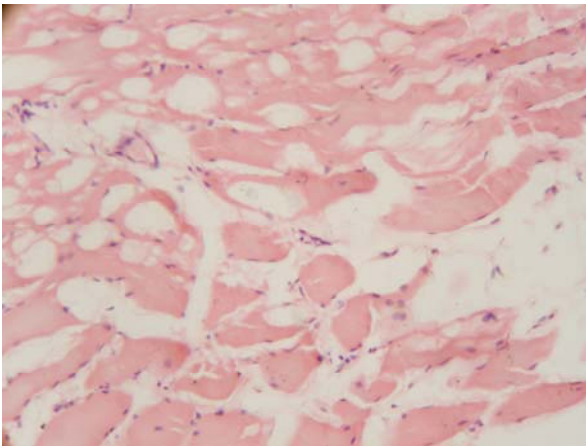


Рис. 3. Третій місяць після клітинної трансплантації. Недиференційовані та малодиференційовані клітини в ендометрії. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофото. Ок. 10; Об.20

ми, окрім того судинні «пучки» формували клубочки або розташовувались окремо. Вищезазначені зміни вказують на спотворення регенераторних процесів та переважання деструкції над регенерацією м'ясових клітин. Спостерігали в пухкій сполучній тканині перимізії фібробласти з ознаками дегенерації та руйнування, оновлення клітинної популяції фібробластів, ендотелію та сполучної тканини спостерігається рідко.

У периваскулярних зонах містилася значна кількість мезенхімоподібних клітин, а також періоцитів. Останні є особливою лінією розвитку периваскулярних клітин, які представлені сполучнотканинними відрослими клітинами, що розташовувались у розщепленнях базальної мембрани ендотелію капілярів мікроциркуляторного русла.

У біоптатах фіксували наявність невеликих вогнищ «збережених» міосимпластів, а деякі м'язові волокна мали ознаки гіпертрофії, що свідчить про процеси компенсаторної відповіді на ішемічне ураження, проте в перимізії спостерігаються вогнища фіброзу.

Результати імуногістохімічного аналізу свідчили про відсутність експресії фактору Віллебран-

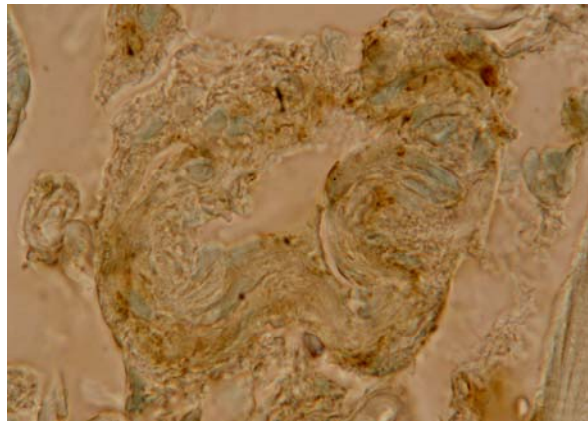


Рис. 2. Міосимпласт. Експресія колагену IV типу в базальній мембрані судин з вогнищами їх "руйнувань" (Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дозabarвленням гематоксиліном Маєра. Мікрофотографія. Ок. 10; Об. 10

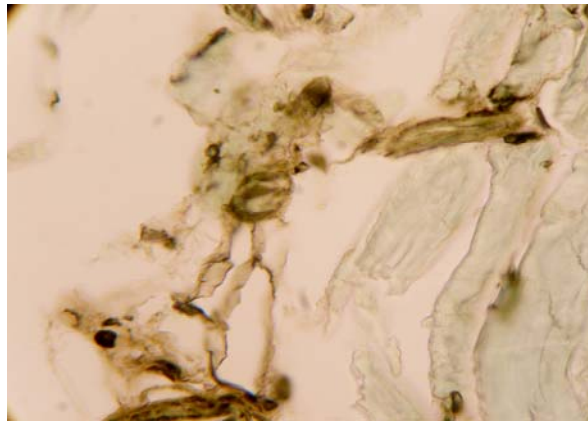


Рис. 4. Третій місяць після клітинної трансплантації. Значно виражена експресія фактору Віллебранда в новоутворених капілярах. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення з дозabarвленням гематоксиліном Маєра. Мікрофотографія. Ок. 10; Об. 40

