

УДК 576.3/7.086.83:616.13:617.58

© А. В. Оберемко, П. Л. Варшавер, 2012.

ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ МІКРОЦИРКУЛЯЦІЇ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ХРОНІЧНОЮ ІШЕМІЄЮ НИЖНІХ КІНЦІВОК ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН

А. В. Оберемко¹, П. Л. Варшавер²*Державна установа «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В. К. Гусака Національної академії медичних наук України», ¹ Лабораторія клітинного та тканинного культивування, ² Кафедра хірургії, м. Донецьк.*

NORMAL FUNCTION RECOVERY OF RAT'S MUSCLES AFTER CHRONIC LOWER LIMB ISCHEMIA BY MESENCHYMAL STROMAL CELLS TRANSPLANTATION

A. V. Oberemko, P. L. Varshaver

SUMMARY

Chronic lower limb ischemia represents a serious problem in Ukraine. The purpose of this work was to determine influence of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells on rat's angiogenesis at experimental chronic ischemia. Rats of the Wistar-Kioto line were divided into 5 groups, 2 of which – with transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells. Results showed fast increase of microcirculation criteria of rats with transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells.

ВОЗОБНОВЛЕННЯ НОРМАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ М'ЯЗЦЬ КОНЕЧНОСТЕЙ КРИС ПОСЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

А. В. Оберемко, П. Л. Варшавер

РЕЗЮМЕ

Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей в Украине представляют серьезную проблему. Целью данной работы было определить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на ангиогенез нижних конечностей крыс при экспериментальной хронической ишемии. Результаты показали быстрое увеличение показателя микроциркуляции у тех крыс, которым выполнялась трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку, хронічна ішемія нижніх кінцівок

Хронічні облітеруючі захворювання артерій нижніх кінцівок складають більше 20% від усіх видів серцево-судинної патології, що відповідає 2-3% від загальної чисельності населення [5]. Незважаючи на значний прогрес судинної хірургії за останнє десятиріччя, лікування хворих з критичною ішемією нижніх кінцівок, обумовленою дистальним типом порушення кровообігу, залишається актуальною проблемою.

Основною метою сучасної тактики лікування хворих на хронічні оклюдуєчі захворювання судин кінцівок є вирішення питання про можливість виконання оперативного втручання, спрямованого на відновлення кровопостачання ішемізованої кінцівки [1]. У випадку відсутності анатомічних можливостей або важкого супутнього стану хворого, коли немає можливості виконати реконструктивно-відновне оперативне втручання, для хворих залишається фактично єдиний метод лікування – консервативна терапія [4,6], а саме - використання медикаментозних препаратів, що не тільки не усуває наслідків основного захворювання, але й не є етіопатогенетичним лікуванням. Також реконструктивно-відновні втручання, які проводяться, не завжди призводять до відновлення

кровоотоку та покращення стану хворого, що в подальшому вимушує до виконання ампутації ураженої кінцівки [6].

Ідея клітинної трансплантації для лікування ішемії нижніх кінцівок на сьогодні є одним із найбільш перспективних напрямків терапії критичної ішемії при дистальному порушенні кровообігу. Це стало можливим у зв'язку з інтенсивним дослідженням клітинних механізмів ангиогенезу та можливістю виділення різних типів клітин-попередників. Довести ефективність застосування біотехнологій можна тільки шляхом порівняння неоангиогенезу в експерименті у тварин, яким трансплантується (різними способами введення) суспензія клітин-попередників, з тваринами, яким формують вогнища асептичного запалення, тобто вводять внутрішньом'язово аутокров.

Метою даної роботи було визначити вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку на мікроциркуляцію нижніх кінцівок щурів за умов експериментальної хронічної ішемії нижніх кінцівок.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експериментальне дослідження проводилось на

інбредній лінії щурів Вістар-Кіото масою 270-340 г. Вибір щурів інбредної лінії Вістар пов'язаний з високим ступенем гомозиготності цих тварин, що нівелювало можливість реакції відторгнення алотрансплантата, отриманого з кісткового мозку однієї тварини цієї ж лінії.

