

УДК 616-089.844:611.013.68.018]:612.017.1

*Д.Б. Домбровський, В.В. Савін, Ю.В. Оліник, Ю.Р. Пшиборовська, В.В. Максим'юк*  
Кафедра хірургії (зав. – проф. І.Ю. Полянський) Буковинського державного медичного університету,  
м. Чернівці

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЗА РІЗНИХ УМОВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**Резюме.** В експерименті доведена ефективність введення стовбурових клітин кордової крові в ішемізовані кінцівки. Встановлено, що введення стовбурових клітин кордової крові на тлі ішемії сприяло постійній структурній стимуляції регенераторних процесів і ангиогенеза. На 7-14-ту добу експерименту з наявністю кровотоку в “молодих” судинах, що підтверджувалося дослідженням експресії фактору Віллебранда. Разом з цим відмічені позитивні дані про зменшення та відсутність фіброзування, які характерні для розвитку ішемії, що підтверджується дослідженнями колагену IV типу і мезенхімального фактору віментину.

**Ключові слова:** кінцівка, ішемія, кордова кров.

Кордову кров застосовують у лікуванні близько сотні різноманітних захворювань [1, 2], адже вона містить більше 60 видів біологічно активних речовин, фетальних факторів росту і, що найголовніше, стовбурові клітини різних видів у високій концентрації [3-5].

З них утворюються всі 220 типів спеціалізованих клітин та тканин організму. Порівняно з іншими джерелами алогенних (донорських) кровотворних стовбурових клітин, клітини кордової крові володіють суттєвими логічними та клінічними перевагами, такими як: більша доступність трансплантата для пацієнтів; розширення пулу донорів за рахунок толерантності при 1-2 HLA-несумісності з шести можливих (більша кількість несумісності пов'язано з меншою імовірністю приживання) [6]; менша частота та тяжкість реакції “трансплантат проти хазяїна”; менший ризик передачі латентних вірусних інфекцій; відсутність ризику для донора [7].

Крім того, щодо трансплантації стовбурових клітин кордової крові немає юридичних, моральних, релігійних та етичних застережень, пов'язаних з медичним використанням.

**Мета дослідження:** на експериментальній моделі ішемії кінцівки за допомогою імуногістохімічних методів дослідити процеси, що відбуваються після трансплантації стовбурових клітин кордової крові, залежно від різних умов їх трансплантації.

**Матеріали та методи.** Всі оперативні

втручання на 60 щурах проводились під кетаміновим наркозом. Середня маса щурів становила  $374,23 \pm 7,56$  г, вік  $6 \pm 1,2$  місяці, що знаходились при кімнатній температурі, на звичайному лабораторному раціоні. Тварини були розподілені на три групи I група – тварини, у яких була модельована ішемія кінцівки; II група - тварини, яким в інтактні м'язи вводилися стовбурові клітини кордової крові; III група – тварини, яким на тлі ішемії кінцівки були введені стовбурові клітини кордової крові.

При проведенні досліджень зберігались всі умови асептики та антисептики. Моделювання ішемії тканини кінцівки у щура проводилось за методом Т.А. Князевої [8], згідно якої ішемія досягається шляхом накладання двох лігатур із капронової нитки навколо судинної ніжки стегна, таким чином перев'язується артерія, вена та нерв, поглиблюючи ішемічні явища в кінцівці вже на 2-3 добу після моделювання.

Дослідження проводили в рамках доклінічного етапу дослідження згідно наказу МОЗ України від 10.10.2007 № 630 “Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань й унесення змін до Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань”.

Кордову кров отримували на безкоштовній основі з банку пуповинної крові ТОВ “Інститут

