

© Домбровський Д.Б., Сака А.К., Оліник Ю.В., Ільчишин М.В., 2011

УДК 611.013.395:616.13-002-005.4-092.4

## ЗМІНИ СУДИННОГО ЕНДОТЕЛІУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ІШЕМІЇ КІНЦІВОК ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

*Д.Б.Домбровський, А.К.Сака, Ю.В.Оліник, М.В.Ільчишин*

*Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці*

**Резюме.** Мета дослідження – вивчити вплив трансплантації мультипотентних стромальних клітин власної жирової тканини на зміни ендотелію судин у хворих на хронічну ішемію кінцівок. Доведено ефективність застосування ауто трансплантації мультипотентних стромальних клітин власної жирової тканини для стимуляції процесів ангиогенезу в ділянці ішемічного ураження.

**Ключові слова:** хронічна ішемія, непрямая ревазуляризація, електронна мікроскопія.

Ідея клітинної трансплантації для лікування ішемії кінцівок успішно реалізується в експерименті та клініці [1, 2]. При використанні клітин кісткового мозку (ККМ) біль спокою у хворих з ішемією зменшується на 80%. Після трансплантації ККМ ангиографічно визначається розвиток колатерального кровообігу [3, 4], виділяються біоактивні речовини, росткові фактори, цитокіни, які володіють властивостями індукції репаративних процесів у місці ушкодження [5, 6].

Клінічними дослідженнями встановлено високий потенціал ККМ у відновленні васкуляризації ішемізованих тканин. Успіх цієї стратегії залежить від визначення механізмів, за допомогою яких стовбурові і прогеніторні клітини проходять молекулярні перебудови, необхідні для їх цілеспрямованої проліферації, мобілізації і диференціювання і, тим самим, визначається їхня функціональна поведінка у тканинах організму. Перше клінічне дослідження із застосуванням стовбурових клітин для лікування ішемії нижніх кінцівок опубліковане 2002 року [4]. Проте застосування кісткового мозку має досить суттєві недоліки: процедура забору аспірату кісткового мозку не завжди проста, кількість аспірату коливається у великих межах, а кількість стромальних клітин у кістковому мозку з віком істотно зменшується.

Мезенхімальні стромальні клітини, одержані при ферментативному обробленні жирової тканини, володіють схожою з поліпотентними мезенхімальними стромальними ККМ здатніс-

тю диференціюватися у клітини як мезенхімального, так і немезенхімального походження. За допомогою підбору спеціальних середовищ та умов культивування вдається диференціювати ендотеліальні клітини у гладеньком'язові [7], попередники ендотеліальних клітин – у кардіоміоцити [8]. Стромальні клітини жирової тканини являють собою популяцію клітин, які володіють високою пластичністю, високою інтенсивністю проліферації, високим потенціалом диференціювання, а також легко піддаються трансфекції. Завдяки чималому вмістові у жировій тканині, відносній безпеці і низькій травматичності їх одержання ці клітини є перспективними для аутологічної трансплантації.

**Мета дослідження.** Вивчити вплив стромально-васкулярної фракції жирової тканини на експериментальну ішемію кінцівок. Робота проведена в рамках етапу доклінічного дослідження з оформленням протоколу згідно з наказом МОЗ України від 10.10.07 р. № 630 "Про затвердження порядку проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань".

**Матеріал і методи.** Розроблена технологія проведення трансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини хворим на хронічну ішемію кінцівок, яка включає на першому етапі отримання жирової тканини методом ліпоаспірації. Консервована жирова тканина транспортувалася в Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН Украї-