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини отримували з кісткового мозку. Виділенні клітини при маркуванні антитілами ("BD Biosciences Pharmingen", Сполучені штати Америки) мали фенотип: CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺ (> 95 % позитивних) і CD45⁻, CD34⁻, CD79a⁻, HLA-DR⁻ (< 2 % позитивних) та були здатні диференціюватись в остео-, адипо- та хондрогенному напрямку при спрямованій індукції *in vitro*. Культивування проводили за стандартною методикою [2].

Експериментальне моделювання хронічної ішемії кінцівки щурів проведено за методикою, розробленою в державній установі «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім В. К. Гусака Національної академії медичних наук України». Після двоетапного оперативного втручання з метою прошивання стовбура та гілок стегневої артерії було підтверджено наявність хронічної ішемії кінцівки у всіх щурів. Клінічне підтвердження було основане на появі трофічних виразок на оперованих кінцівках та кульгавості у щурів. Інструментальне підтвердження було отримане шляхом порівняння графічних зображень, отриманих за допомогою лазерного доплерівського флоуметрування здорової та оперованої кінцівки (спостерігалось значне зниження показника мікроциркуляції). Після виведення тварин з експерименту були взяті біоптати м'язів гомілки та стегна, де спостерігались ознаки хронічної ішемії, з

метою проведення гістологічного дослідження. Зазначені ознаки хронічної ішемії, такі як набряк перимізію, вогнища некрозу міофіламентів та компенсаторний фіброз м'язів.

Всі щури були поділені на 5 груп по 15 тварин. Перша група (контрольна) – формування хронічної ішемії без подальшого лікування. Друга група – внутрішньом'язове введення фізіологічного розчину. Третя група – внутрішньом'язове введення аутокрові, як агенту формування місцевого асептичного запалення, та, завдяки цьому, як можливого джерела неоангіогенезу в уражених кінцівках. Четверта група – внутрішньом'язове введення мезенхімальних стовбурових клітин, як джерела ангіогенезу. П'ята група – інтраваскулярне введення мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин.

Курс введення суспензії мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин при інтраваскулярному та внутрішньом'язовому введенні – одноразово дозою 2×10^6 на кілограм ваги в чотирьох точках: по дві в ділянки гомілки та стегна.

Дослідження стану мікроциркуляції у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок проводилось за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням ліцензійного пакету «MedStat» (версія 3, сер. № MS000027) з використанням адекватних методів біостатистики. При значеннях $p < 0,05$ відмінності вважали достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених експериментальних досліджень були отримані зображення залежностей показника мікроциркуляції від часу (рис. 1).

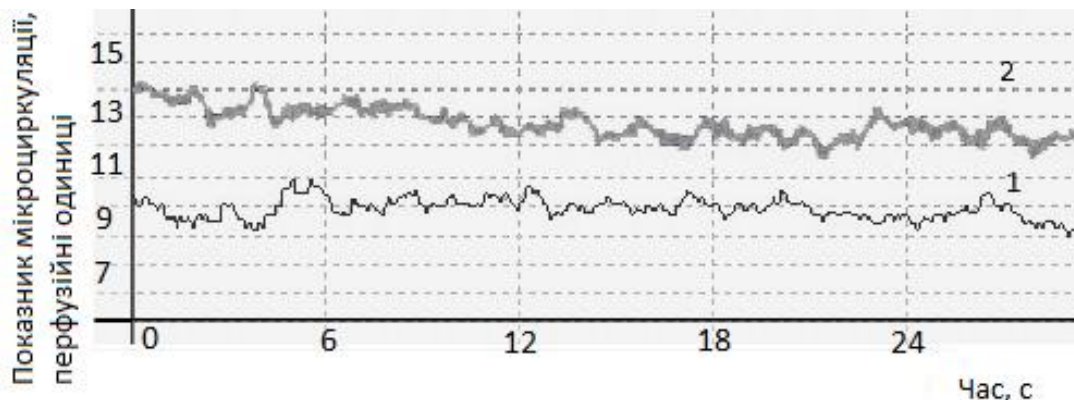


Рис. 1. Приклад зображення кривих залежностей показника мікроциркуляції від часу, отриманих за допомогою лазерного доплерівського флоуметрування (5-й тиждень експерименту): чорним кольором (1) – для кінцівок щурів з модельованою хронічною ішемією при трансплантації внутрішньом'язово мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин ($M = 8,95$, $\sigma = 0,36$), сірим кольором (2) – для кінцівок щурів, на яких не проводились будь-які оперативні втручання ($M = 11,81$, $\sigma = 0,56$).