клітинної терапії". Пуповинну кров збирали при нормальних пологах з інформативної згоди жінок, що були обстежені на наявність вірусних та гемічних інфекцій (тестування на сифіліс, гепатит С, HbsAg, ВІЛ-інфекцію). Пуповинну кров сепарували шляхом спонтанної седиментації з 3% розчином желатину, фракцію ядровмісних клітин віокремлювали від еритроцитів та центрифугували для видалення плазми ( $20\text{ с}^{-1}$ , 10 хв). Для кріоконсервування використовували 5% диметилсульфоксид (ДМСО), виготовлений на збалансованому соляному розчині Хенкса. Суспензію за допомогою одноразових шприців розливали в кріоампули об'ємом 4,5 мл та по 1 мл в 4 контейнери-спутники, герметизували, маркували. Зберігали заморожені зразки у рідкому азоті при температурі  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  у кріосховищі "38Kw/Kryos Controler" [9,10]. Кріоконсервовану клітинну суспензію та тканину досліджували на стерильність відповідно до Інструкції, затвердженої наказом МОЗ України від 05.07.99 № 164 "Контроль стерильності консервованої крові, її компонентів, препаратів, консервованого кісткового мозку, плазмозамінюючих та консервуючих розчинів, умов їх заготівлі". Використовували клітинну суспензію з такими параметрами: вміст ядровмісних клітин – від  $0,11 \times 10^9$  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+ і CD117+ CD45+[11], дорівнював відповідно  $(0,85 \pm 0,20)$  та  $(1,52 \pm 0,39)\%$ .

Стовбурові клітини кордової крові вводили в ішемізовані кінцівки на третю добу після моделювання ішемії підфасціалью тонкою смужкою на присередній поверхні стегна. Загальна кількість введеної кордової крові становила  $50 \pm 5$  мл. Статистичну обробку отриманих даних проведено за Стьюдентом з визначенням t-критерію за програмою "BioStat".

У всіх дослідних та контрольних груп тварин по закінченню терміну дослідження була взята м'язова тканина присередньої та бічної поверхонь стегна на стороні проведення експерименту на 3-тю, 5-ту, 7-му, 14-ту, 21-шу та 25-ту доби після моделювання ішемії на кінцівці, після чого були застосовані імуногістохімічні методи дослідження отриманої м'язової тканини. Проводилось визначення експресії віментину із використанням тест системи CBL202 Vimentin MS X HU-100 UG, (фірма-виробник "Milipur", США), колагену IV типу – тест-система MAB 1910 Collagen IV MS X HU-100 UL (фірма-виробник "Milipur", США) та фактору

Віллебранда за допомогою тестової системи AB7356 VWF RBX-100UG (фірма-виробник "Milipur", США).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Імуногістохімічні параметри віментину, колагену IV типу і фактору Віллебранда у I групи тварин були виражені нерівномірно та змінювалися в динаміці ішемії.

Так, експресія віментину була найбільшою на 7-14-ту добу від моменту моделювання ішемії, в між'язових волокнах, що оточують судинні пучки, а також в мембранах стінки судин венозного та артеріального типів (рис.1).

Виявлені вогнища фрагментації мезенхімальних структур на тлі дистрофії та деструкції міопласту, які зменшувалися та зникали до 20-25 доби після моделювання ішемії (рис. 2).

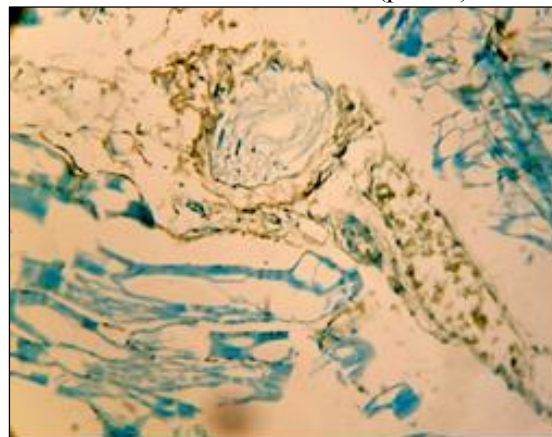


Рис. 1. Група I. Сьома доба ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 20

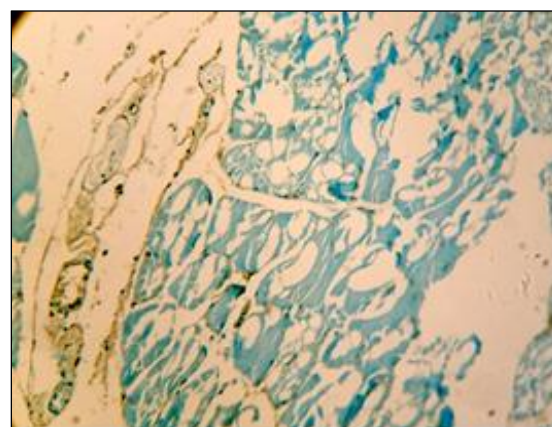


Рис. 2. Група I. Двадцять п'ята доба. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 20

При цьому експресія колагену IV типу найбільш виражена в стінці артеріальних судин при повнокров'ї їх на 7-14-ту добу ішемії та вогнища в розволоненій стінці венул (рис. 3).

