

УДК 576.3/.7.086.83:616.13:617.58

*В.К. Гринь, А.Г. Попандоуло, А.В. Оберемко,
П.Л. Варшавер, Н.Б. Родіна*

ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В. К. Гусака НАМН України»

ВІДНОВЛЕННЯ НОРМАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ М'ЯЗІВ КІНЦІВОК ЩУРІВ ПІСЛЯ ФОРМУВАННЯ ХРОНІЧНОЇ ІШЕМІЇ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН

Хронічні облітеруючі захворювання артерій нижніх кінцівок в Україні становлять більш ніж 20 % від усіх уражень серцево-судинної системи, призводячи досить часто до інвалідизації пацієнтів, що являє собою серйозну медико-соціальну проблему. Метою даної роботи було визначити вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку на відновлення нормальної функції м'язів нижніх кінцівок щурів за умов експериментальної хронічної ішемії нижніх кінцівок. Щури лінії Вістар-Кіото були поділені на 5 груп, двом з котрих виконувалась трансплантація стромальних клітин кісткового мозку. Всі тварини досліджувалися в тестах одномоментного пробігу та примусового плавання. Результати показали, що починаючи з 5-ї доби, показник одномоментного пробігу у тварин, яким вводили МСК, збільшувався і становив $(2,11 \pm 0,13)$ та $(1,78 \pm 0,12)$ м відповідно, вірогідно відрізняючись від показників контрольної групи та тварин, яким внутрішньом'язово вводився фізіологічний розчин ($p < 0,001$). Збільшення терміну примусового плавання для тварин, яким вводились МСК, почалось вже на 5-у добу експерименту, а на 14-у добу складало $(8,05 \pm 0,35)$ і $(7,16 \pm 0,35)$ хв. відповідно, вірогідно відрізняючись від показників цього ж терміну дослідження контрольної групи та тварин, яким внутрішньом'язово вводився фізіологічний розчин ($p < 0,001$). Отже, результати проведених досліджень показали швидке відновлення функціонального стану тканин кінцівок тих щурів, яким виконувалась трансплантація МСК кісткового мозку.

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, на них страждають 2–3 % від загальної чисельності населення, при чому кількість хворих з облітеруючими захворюваннями артерій кінцівок невинно зростає [1], а експерти ВООЗ прогнозують, що найближчими роками очікується зростання цієї патології на 5–7 %. Хронічні облітеруючі захворювання артерій кінцівок призводять досить часто до інвалідизації пацієнтів, що являє собою серйозну медико-соціальну проблему [2].

Незважаючи на значний прогрес судинної хірургії за останнє десятиріччя, лікування хворих з критичною ішемією нижніх кінцівок, обумовленою дистальним типом порушення

кровообігу, залишається актуальною проблемою. Однією з основних причин незадовільних результатів реконструктивних операцій є недостатній стан шляхів відтоку, обумовлений облітерацією артерій гомілки та стопи, що спостерігається у 34,3–54,3 % пацієнтів [3]. У 14,9–20 % пацієнтів має місце тотальна облітерація артерій гомілки і стопи. У цьому випадку традиційні реконструктивні операції нездійсненні [4].

Застосування сучасних медикаментозних препаратів зменшує клінічні прояви ішемічного стану, однак не усуває наслідків основного захворювання і не є етіопатогенетичним лікуванням [5, 6]. У разі відсутності анатомічно-функціональних умов для виконання оперативних втручань, спрямованих на поліпшен-

© В.К. Гринь, А.Г. Попандоуло, А.В. Оберемко та ін., 2012

ня магістрального судинного кровообігу і з урахуванням недостатньої ефективності консервативного лікування розглядають питання щодо подальшого лікування шляхом стимульованого ангиогенезу [7, 8]. Передусім це необхідно у випадку декомпенсації у хворих із хронічною ішемією кінцівок, яка зумовлена облітеруючим або оклюзійним ураженням артеріального русла [9].

Ідея клітинної трансплантації для лікування ішемії нижніх кінцівок 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-прогеніторів.