ни (м. Харків), де на кафедрі біохімії (зав. – професор А.Ю.Петренко) проводилося виділення стромально-васкулярної фракції жирової тканини. Частину отриманих клітини стромально-васкулярної фракції вводили внутрішньом'язово хворому в ішемізовану кінцівку (гомілка-стопа). Іншу частину клітин зберігали для подальшого культивування та експансії на поживному середовищі. Через 2-3 тижні, після 3-го пасажу, клітини знімали з поживного середовища і транспортували для повторного пересадження хворому. Перед трансплантацією та через місяць після першої трансплантації брали біопсійний матеріал м'язів ішемізованої кінцівки для досліджень. Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки тканини фіксували в 2,5% розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері (рН – 7,2-7,4) і дофіксували в 1% розчині оксиду осмію. Матеріал зневоднювали в спиртах висхідної концентрації і поміщали в аралдит. Морфологічні структури контрастували в процесі зневоднення матеріалу насиченим розчином уранілацетату, а на зрізах – цитратом свинцю. Зрізи товщиною 40-60 нм, отримані на ультратомі LKB-III, вивчали в електронному мікроскопі ПМ-125К.

Дану методику застосовано у 8 пацієнтів з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок: у хворих на облітеруючий ендартеріт (3), облітеруючий атеросклероз (3) та постемболічну оклюзію (2) артерій стегнево-підколінного сегмента. Чоловіків було 7, жінок – 1. Середній вік хворих становив 42,5 роки. Обстеження хворих до операції включало доплерографію артерій, рентгеноконтрастну ангіографію та лазерну флуометрію мікроциркуляторного русла. У всіх хворих констатовано неможливість виконання реконструктивних оперативних втручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки.

**Результати дослідження.** При дослідженні матеріалу до трансплантації позаклітинний матеріал складається з незмінених або розщеплених колагенових фібрил, фрагментів еластичних волокон, невеликої кількості зернистої речовини. Щільні сполучні комплекси зміщені до базальної частини ендотеліоцитів. Базальна мембрана характеризується шаруватістю. На периферії капіляра розташовуються адвентиційні клітини і пухка волокниста сполучна тканина. Спостерігається набряк базальної мембрани ендотелію, її потоншення з одночас-

ним посиленням у деяких клітинах піноцитозної активності. Виявляються деструктивно змінені цитоплазматичні відростки значної довжини, які випинають у просвіт капіляра. Крім того, у просвіті капілярів трапляється значна кількість вільно розташованих структур цитоплазми, що свідчить про пошкодження цитоплазматичної мембрани ендотеліальних клітин. Просвіт деяких капілярів цілком заповнений цитоплазматичним детритом десквамованих клітин. Підвищення проникності базального шару визначається наявністю екстравазатів, що виявляються довкола багатьох капілярів і складаються з білкової частини та еритроцитів. Плазмовий преципітат розсовує і просочує параваскулярні пучки колагенових фібрил і фібрилярні структури. Край цитоплазми ендотеліальних клітин, спрямований до базального шару, рівний, цитоплазматичні відростки неглибоко вдаються до базального шару.

У вогнищах деструкції м'язової тканини ендоплазматичний ретикулум розвинений слабо і представлений внутрішньоклітинними заокругленими каналами або цистернами. Гранули глікогену не виявляються. Поблизу ядра розташований пластинчастий комплекс, в якому містяться поодинокі бульбашки, світлі вакуолі і цистерни з матеріалом різної електронної щільності. Матрикс цитоплазми має суттєво знижену електронну щільність, де реєструються поодинокі вільні рибосоми. У клітинах з електроннощільним матриксом цитоплазми везикули пластинчастого комплексу, мітохондрії і гранулярний ендоплазматичний ретикулум ледь помітні. Численні піноцитозні бульбашки розташовані переважно поблизу внутрішньої поверхні цитоплазматичної мембрани. Набряк ендотеліальних клітин зазвичай супроводжується звуженням просвіту капіляра, зменшенням кількості або навіть зникненням ламінальних цитоплазматичних виростів. Рідко трапляються вакуолі, мієлінові фігури і осміофільні тільця, відсутні ліпідні крапельки і гранули ліпофусцину, зменшена кількість цитоплазматичних волокон, інших клітинних структур. Комплекс Гольджі має знижену кількість везикул різного калібру. У деяких клітинах зберігається гіпоплазія структурних елементів пластинчастого комплексу, має місце виражений набряк ендотеліоцитів. Трапляються капіляри зі світлими, набряклими ендотеліоцитами. Базальна