Фактор Віллебранда експресувався в ендотеліальних структурах судин (рис. 4). Особливо виражена реакція в повнокровних судинах, в ендомізії перимізії на 2-гу і 7-му добу ішемії.

Отже, внаслідок моделювання ішемії спостерігались виражені зміни на 2-10-ту добу, які характеризуються розладом кровообігу в судинах, особливо венозного типа, деструкцією і дистрофією

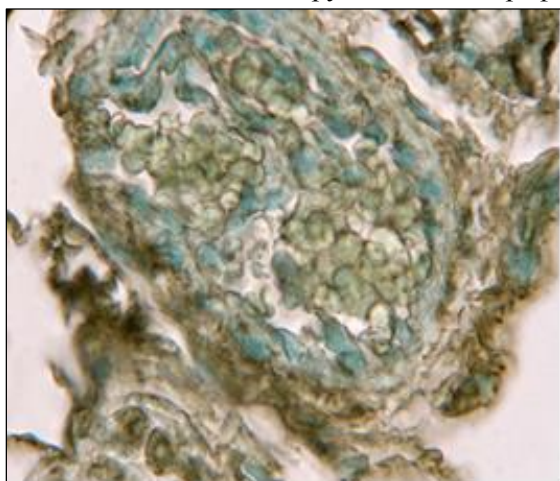


Рис. 3. Група I. Десята доба ішемії. Експресія колагену IV типу в стінці артеріальної і венозної судини, в якій спостерігається повнокров'я і стаз еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40

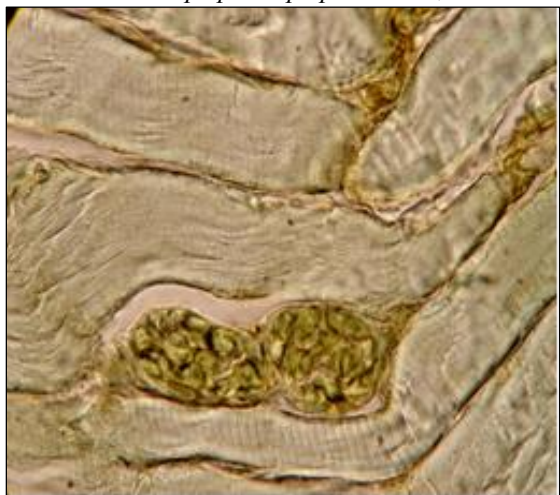


Рис. 4. Група 2. Друга доби ішемії. Експресія фактору Віллебранда на 2 добу ішемії на тлі повнокров'я капілярів і судин венозного типа, стази еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактору Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40

40

м'язових волокон, які зменшуються на 20-25-ту добу, проте з'являється фіброзування та склероз стінки судин в перимізії, як показник регенерації.

При гістологічному дослідженні в II групі при введенні стовбурових клітин кордової крові (дослідження проведені на 7-му, 14-ту, 21-шу добу після введення стовбурових клітин кордової крові) було виявлено, що на 14-ту, 21-шу добу структурні зміни в міосімпласті були аналогічні описаним в контрольній групі (група I). На 7 день – в частині спостережень спостерігались невеликі вогнища набряку в навколишній проміжній тканині міосімпласта, а також ділянки втрати поперечної смугастості в м'язових волокнах. Проте, в більшості спостережень було виявлено нерівномірне накопичення глікогену в центральних ділянках міосімпласта.

У поодиноких спостереженнях (біля 20%) були виявлені вогнища лімфо-макрофагальних інфільтратів на 7 день після введення стромальної фракції жирової тканини.

Імуногістохімічна реакція на віментин в цей термін була аналогічна з I групою дослідження і спостерігалась у вигляді тонких волокнистих структур в мезенхімі (рис. 5). Колаген IV типу експресувався в базальних шарах мембранних структур міосімпласта (рис. 6).

Отже, в II групі, імуногістохімічно виявлено, що структура м'язових волокон і судин без особливостей, патологічних змін не виявлено. В експресії моноклональних антитіл до віментину, колагену IV типу, а також до фактору Віллебранда не спостерігається патологічних змін.