Метою даної роботи було визначити вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку на відновлення нормальної функції м'язів нижніх кінцівок шурів за умов експериментальної хронічної ішемії нижніх кінцівок.

Матеріал і методи. Експериментальне дослідження проводилось на інбредній лінії шурів Вістар масою 270–340 г. Вибір шурів 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.

МСК отримували з кісткового мозку. Після первинного виділення клітини культивувались в поживному середовищі DMEM/F12 1:1 з додаванням 15 % ембріональної телячої сироватки, глютаміну, L-аскорбінової кислоти та основного фактора росту фібробластів. Клітини культивували у CO₂-інкубаторі при температурі 37 °C, 5 % вмісті вуглекислого газу та 95 % вологості. Середовище змінювали кожні три доби. Культивування продовжували до досягнення клітинного моношару, після чого здійснювали пасажування розчином 0,25 % трипсин/версену. Виділені МСК при маркуванні антитілами (BD Biosciences Pharmingen, США) 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*.

Експериментальне моделювання хронічної ішемії кінцівки шурів проведено за методикою, розробленою в ДУ «ІНВХ ім В. К. Гусака НАМНУ». Після двоетапного оперативного втручання з метою прошивання стовбура та гілок стегнової артерії було підтверджено наявність хронічної ішемії кінцівки в усіх шурів. Клінічне підтвердження ґрунтувалось на появі трофічних виразок на оперованих кінцівках та кульгавості у шурів. Інструментальне підтвердження було отримане шляхом лазерного доплерівського флоуметрування (ЛДФ) голчастим зондом та порівняння ЛДФ-грам здорової та оперованої кінцівок (спостерігалось значне зниження рівня 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.

Усі тварини були розподілені на 5 груп. Перша група (контрольна), n=15 – формування хронічної ішемії без подальшого лікування. Друга група, n=15 – внутрішньом'язове введення фізіологічного розчину. Третя група, n=15 – внутрішньом'язове введення аутокрові як агента формування місцевого асептичного запалення, та завдяки цьому як можливого джерела неоангіогенезу в уражених кінцівках. Четверта група, n=15 – внутрішньом'язове введення МСК, як джерела ангиогенезу. П'ята група, n=15 – інтраваскулярне введення МСК.

Курс введення клітинної суспензії МСК при інтраваскулярному та внутрішньом'язовому введенні – одноразово дозою 2×10⁶ на кілограм ваги в чотирьох точках: по дві в ділянки гомілки та стегна.

Клінічні дані в групах оцінювали за довжиною одномоментного пробігу до появи болю в задній кінцівці, показником якого було щадіння кінцівки під час бігу, поява писку та покусання ішемізованої кінцівки, а також за терміном тесту примусового плавання – до моменту повної відсутності рухів у кінцівці, де змодельована ішемія.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням ліцензійного пакета «MedStat» (версія 3, сер.

номер MS000027) з використанням адекватних методів біостатистики. При значеннях $p < 0,05$ відмінності вважали достовірними.

Результати та їх обговорення. В результаті експериментальних досліджень було встановлено, що у тварин першої (контрольної) групи показники тесту одномоментного пробігу склали від $(0,79 \pm 0,21)$ м на 3-ю добу до $(1,18 \pm 0,12)$ м на 25-у добу, невірогідно ($p > 0,05$) відрізняючись від показників у тварин другої групи, яким було виконано внутрішньом'язове введення фізіологічного розчину [від $(0,90 \pm 0,11)$ м на 3-ю добу до $(1,20 \pm 0,14)$ м на 25-у добу]. У тварин, яким була виконана трансплантація МСК кісткового мозку внутрішньом'язово (IV група) та інтраваскулярно (V група), цей показник складав на 3-ю добу $(1,11 \pm 0,14)$ та $(0,81 \pm 0,11)$ м відповідно і зберігався досить низьким до 5-ї доби експерименту. Починаючи з 5-ї доби, показник одномоментного пробігу збільшувався і становив $(2,11 \pm 0,13)$ та $(1,78 \pm 0,12)$ м відповідно, вірогідно відрізняючись від показників I та II груп тварин в цей же термін дослідження ($p < 0,001$). Наприкінці дослідження показник тесту складав вже $(2,91 \pm 0,12)$ та $(2,71 \pm 0,11)$ м відповідно. Показники тесту у тварин IV та V груп були подібні та вірогідно відрізнялись ($p < 0,001$) між собою. Також мало місце незначне підвищення дистанції пробігу і в III групі тварин, яким була проведена трансплантація аутокрові на тлі ішемії кінцівки, проте, на відміну від тварин IV та V груп, це спостерігалось лише на 14-у добу експерименту, складаючи $(1,23 \pm 0,15)$ м, відмінності між III та IV, V групами вірогідні на рівні значущості $p < 0,001$.

