

УДК 617.57/58-005.4-092.4:57.083:612.397:616-089.843

*Д.Б. Домбровський***ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЗА РІЗНИХ УМОВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. Жирова тканина останнім часом розглядається дослідниками як доступне джерело аутологічних стовбурових клітин. Важливим залишається питання факторів, що впливають на направлене диференціювання стовбурових клітин. Проведені експериментальні дослідження на щурах із моделюванням ішемії кінцівки. Дослідним тваринам в ішемізовану кінцівку вводилася стромально-васкулярна фракція жирової тканини. Також стромально-васкулярна фракція вводилася тваринам в інтактні кінцівки. Проведені імуногістохімічні

дослідження (визначення експресії антитіл до фактору Віллебранда, колагену IV типу та віментину) процесів, що відбуваються з уведеними мультипотентними стромальними клітинами, яких багато у стромально-васкулярній фракції жирової тканини на тлі ішемії та без неї. Результати дозволяють визначити перспективність подальшої розробки даного напрямку досліджень.

Ключові слова: ішемія, стромальні стовбурові клітини.

Вступ. Клітинна і геноклітинна терапія є одним із найбільш пріоритетних і багатообіцяючих напрямів у сучасній медицині. Вона проводиться з використанням як аутологічних (власних), так і гетерологічних (отриманих від донора) клітин [1-3]. Трансплантація аутологічних клітин все ширше застосовується для відновлення тканин після видалення ракових утворень, заміщення кісткових і хрящових дефектів, відновлення шкірного покриву після опіків, функціонального відновлення пошкоджень тканин серця і мозку, викликаних інфарктами, інсультами і дегенеративними захворюваннями, а також для лікування критичної ішемії нижніх кінцівок, відновлення функцій печінки і стимуляції кровотворення [4-6].

Кілька років тому виявлено, що в жировій тканині людини сконцентрована популяція клітин, які несуть антиген CD34-115 - мембранний глікофосфопротеїн, який вперше був ідентифікований на гематопоетичних клітинах і мультипотентних клітинах, що відносяться до них [7-10]. Перевагами стромальних клітин жирової тканини для використання в терапевтичних цілях є відносна легкість їх виділення з тканини і можливість отримання в достатньо великій кількості [11, 12].

Мета дослідження. На експериментальній моделі ішемії кінцівки за допомогою імуногістохімічних методів дослідити процеси, що відбуваються після трансплантації стромальних клітин жирової тканини залежно від різних умов їх трансплантації.

Матеріал і методи. Всі оперативні втручання на 60 щурах проводилися під кетаміновим наркозом. Середня маса щурів складала $374,23 \pm 7,56$ г, вік – $6 \pm 1,2$ місяця, що знаходилися при кімнатній температурі, на звичайному лабораторному раціоні. Тварини були розподілені на три групи: I група – тварини, у яких була моделювана ішемія кінцівки, II група – тварини, яким в інтактні м'язи кінцівки вводили стромально-васкулярну фракцію жирової тканини, III група – тварини, яким на тлі ішемії кінцівки була уведена васкулярно-стромальна фракція жирової ткани-

ни. Всі оперативні втручання проводилися на базі експериментального відділу Національного інституту хірургії та трансплантології АМН України. При проведенні досліджень зберігалися всі умови асептики та антисептики. Моделювання ішемії тканини кінцівки у щура проводилося за методом Т.А. Князевої [14], згідно з яким ішемія досягається шляхом накладання двох лігатур із капронової нитки навколо судинної ніжки стегна, таким чином перев'язуються артерія, вена та нерв, поглиблюючи ішемічні явища в кінцівці. Ішемічні прояви виражені вже на 2-3-тю добу після моделювання.

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

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

Виявлені вогнища фрагментації мезенхімальних структур на тлі дистрофії і деструкції міопласту, які зменшувалися і зникали до 20-25-ї доби після моделювання ішемії.

При цьому експресія колагену IV типу найбільш виражена в стінці артеріальних судин при повнокров'ї їх на 7-14-ту добу ішемії і вогнища в розволокненій стінці вени. Фактор Віллебранда експресувався в ендотеліальних структурах судин. Особливо виражена реакція в повнокровних судинах, в ендомізії, перимізії на 2-гу і 7-му добу ішемії.