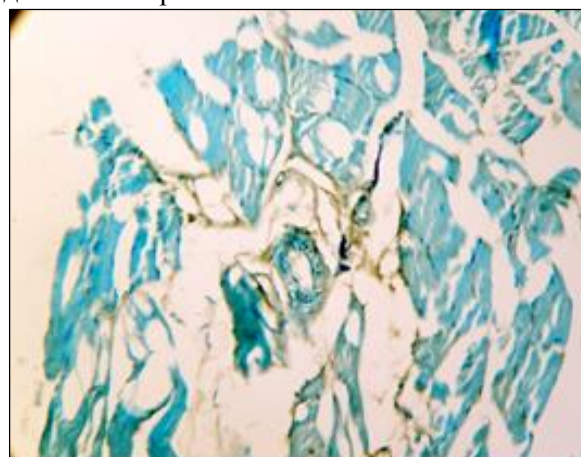


Рис. 5. Група II. Осередкова експресія віментину периваскулярно в межзоточній речовині перимізії. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10 Об. 20

Об. 20

Відмічено в даній групі піддослідних тварин на 7-му добу після трансплантації наявність вогнищ лімфо-макрофагальних інфільтратів.

При дослідженні м'язів ішемізованої кінцівки тварин III групи вже на 14-ту добу в ділянках перимізії в мезенхімальних структурах спостерігається наявність новоутворених капілярів та судинних тяжів, при цьому, імуногістохімічно спостерігається виражена експресія фактору Віллебранда в ендотеліальних клітинах (рис. 7), що вказує на активний ангиогенез на 14-ту добу і подальший термін.

На 14-21-шу добу виявлені вогнища ангиогенезу і регенерації з розташованими, в сполуч-

нотканинних та фіброзних вогнищах, множинними дрібними судинами, які виявляються постійно у всіх спостереженнях.

При проведенні імуногістохімічної реакції слабо позитивна експресія віментину (рис. 8) визначалася в мезенхімальних структурах. Виражена імуногістохімічна реакція на колаген IV типу з 14-ої, особливо з 21-ої доби спостерігалась в потовщеній базальній мембрані судин, що розташовані в перемізії, особливо артеріального типу. У вогнищах перимізії ніжно-волокнисті структури базальних мембран (рис. 9).

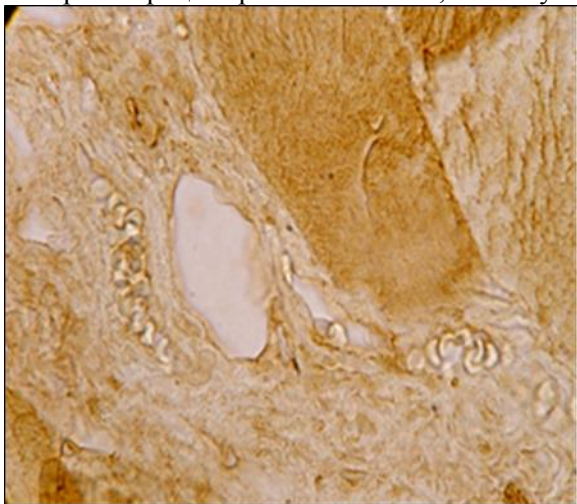


Рис. 6. Група II. Експресія колагену IV типу в базальних мембранах навколо міосімпластів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10 Об. 20

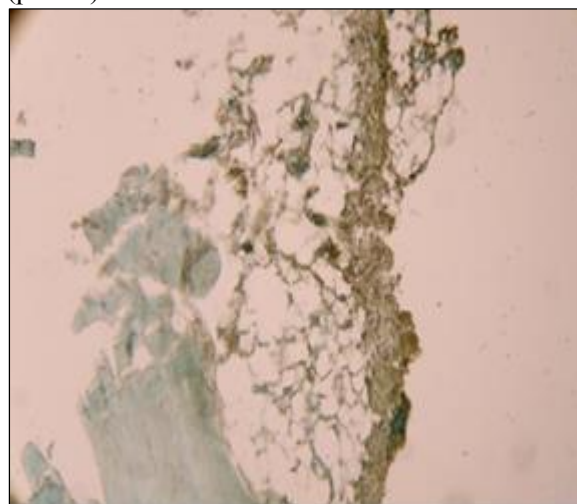


Рис. 8. Чотирнадцята доба. Слабо виражена експресія віментину судин в перимізії. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. а) Ок. 10, Об. 40; б) Ок. 10, Об. 10