мембрана в таких клітинах чітка, в деяких місцях пухка, не фрагментована, інколи зливається з перикапілярним простором. У значній частині ендотеліальних клітин з ущільненим матриксом видно невелику кількість везикул, тілець мультивезикулярних вільних рибосом і полісом, потовщених мікрворсинок, мікрофіламентів, мікротрубочок і цистерн. Останні в деяких ділянках цитоплазми перетворюються у вакуолі. Часто спостерігаються розриви плазматичної мембрани ендотеліальних клітин. Зміни в ендотеліоцитах в першу чергу проявляються з боку мітохондрій набряком і просвітленням матриксу, а також виявляються значні варіації форми, розмірів та внутрішнього вмісту цих органел. Виявляються мітохондрії з наявністю мієліноподібних структур. Змінюється внутрішня структура мітохондрій, виникає розширення міжкristних проміжків і деструкція крист, аж до повного їх зникнення. Капіляри стиснуті сполучною тканиною і мають звужений просвіт. У таких випадках реєструється збільшення кількості колагенових волокон. Ламінальна поверхня ендотеліоцитів практично не містить мікрворсинок. Виявляються капіляри, наповнені еритроцитами, з ознаками сладж-феномену.

Інша картина спостерігається через місяць після трансплантації клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини. Кількість інвагінацій везикул на клітинній поверхні помірна. Пори ендотеліальних клітин представлені зредукованими трансендотеліальними канала-

ми, що мають полігональну форму і локалізуються в найтонших частинах ендотеліальної клітини. Форма і розміри клітинних пор різноманітні. Поверхня ендотеліоцитів часто формує численні складки, мікровідростки. Процеси інтеграції, що об'єднують окремі незрілі клітини, які відмежовують інтерстиціальні канали у функціонально єдиний клітинний пласт, є раннім етапом диференціювання клітин-попередників ендотеліоцитів (рис. 1). У процесі ангиогенезу такі клітини не утворюють суцільний клітинний пласт, внаслідок чого стінка первинних капілярів в окремих місцях не замкнута і їх просвіт сполучається з інтерстиціальним простором. Поверхня молодих ендотеліоцитів порівняно нерівна, з численними виростами і мікрворсинками. Відростки суміжних ендотеліоцитів з'єднуються кінець у кінець або з невеликими перекриттями, утворюючи десмосомоподібні структури. Цитоплазма заповнена органелами, волокнистими структурами і аморфною речовиною. Ядерна мембрана, як правило, має рівні, гладкі або звивисті контури. Хроматин ядра зазвичай розташовується дифузно. Такі клітини активно беруть участь в утворенні лакун і первинних судин.

Морфологічна схожість з малодиференційованими клітинами виражається в наявності відростків цитоплазми, подібній електронній щільності і зовнішньому вигляді ядра. Тут виявляються локуси проліферуючих клітин, багато з яких нагадують малодиференційовані клітини мезенхіми, серед яких виявляються молоді