да, що є первинним маркером ангиогенезу, а експресія колагену IV типу спостерігалася лише в зруйнованій базальній мембрані судин (рис. 2). Тобто, ішемічне ураження призводить до пригнічення процесів фізіологічного ангиогенезу та руйнації базальної мембрани ендотеліоцитів капілярів.

Результати гістологічного дослідження біоптатів м'язової тканини, отриманих на третій місяць після клітинної трансплантації, свідчили про позитивні зміни структури міосимпласту.

У м'язових волокнах виникли вогнища поперечної скреслюваності, у міосимпласті переважали ділянки без ознак дистрофії та набряку, та значно збільшувалася кількість новоутворених капілярів і зон регенерації.

Ділянки регенерації (з безліччю недиференційованих і малодиференційованих клітин) та зони формування неокapілярної мережі мають рівномірну направленість, але більшість з них розташовані в перемізії та ендомізії (рис. 3).

Молода сполучна тканина мала добре виражену судинну мережу, артеріоли і венули розташовувались попарно, впорядковано, та були орієнтовані переважно паралельно ходу колагенових

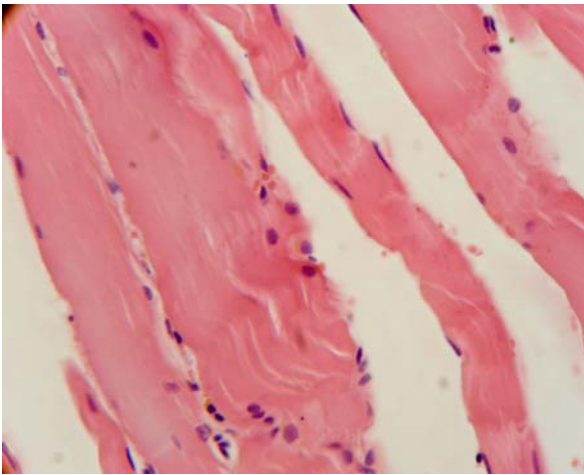


Рис. 5. Шостий місяць після клітинної трансплантації. Міосимпласт без ознак дистрофії. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофото. Ок. 10; Об. 20

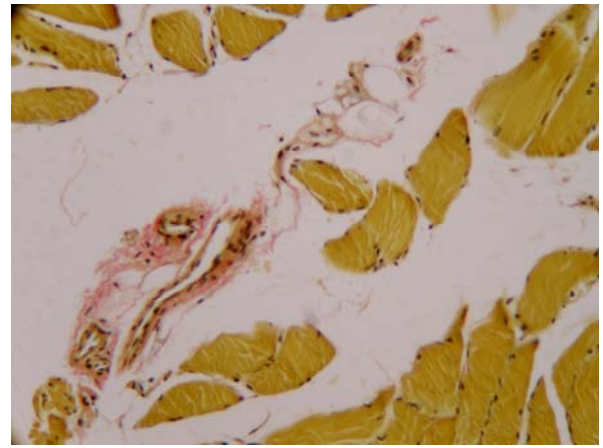


Рис. 6. Шостий місяць після клітинної трансплантації. Міосимпласт з незначними ознаками дистрофії та судинними пучками, що мають фізіологічну структуру. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофото. Ок. 10; Об. 20