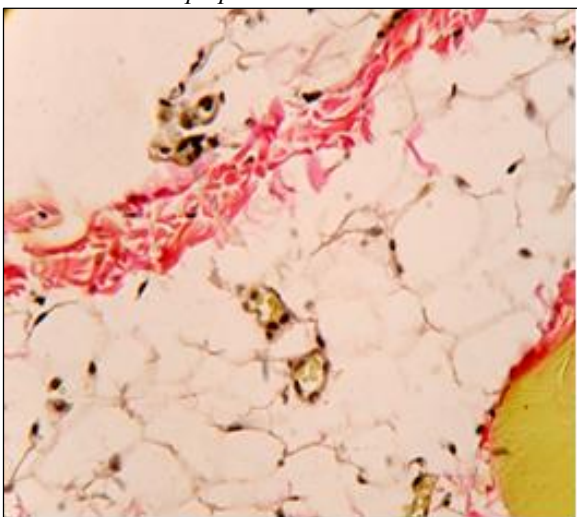


Рис. 7. Чотирнадцята доба. Експресія фактору Віллебранда в ендотелії новоутворених капілярів та судинних тяжів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактору Віллебранда з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40

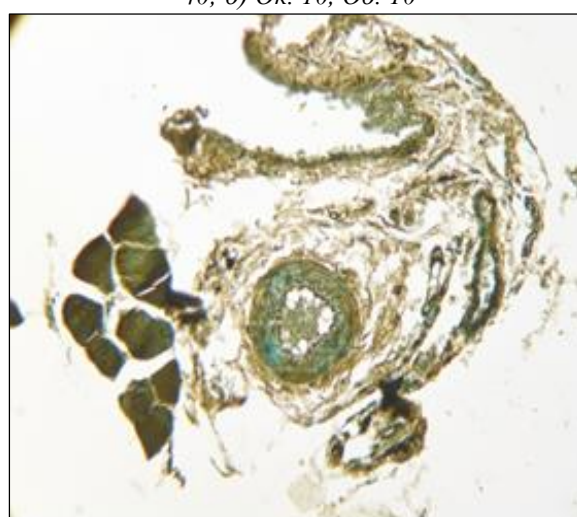


Рис. 9. Експресія колагену IV типу в базальній мембрані судини. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40

Новоутворені капілярні структури були виявлені зрідка на 7-му добу, систематично на 14-ту добу в ендOPEREMІЗІАЛЬНИХ структурах, судини повнокровні, або з поодинокими еритроцитами, тобто, в них здійснюється кровотік.

Отже, введення стовбурових клітин кордової крові на тлі ішемії сприяло постійній структурній стимуляції регенераторних процесів і ангиогенеза. На 7-14-ту добу експерименту з наявністю кровотоку в "молодих" судинах, що підтверджувалося дослідженням експресії фактору Віллебранда. Разом з цим відмічені позитивні дані про зменшення та відсутність фіброзування, які характерні для розвитку ішемії, що підтверджується дослідженнями колагену IV типу і мезенхімального фактору віментину.

**Висновки.** 1. Трансплантація стовбурових клітин кордової крові на тлі ішемії кінцівки призводить до того, що на 3 добу після трансплантації починаються активні процеси компенсування ішемічного ураження. На 7-14-ту добу з'являються молоді ендотеліоцити. Також в цей термін мають місце характерні ознаки макроструктурних змін, зокрема збільшення експресії віментину та фактору Вілле-

бранда. В цей же термін утворюються трубочки ендотеліоцитів, які в подальшому вже на 22-гу добу після трансплантації утворюють розгалужену, активно функціонуючу мережу новоутворених капілярів. 2. Введення стовбурових клітин кордової крові в інтактні м'язи кінцівки тварин не призводило до жодних змін в структурі м'яза та зміни імуногістохімічних реакцій по відношенню до контрольної групи, за виключенням наявності на початкових етапах дослідження лімфо-макрофагальних інфільтратів, що є наслідком, скоріше за все, самого введення стовбурових клітин в м'язову тканину. Ключовим моментом, що направляє процес диференціації стовбурових клітин є характер середовища, куди відбувається трансплантація клітин і зумовлює зміни клітин в необхідному напрямку в межах їх потенціалу диференціації.