Показники тесту примусового плавання у I та II групі тварин на 3-ю добу склали $(3,14 \pm 0,44)$ хв. і $(3,42 \pm 0,52)$ хв відповідно та майже не змінювались до 25-ї доби експерименту. На 25-у добу експерименту показники тесту для I та II груп склали $(5,01 \pm 0,57)$ хв і $(5,22 \pm 0,54)$ хв відповідно. В IV та V групі тварин збільшення терміну примусового плавання почалось вже на 5-у добу експерименту, а на 14-у добу складало $(8,05 \pm 0,35)$ хв і $(7,16 \pm 0,35)$ хв відповідно, вірогідно відрізняючись від показників цього ж терміну дослідження тварин I та II груп ($p < 0,001$). Також мало місце незначне підвищення показників тесту примусового плавання і в III групі тва-

рин, проте, на відміну від тварин IV та V груп, це спостерігалось лише на 25-у добу експерименту, складаючи $(3,45 \pm 0,35)$ хв., відмінності між III та IV, V групами вірогідні на рівні значущості $p < 0,001$.

Результати проведення тестів засвідчили про клінічне покращення кровотоку в ішемізованих кінцівках після як інтраваскулярного, так і внутрішньом'язового введення суспензії МСК порівняно з тими тваринами, яким не проводилась трансплантація стромальних клітин в ішемізовані тканини, та тими тваринами, яким внутрішньом'язово вводили фізіологічний розчин. Застосування МСК кісткового мозку порівняно з внутрішньом'язовим введенням аутокрові в експерименті на фоні ішемії дало більш швидке відновлення нормальної функції м'язів кінцівки. Проведення тестів підтверджує припущення про активацію процесів ангиогенезу в ішемізованих кінцівках на тлі трансплантації стромальних клітин кісткового мозку, але для визначення безпосередніх процесів, що відбуваються в ділянці ураження, та визначення механізмів впливу МСК кісткового мозку планується проведення гістологічних досліджень в усіх групах тварин.

Результати експериментальних досліджень показали, що вплив МСК кісткового мозку на покращення кровотоку та відновлення нормальної функції м'язів нижньої кінцівки щурів подібний до впливу МСК жирової тканини, дослідженому в [10]. В роботі [11] також показано, що трансплантація клітинного матеріалу, а саме стовбурових клітин периферичної крові, поліпшувала в експерименті показники колатерального кровообігу в ураженій кінцівці.

Висновки

1. Трансплантація МСК кісткового мозку в ішемізовані кінцівки дослідних тварин дозволила вже через 5 діб після трансплантації в 2 рази збільшити дистанцію одномоментного пробігу тварин, порівняно з контрольною групою та групою тварин, яким внутрішньом'язово вводили фізіологічний розчин.

2. Трансплантація МСК кісткового мозку в ішемізовані кінцівки дослідних тварин дозволила вже через 14 діб після трансплантації у 2,5 рази збільшити показники тесту примусового плавання, порівняно з контрольною

групою та групою тварин, яким внутрішньом'язово вводився фізіологічний розчин.

3. Результати проведених досліджень показали швидке відновлення функціонального стану тканин кінцівки тих шурів, яким виконувалась трансплантація МСК кісткового мозку.