Отже, внаслідок моделювання ішемії спостерігалися виражені зміни на 2-10-ту добу, які характеризуються розладом кровообігу в судинах, особливо венозного типу, деструкцією і дистрофією м'язових волокон, які зменшуються на 20 - 25-ту добу, проте з'являється фіброзування і склероз стінки судин у перимізії, як показник регенерації.

При гістологічному дослідженні в II групі при введенні стромальної фракції жирової ткани-

ни в інтактні м'язи кінцівки (дослідження проведені на 7, 14, 21-шу добу після уведення стромальної фракції жирової тканини) виявлено, що на 14, 21-шу добу структурні зміни в міосимпласті були аналогічні описаним у контрольній групі (група I). На 7-й день – у частині спостережень спостерігалися невеликі вогнища набряку в навколишній проміжній тканині міосимпласта, а також ділянки втрати поперечної зчерченості в м'язових волокнах. Проте в більшості спостережень виявлено нерівномірне накопичення глікогену в центральних ділянках міосимпласта.

У поодиноких спостереженнях (біля 20 %) виявлені вогнища лімфомакрофагальних інфільтратів на 7-й день після уведення стромальної фракції жирової тканини.

Імуногістохімічна реакція на віментин у цей термін була аналогічна з I групою дослідження і спостерігалась у вигляді тонких волокнистих структур у мезенхімі.

Колаген IV типу експресувався в базальних шарах мембранних структур міосимпласта.

Таким чином, у 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. Відмічено в даній групі піддослідних тварин на 7-му добу після трансплантації наявність вогнищ лімфомакрофагальних 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 і судинних тяжів, при цьому, імуногістохімічно спостерігається виражена експресія фактору Віллебранда в ендотеліальних клітинах, що вказує на активний ангиогенез на 14-ту добу і подальший термін.

На 14-21-шу добу виявлені вогнища ангиогенезу і регенерації з розташованими, у сполучнотканинних і фіброзних вогнищах, множинними дрібними судинами, які трапляються постійно у всіх спостереженнях.

При проведенні імуногістохімічної реакції слабкопозитивна експресія віментину визначалась в мезенхімальних структурах.

Виражена імуногістохімічна реакція на колаген IV типу з 14-ї, особливо з 21-ї доби, спостерігалась у потовщеній базальній мембрані судин, що розташовані в перимізії, особливо артеріального типу. У вогнищах перимізії – ніжно-волокнисті структури базальних мембран.

Новоутворені капілярні структури виявлені зрідка на 7-му добу, систематично – на 14-ту добу в ендоперимізіальних структурах, судини повнокровні або з одиничними еритроцитами, тобто, у них здійснюється кровотік.

Отже, уведення васкулярно-стромальної фракції ліпідної тканини, що містить мультипотентні клітини, на тлі ішемії виявила постійну стру-

ктурну стимуляцію регенераторних процесів і ангиогенезу. 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 і відсутність фіброзування, які характерні для розвитку ішемії, що підтверджується дослідженнями колагену IV типу і мезенхімального фактору віментину.

Висновки

1. Трансплантація стромальної фракції жирової тканини, що містить велику кількість мультипотентних клітин, на тлі ішемії кінцівки призводить до того, що на 3-тю добу після трансплантації починаються активні процеси компенсування ішемічного ураження. На 7-14-ту добу з'являються молоді ендотеліоцити. Також у цей термін мають місце характерні ознаки макроструктурних змін, зокрема збільшення експресії віментину та фактору Віллебранда. У цей же термін утворюються трубочки ендотеліоцитів, які в подальшому вже на 22-гу добу після трансплантації утворюють розгалужену, активно функціонуючу мережу новоутворених капілярів.

2. Уведення стромально-васкулярної фракції жирової тканини в інтактні м'язи кінцівки тварин не призводило до жодних змін у структурі м'яза та зміни імуногістохімічних реакцій по відношенню до контрольної групи, за винятком наявності на початкових етапах дослідження лімфомакрофагальних інфільтратів, що є наслідком, скоріше всього, самого уведення стромальної фракції в м'язову тканину.

3. Ключовим моментом, що направляє процес диференціації стовбурових клітин, є характер середовища, куди відбувається трансплантація клітин і зумовлює зміни клітин у необхідному напрямку в межах їх потенціалу диференціації.