Встановлено (рис. 2), що у тварин першої (контрольної) показник мікроциркуляції складав від $0,97 \pm 0,21$ на 1-й тиждень до $4,48 \pm 0,52$ перфузійних одиниць на 5-й тиждень, не відрізняючись від показників у тварин II групи, яким було виконано внутрішньом'язове введення фізіологічного розчину (від $1,02 \pm 0,61$ на 1-й тиждень до $4,6 \pm 0,44$ перфузійних одиниць на 5-й тиждень). У тварин, яким була виконана трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку внутрішньом'язово (IV група) та інтраваскулярно (V група), показник мікроциркуляції на 1-й тиждень експерименту складав $1,01 \pm 0,54$ та $0,97 \pm 0,61$

перфузійних одиниць відповідно і не відрізнявся від показника тварин, яким не надавалось лікування або вводився фізіологічний розчин. Починаючи з 2-го тижня, показник мікроциркуляції збільшувався і становив $2,03 \pm 0,53$ та $1,56 \pm 0,45$ перфузійних одиниць відповідно, вірогідно відрізняючись від показників I, II та III груп тварин в цей же термін дослідження ($p < 0,05$). Наприкінці дослідження показник тесту складав вже $9,4 \pm 0,62$ та $7,8 \pm 0,51$ перфузійних одиниць відповідно. Показники тесту у тварин IV та V груп були подібні та вірогідно відрізнялись між собою ($p < 0,001$) лише на 5-й тиждень експерименту.

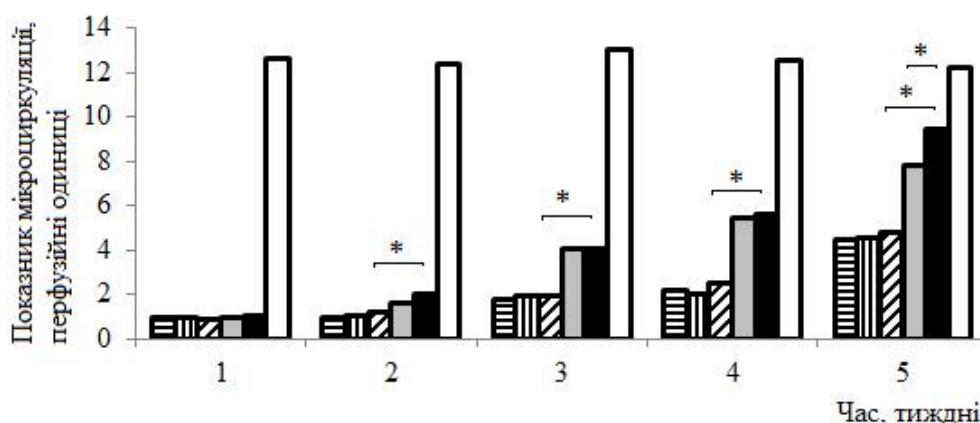


Рис. 2. Залежність показника мікроциркуляції від часу для кінцівок тварин, яким не виконувались будь-які оперативні втручання (білим кольором), для тварин, яким було внутрішньом'язово (чорним кольором), інтраваскулярно (сірим кольором) трансплантовано мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, аутокров (діагональними лініями), фізіологічний розчин (вертикальними лініями) або нічого (горизонтальні лінії) при експериментальній хронічній ішемії нижньої кінцівки (* $p < 0,05$).

Також мало місце незначне підвищення показника мікроциркуляції і в III групі тварин, яким була проведена трансплантація аутокрові на тлі ішемії кінцівки, проте, на відміну від тварин IV та V груп, він був нижчим, складаючи від $0,89 \pm 0,65$ до $4,83 \pm 0,75$ перфузійних одиниць, відмінності між III та IV, V групами вірогідні з 2-го тижня експерименту на рівні значущості $p < 0,05$.