4. Внутрішньом'язове введення аутокрові в ішемізовану кінцівку було малоефективним.

5. Результати тестів на щурах були кращими у тих тварин, яким внутрішньом'язово вводилась суспензія МСК, ніж тих, яким МСК вводили інтраваскулярно.

Список літератури

1. *Покровский А. В.* Клиническая ангиология : рук-во для врачей : в 2 т. / под ред. А. В. Покровского. — М. : Медицина, 2004. — Т. 1. — 808 с.

2. *Кобза І. І.* Можливості консервативного лікування хворих з хронічною критичною ішемією нижніх кінцівок / І. І. Кобза, Р. А. Жук, В. А. Надал // Шпитал. хірургія. — 2001. — № 1. — С. 91–93.

3. *Dormandy J.* Major amputation: clinical patterns and predictors / J. Dormandy, L. Heeck, S. Vig // Seminars in vascular surgery. — 1999. — Vol. 12, № 2. — P. 154–161.

4. Лечение окклюзионных заболеваний нижних конечностей по методу Г. И. Илизарова / [А. А. Фокин, А. И. Кулак, Л. А. Фокин и др.] // Хирургия. — 1988. — № 8. — С. 82–85.

5. Лечение критической ишемии нижних конечностей с применением больших доз препарата Актовегин / [В. Г. Мишалов, В. А. Черняк, В. М. Селюк и др.] // Хірургія України. — 2009. — № 1. — С. 65–70.

6. Вазапостан (простагландини E1) в лечении тяжелых стадий артериальной недостаточности нижних конечностей: пособие для врачей / [А. В. Покровский, В. М. Кошкин, А. А. Кириченко и др.]. — М., 1999. — 16 с.

7. *Русин В. І.* Хірургічне лікування дистальних форм атеросклеротичного ураження артерій нижніх кінцівок / В. І. Русин, В. В. Корсак, Я. М. Попович // Практична медицина. — 2008. — Т. 14, № 5. — С. 210–213.

8. *Воронов Д. А.* Стимуляция ангиогенеза в улучшении результатов хирургического лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: экспериментальное обоснование и эффективность клинического применения / Д. А. Воронов, А. В. Гавриленко, Н. П. Бочков // Болезни аорты и ее ветвей. — 2009. — № 3. — С. 45–48.

9. Непряма ревазуляризація нижніх кінцівок при дистальних ураженнях в умовах критичної ішемії / [В. І. Русин., В. В. Корсак, Ю. А. Левчак та ін.] // Хірургія України. — 2009. — № 4. — С. 127–130.

10. *Домбровський 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. Домбровський. — К., 2011. — 40 с.

11. 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. — № 17 (2). — P. 11–15.

В.К. Гринь, А.Г. Попандоупло, А.В. Оберемко, П.Л. Варшавер, Н.Б. Родина

ВОЗОБНОВЛЕНИЕ НОРМАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ МЫШЦ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС ПОСЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей в Украине представляют серьёзную проблему. Целью данной работы было определить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на возобновление нормальной функции мышц конечностей крыс при экспериментальной хронической ишемии нижних конечностей. Крысы линии Вистар–Киото были разделены на 5 групп, двум из которых осуществлялась трансплантация стромальных клеток костного мозга. Все животные исследовались в тестах одномоментного про-

бега и принудительного плавания. Результаты показали быстрое возобновление функционального состояния тканей конечностей тех крыс, которым выполнялась трансплантация мультипотентных стромальных клеток.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга, хроническая ишемия нижних конечностей..

V.K. Gryn, A.G. Popandopulo, A.V. Oberemko, P.L. Varshaver, N.B. Rodina

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

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 renewal of normal function of rat's limb muscles 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. All animals were investigated in tests of one-stage run and compulsory swimming. Results showed fast renewal of a functional condition of limb muscles of rats with transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells.

Key words: bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells, chronic lower limb ischemia.

Поступила 27.04.12