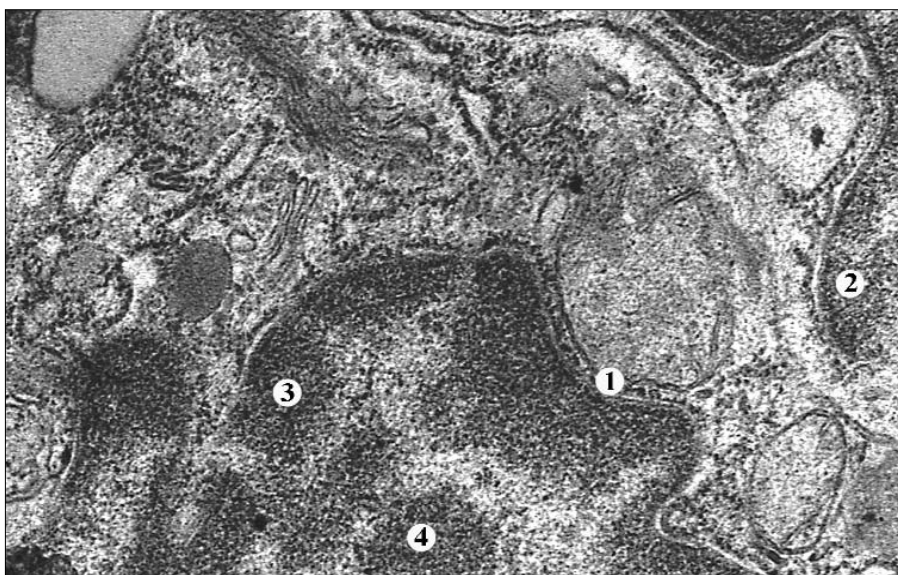


Рис. 1. Малодиференційована мезенхімоподібна клітина. Збільшення 23000 $\times$ :  
1 – ядерна мембрана; 2 – електроннощільний матрикс; 3 – хроматин; 4 – ядрце.

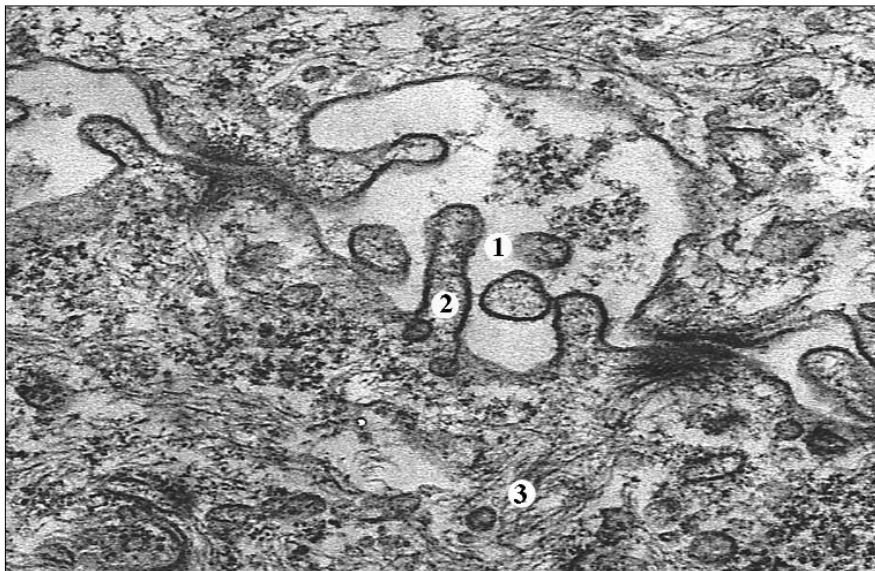


Рис. 2. Клітина-попередник ендотеліальних клітин. Збільшення 23000:  
 1 – первинні каналні; 2 – десмосомоподібний контакт;  
 3 – хаотично розташовані фібрилярні структури.

ендотеліоцити (рис. 2). У деяких відділах капіляра суміжні ендотеліоцити утворюють складки, інвагінації. Тут же спостерігаються ендотеліоцити з підвищеною функціональною активністю, фрагментованою базальною мембраною і наявністю виростів та трубочок на боці базальної поверхні клітин з наступним подовженням бруньки зростання і утворенням тяжів ендотеліоцитів. Цитоплазма клітин, що диференціюються, вирізняється більшою насиченістю органелами. Скоріш за все, подібний поліморфізм свідчить про стимулювальну дію трансплантованих стромальних клітин. Однією з ранніх ультраструктурних ознак формування стінки капіляра є з'єднання мезенхімних клітин за допомогою щільних контактів, які є засобом інформаційного і метаболічного зв'язку клітин одна з другою.

У деяких клітинах спостерігається незначна активація пластичних процесів, про що свідчить гіпертрофія і гіперплазія елементів ендоплазматичного ретикулуму та пластинчастого комплексу, наявність численних поліморфних везикул і вакуолей. У диференційованих ендотеліоцитах виявлені щільні і мультивезикулярні тільця, лізосомальні структури. Цитоплазма містить активні мітохондрії, мікротрубочки, рибосоми, полісоми. Має місце деяке підвищення кількості мікропіноцитозних везикул. Численні мітохондрії мають різну довжину і форму, зазвичай тісно асоціюються з цистернами

зернистої ендоплазматичної сітки. Мітохондрії характеризуються короткими впорядкованими кристами та матриксом плямистої структури.