Результати проведеного дослідження засвідчили про клінічне покращення кровотоку в ішемізованих кінцівках після як інтраваскулярного, так і внутрішньом'язового введення суспензії мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин порівняно з тими тваринами, яким не проводилась трансплантація клітин в ішемізовані тканини, та тими тваринами, яким внутрішньом'язово вводили фізіологічний розчин. Застосування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку порівняно з внутрішньом'язовим введенням аутокрові в експерименті на фоні ішемії дало більш швидке відновлення нормальної функції м'язів кінцівки. Проведення експерименту підтверджує припущення про активацію процесів ангіогенезу в

ішемізованих кінцівках на тлі трансплантації стромальних клітин кісткового мозку, але для визначення безпосередніх процесів, що відбуваються в ділянці ураження, та визначення механізмів впливу цих клітин проводяться гістологічні дослідження в усіх групах тварин.

Результати експериментальних досліджень показали, що вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку на покращення кровотоку нижньої кінцівки щурів подібний до впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини, дослідженому в роботі [3]. В роботі [7] також показано, що трансплантація клітинного матеріалу, а саме стовбурових клітин периферичної крові, поліпшувала в експерименті показники колатерального кровообігу в ураженій кінцівці.

ВИСНОВКИ

1. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку в ішемізовані кінцівки дослідних тварин дозволила на 5-й тиждень в 1,7 разу (для інтраваскулярного введення) і 2 разу (для внутрішньом'язового

введення) збільшити показник мікроциркуляції, порівняно з контрольною групою та групою тварин, яким внутрішньом'язово вводився фізіологічний розчин.

2. Внутрішньом'язове введення аутокрові в ішемізовану кінцівку було малоефективним: показник мікроциркуляції був в 1,6 та 1,9 разу менше, ніж для інтраваскулярного та внутрішньом'язового введення мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку відповідно, на 5-й тиждень експерименту.

3. Середньоарифметичні значення показника мікроциркуляції були дещо кращими (достовірні розрізнення спостерігались лише на 5-й тиждень експерименту) у тих тварин, яким внутрішньом'язово вводилась суспензія мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, ніж для тих, яким ті ж клітини вводились інтраваскулярно.

ЛІТЕРАТУРА

1. Отдаленные результаты хирургического лечения поздних окклюзий аортобедренных трансплантатов у больных с рецидивом критической ишемии нижних конечностей / Ю. Э. Восканян, А. В. Вырвыхост, Ю. П. Таций [и др.] // *Ангиология и сосуд. хирургия.* – 2000. – Т. 6, № 4. – С. 81 – 85.
2. Індуктивні властивості різних носіїв культивованих клітинних ліній / В. К. Гринь, В. Н. Казаков, А. Г. Попандопуло [та ін.] // *Трансплантологія.* – 2008. – Т. 10, № 1. – С. 96 – 99.
3. Домбровский Д. Б. Комплексне лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок із використанням трансплантацій мультипотентних стромальних клітин аутоліпоаспірату (експериментально-клінічне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук : спец. 14.01.03 «Хірургія», 14.01.08 «Трансплантологія та штучні органи» / Д. Б. Домбровский. – Київ, 2011. – 40 с.
4. Золоев Г. К. Тактика хирургического лечения в процессе двигательной реабилитации больных с ишемией единственной нижней конечности / Г. К. Золоев, С. В. Литвиновский, О. А. Коваль // *Ангиология и сосуд. хирургия.* – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 106 – 111.
5. Покровский А. В. Клиническая ангиология: руководство для врачей. В 2 т. Т. 1. Под ред. А. В. Покровского. – М.: Медицина, 2004. – 808 с.
6. Вазонит–ретард в лечении больных с перемежающейся хромотой при облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей / А. В. Покровский, А. В. Чупин, А. А. Калинин [и др.] // *Ангиология и сосуд. хирургия.* – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 19 – 26.
7. Outcomes of using autologous peripheral-blood stem cells in patients with chronic lower arterial insufficiency / A. V. Maksimov, A. P. Kiiasov, M. V. Plotnikov [et al.] // *Angiol. Sosud. Khir.* – 2011. – N 17(2). – P. 11 - 15.