**Перспективи наукового пошуку.** Проведені експериментальні дослідження доводять суттєву активацію ангиогенеза на тлі ішемії, що доцільно розглядати як до клінічний етап даного дослідження з подальшим продовженням вивчення цих процесів у клінічних умовах.

#### Список використаної літератури:

1. Літвінова Н.Ю. Перспективи використання пуповинної крові для лікування ішемії нижніх кінцівок / Н.Ю. Літвінова, Р.В. Салютін, Л.А. Панченко // *Кардіол. і кардіохірургія.* – 2013. – № 1 (41). – С. 85-93.
2. Насадюк Х.М. Клітинні технології з використанням пуповинної крові в терапії невиліковних захворювань / Х.М. Насадюк // *Здоров'я України.* – 2010. – № 4 (31). – С. 22-25.
3. Burger S.R. Umbilical cord blood stem cells / S.R. Burger // *Handbook of Transfusion.* London: Medicine Academic Press. – 2001. – P. 17-21.
4. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine / D.T. Harris, M. Badowski, N. Ahmad, M.A. Gaballa // *Expert Opinion on Biological Therapy.* – 2007. – Vol. 7, № 9. – P.1311-1322.
5. Watt S. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential / S. Watt, M. Contreras // *Semin. Fetal Neonat. Med.* – 2005. – Vol. 209, № 10. – P. 201-207.
6. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy / J.N. Barker, D.J. Weisdorf, T.E. DeFor [et al.] // *Blood.* – 2005. – Vol. 105, № 3. – P. 1343-1347.
7. Gluckman E. Cord blood transplantation: state of the art / E. Gluckman, V. Rocha // *Haematologica.* – 2009. – № 94 (4). – P. 451-454.
8. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани // Т.А. Князева // *Вестн. Акад. Мед. наук СССР.* – 1974. – № 12. – С. 3-8.
9. Кріоконсервування гемопоетичних стовбурових клітин кордової крові для клінічної практики / Л.О. Бабійчук, П.М. Зубов, В.В. Рязанцев, О.Л.Зубова // *Вісн. невідкладної та відновної мед.* – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 19-22.
10. Effect of Cryopreservation According Two-Stage Program in High-Molecular Dextran Solutions on Cytomorphological and Functional Properties of Human Cord Blood Cells / O.Yu. Kozhina, M.V. Ostankov [et al.] // *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* – 2013. – Vol. 23, № 1. – P. 58-65.
11. Loss of CD34+ hemathopoietic cells due to washing can be educed by the use of fixative-free erythrocytes lysing reagents / J.W. Gratama, P. Menendez, J. Kraan, A. Orfao // *J. Immunol. Methods.* – 2000. – V. 239. – P. 13-23.

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Резюме.** В эксперименте доказана эффективность введения стволовых клеток кордовой крови в ишемизированные конечности. Установлено, что введение стволовых клеток кордовой крови на фоне ишемии способствовало постоянной структурной стимуляции регенераторных процессов и ангиогенеза. На 7-14-ые сутки эксперимента с наличием кровотока в "молодых" сосудах, что подтверждалось исследованием экспрессии фактора Виллебранда. Вместе с этим отмечены положительные данные об уменьшении и отсутствии фиброобразования, которые характерны для развития ишемии, что подтверждается исследованиями коллагена IV типа и мезенхимального фактора виментина.

**Ключевые слова:** конечность, ишемия, кордовая кровь.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL DIFFERENTIATION CHARACTERISTICS CORD BLOOD CELLS IN DIFFERENT CONDITIONS TRANSPLANTATION IN AN EXPERIMENT**

**Abstract.** The experiment proved the effectiveness of the introduction of stem cell cord blood in ischemic limbs. Established that the introduction of stem cells in cord blood background ischemia contributed to ongoing structural stimulate regenerative processes and angiogenesis. On days 7-14 of the experiment with the presence of blood flow in the "young" vessels, which was confirmed the study of expression of von Willebrand factor. Together with this marked by positive data on reduction and absence formation of fibrosis that are characteristic of ischemia demonstrated by studies of collagen type IV and vimentin mesenchymal factor

**Key words:** limb, ischemia, cord blood.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла 25.10.2013 р.

Рецензент – проф. Давиденко І.С. (Чернівці)