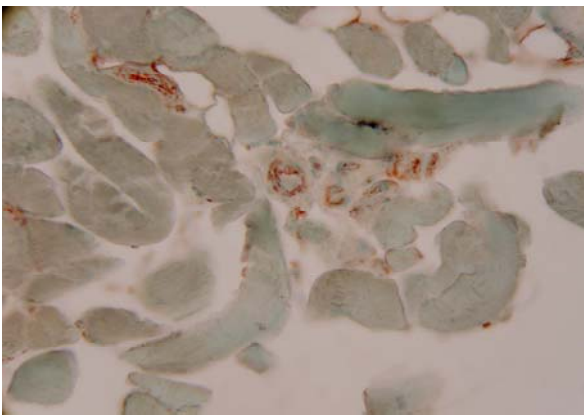


Рис. 7. Шостий місяць після клітинної трансплантації. Експресія фактору Віллебранда в ангіогенних вогнищах та новоутворених судинах. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дозabarвленням гематоксиліном Маєра. Ок. 10; Об. 40

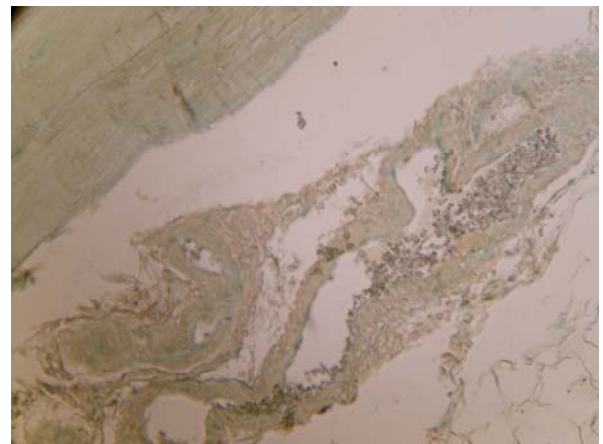


Рис. 8. Шостий місяць після клітинної трансплантації. Експресія колагену IV типу. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення колагену IV типу з дозabarвленням гематоксиліном Маєра. Ок. 10; Об. 20

волокон, і мали направлений хід. Активне утворення неокapілярів (на 50-70% більше ніж у попередній термін дослідження) супроводжувалося значно вираженою експресією фактору Віллебранда (рис. 4).

Активну фазу ангіогенезу підтверджувала виражена експресія колагену IV у базальних мембранах новоутворених капілярів та експресія мезенхімального фактору віментин, що була вираженою переважно в судинних пучках та ангіогенних ділянках.

Гістологічне дослідження зразків м'язової тканини на 6-й місяць після клітинної трансплантації вказувало на наявність у міосимпласті численних вогнищ регенерації, з структурами, що сприяють репарації м'язів. Відмічено нормалізацію структури міосимпласта – появу поперечної скресльованості м'язових волокон та зменшення ознак їх дистрофії (рис. 5).

В отриманих зразках фіксували наявність численних судинних пучків, що мали фізіологічну структуру (рис. 6).

Результати імуногістохімічного аналізу свідчили про триваючу активність процесів регенерації та ангіогенезу.

Фіксували наявність значно вираженої експресії фактору Віллебранда та мезенхімального фактору віментин, особливо в ділянках ендомізію та міосимпласта (рис. 7).

Експресія колагену IV типу була посиленою, особливо в стінці новоутворених капілярів (рис. 8).

Зауважимо, що у всіх пацієнтів, яким виконували клітинну трансплантацію, до кінця першого місяця після трансплантаційного періоду отримані позитивні клінічні дані, а саме – зменшувалися прояви ішемічного ураження, збільшувалася дистанція безбольової ходи та покращувалися показники мікроциркуляції.

### Висновки

1. Трансплантація пацієнтам із хронічною ішемією кінцівок прогеніторних клітин фетальної печінки призводить до активації регенераторних процесів, про що свідчить утворення молодих м'язів та зменшення фібродистрофічних змін м'язової тканини.

2. Імуногістохімічні тести вказують на активацію в післятрансплантаційному періоді процесів ангіогенезу, про що свідчить експресія фактору Віллебранда у вогнищах перимізію та ендомі-

зію, експресія мезенхімального фактору віментин та колагену IV типу в ділянках новоутворених судинних пучків.