У всіх хворих отримані позитивні клінічні результати: зменшилися прояви больового синдрому, трофічні виразки на кінцівках загоїлися; хворі з IV ступенем хронічної ішемії перекваліфіковані у ступінь II Б. У всіх хворих збільшилася в середньому вдвічі дистанція безбольового ходіння. При інструментальному дослідженні виявлено незначне, в середньому на 5-10%, збільшення сегментарного тиску на ішемізованій кінцівці. Дані лазерної флуометрії свідчили про поліпшення 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 призводить до активації процесів ангіогенезу, про що свідчать істотні зміни ендотеліоцитів капілярів як основної ланки процесу утворення судин *de novo*. 2. Через місяць після трансплантації утворюються молоді ендотеліоцити, які перебувають на різних етапах диференціювання і утворюють первинні судинні капіляри. 3. Клінічно дана стимуляція ангіогенезу виражається зменшенням больового синдрому, загоєнням трофічних розладів, подвійним збільшенням дистанції ходіння та покращенням показників мікроциркуляції на 25-20%.

## Література

1. Lachmann N. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery disease: stem cell therapy / N.Lachmann, S.Nikol // *Vasa*. – 2007. – Vol. 36, № 4. – P. 241-251.
2. Wester T. Treatment with autologous bone marrow mononuclear cells in patients with critical lower limb ischaemia. A pilot study / T.Wester, J.J.J?rgensen, E.Stranden [et al.] // *Scand. J. Surg.* – 2008. – Vol. 97, № 1. – P. 56-62.
3. Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia using autologous bone marrow cell transplantation / H.Matsubara // *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. – 2003. – № 10. – P. 877-883.
4. Tuteishi-Yuyama E. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial / E.Tuteishi-Yuyama, H.Matsubara, T.Murohara [et al.] // *Lancet*. – 2002. – Vol. 360. – P. 427-435.
5. Kirana S. Wound therapy with autologous bone marrow stem cells in diabetic patients with ischaemia-induced tissue ulcers affecting the lower limbs / S.Kirana, B.Stratmann, D.Lammers // *Int. J. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 61, № 4. – P. 690-692.
6. Oda M. Prognostic factors for critical limb ischemia after autologous bone marrow implantation / M.Oda, K.Kato, K.Toba [et al.] // *J. Cardiol.* – 2007. – Vol. 50, №4. – P. 235-242.
7. Frid M.G. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis / M.G.Frid, V.A.Kale, K.R.Stenmark // *Circulat. Res.* – 2002. – Vol. 90. – P. 1189-1202.
8. Badorff C. 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.

### ИЗМЕНЕНИЯ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

**Резюме.** Цель исследования – изучить влияние трансплантации мультипотентных стромальных клеток собственной жировой ткани на изменение клеток эндотелия сосудов у больных хронической ишемией конечностей. Доказана эффективность применения ауто трансплантации мультипотентных стромальных клеток собственной жировой ткани для стимуляции процессов ангиогенеза в зоне ишемии.

**Ключевые слова:** хроническая ишемия, непря- мая реваскуляризация, электронная микроскопия.

### CHANGES OF VASCULAR ENDOTHELIUM WITH THE CHRONIC ISCHEMIA OF EXTREMITIES AFTER TRANSPLANTING MULTIPOTENT STROMAL CELLS OF THE FAT-TY TISSUE

**Abstract.** The purpose of the research was to study the influence of the transplantation of multipotent stromal cells of their own fatty tissue on a change of endothelial cells of the vessels in patients with chronic ischemia of the extremities. The efficacy of applying autotransplantations of multipotent stromal cells of their own fatty tissue for the purpose of stimulating the processes of angiogenesis in the zone of ischemia has been corroborated.

**Key words:** chronic ischemia, indirect revascularization, electron microscopy.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла 24.12.2010 р.

Рецензент – д. мед. н. І.Ю.Олійник (Чернівці)