3. Перспективний та ефективний метод клітинної стимуляції ангиогенезу шляхом трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки може бути застосований у комплексному лікуванні осіб із хронічною ішемією кінцівок.

**Перспектива подальших досліджень.** Отримані позитивні результати дослідження обґрунтовують подальший науковий пошук та зумовлюють доцільність клінічного використання стовбурових клітин фетального походження в лікуванні осіб із «нереконструктабельним» ураженням судинного русла.

#### Література

1. Выбор метода реконструктивной операции при дистальной окклюзии артерий нижних конечностей / А.С.Никоненко, А.В.Губка, В.И.Перцов [и др.] // Клін. хірургія. – 2005. – № 4-5. – С. 57-59.
2. Русин В.І. Хірургічне лікування дистальних форм атеросклеротичного ураження артерій нижніх кінцівок / В.І.Русин, В.В.Корсак, Я.М.Попович // Практич. мед. – 2008. – Т. 14, № 5. – С. 210-213.
3. Косенков А.Н. Хроническая критическая ишемия нижних конечностей и сахарный диабет у лиц пожилого и старческого возраста / А.Н.Косенков, А.И.Черепанин, С.В.Удовиченко // Клин. геронтол. – 2007. – № 5. – С. 34-38.
4. Lachmann N. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery disease: stem cell therapy / N.Lachmann, S.Nikol // Vasa. – 2007. – Vol. 36, № 4. – P. 241-251.
5. Structural and functional remodeling of skeletal muscle microvasculature is induced by simulated microgravity / M.D. Delp, P.N. Collieran, M.K. Wilkerson [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 278-299.
6. Григорян А.С. Выделение мультипотентных прогениторных клеток из фетальной печени человека / А.С.Григорян // Клет. транспл. и тканевая инженерия. – 2007. – Т. I, № 4. – С. 18-19.

### ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТИМУЛИРОВАННОГО АНГИОГЕНЕЗА ВСЛЕДСТВИИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРОГЕНТОРНЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ

*Ю.В.Поляченко, Р.В.Салютин, С.И.Мартыненко, С.С.Паляница*

**Резюме.** Исследованы гистологические и иммуногистохимические изменения в мышечной ткани у больных с хронической ишемией конечности, после трансплантации прогениторных клеток фетальной печени. Доказано, что клеточная трансплантация способствует уменьшению ишемического воздействия на миофибриллы, скорейшей активации регенераторных способностей мышцы. Иммуногистохимически подтверждена стимуляция ангиогенеза, в виде формирования неокapилляров, через 3-6 месяцев после клеточной трансплантации.

**Ключевые слова:** хроническая ишемия, непрямая ревазуляризация, прогениторные клетки, фетальная печень.

### HISTOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF STIMULATED ANGIOGENESIS DUE TO THE TRANSPLANTATION OF THE PROGENITOR CELLS OF THE FETAL LIVER

*Yu.V.Poliachenko, R.V.Saliutin, S.I.Martynenko, S.S.Palianytsia*

**Abstract.** The authors have studied histological and immunohistochemical changes in the muscular tissue of patients with chronic ischemia of the extremity. It has been corroborated that cellular transplantation results in a decrease of ischemic damage of myofibrils, a rapid activation of the regenerative capacity of the muscle. The stimulation of angiogenesis is confirmed immunohistochemically in the form of neocapillaries in three and six months following cellular transplantation.

**Key words:** chronic ischemia, indirect revascularization, progenitor cells, fetal liver.

O.O. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology of Ukraine's AMS (Kyiv)  
Coordinating Center of Transplanting Organs, Tissues and Cells of Ukraine's MHP  
Institute of Cell Therapy LPS (Kyiv)

Рецензент – д.мед.н. В.В.Білокий

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 1 (57). – P. 69-72

Надійшла до редакції 7.12.2010 року