Література

1. Pena Duque M.A. Angiogenesis / M.A. Pena Duque // Arch. Cardiol. Mex. – 2003. – Vol. 73. – P. 109-111.
2. Baumgartner I. Lessons learned from human gene therapy in patients with chronic critical limb ischemia / I. Baumgartner // J. Invasive Cardiol. – 2001. – Vol. 13, № 4. – P. 330-332.
3. Current perspectives in therapeutic myocardial angiogenesis / T. Kinnaird, E. Stabile, S.E. Epstein [et al.] // J. Interv. Cardiol. – 2003. – Vol. 16, № 4. – P. 289-297.
4. Rosell-Navel A. Angiogenesis in human cerebral ischemia / A. Rosell-Navel, J. Montaner, J. Alvarez-Sabin // Rev. Neurol. – 2004. – Vol. 38, № 11. – P. 1076-1082.
5. Rajnoch J. Angiogenesis and organ transplantation / J. Rajnoch, O. Viklicky // Folia Microbiol. – 2004. – Vol. 49, № 5. – P. 499-505.
6. Uzan G. Therapeutic use of stem cells. II. Adult stem cells / G. Uzan // Rev. Prat. – 2004. – Vol. 54, № 14. – P. 1515-1527.
7. Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin / M. Stashower, K. Smith, J. Williams [et al.] // Dermatol. Surg. – 1999. – № 25. – P. 945-952.
8. Стромальные клетки предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании / А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко, Н.Г. Скоробогатова

- [и др.] // Ж. Акад. мед. наук України. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 354-365.
9. Katz A.J. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal cells / A.J. Katz, A. Tholpady, S.S. Tholpady // *Stem cells*. – 2005. – Vol. 23. – P. 412-423.
 10. Andrews R.G. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors / R.G. Andrews, J.W. Singer, I.D. Bernstein // *Blood*. – 1986. – Vol. 67. – P. 842-849.
 11. Hirose M. Treatment of osteo-articular diseases using cultured autologous mesenchymal cells / M. Hirose, H. Ogushi // *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. – 2003. – Vol. 92, № 9. – P. 1781-1786.
 12. Mizuno H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells / H. Mizuno, H. Hyakusoku // *J. Nippon Med. Sen*. – 2003. – Vol. 70, № 4. – P. 300-306.
 13. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т.А. Князева // *Вестн. Акад. мед. наук СССР*. – 1974. – № 12. – С. 3-8.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Д.Б. Домбровский

Резюме. Жировая ткань в последнее время рассматривается исследователями, как доступный источник аутологических стволовых клеток. Важным остается вопрос факторов, влияющих на направленное дифференцирование стволовых клеток. Проведенные экспериментальные исследования на крысах с моделированием ишемии конечности. Подопытным животным в ишемизированные конечности вводилась стромально- васкулярная фракция жировой ткани. Также стромально- васкулярная фракция вводилась животным в интактные конечности. Проведенные иммуногистохимические исследования (определение экспрессии антител к фактору Виллебранда, коллагена IV типа и виментина) процессов, происходящих с введенными мультипотентными стромальными клетками, которых много в стромально-васкулярной фракции жировой ткани на фоне ишемии и без нее. Данные результаты позволяют определить перспективность дальнейшей разработки данного направления исследований.

Ключевые слова: ишемия, стромальные стволовые клетки.

DIFFERENTIATION OF FATTY TISSUE STROMAL CELLS UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF EXPERIMENTAL CELL TRANSPLANTATION

D.B. Dombrovskiy

Abstract. Fatty tissue has been lately considered by researchers as an accessible source of autologous stem cells. The problem of factors which influence the directed differentiation of stem cells is still important. Experimental researches have been conducted on rats with simulated limb ischemia. Stromal-vascular fraction of fatty tissue was injected to the experimental animals both with limb ischemia and to those with intact extremities. Immunohistochemical researches (determination of antibodies expression to von Willebrand factor, of collagen IV type and vimentin) of processes, which take place with introduced multipotential stromal cells, the number of which is great in stromal-vascular fraction of fatty tissue against the background of ischemia and without it, have been conducted. These results allow defining the future subsequent development of this direction of researches.

Key words: ischemia, stromal stem cells.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Ю.С. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 2 (70). – P. 29-31

Надійшла до редакції 09.04.2014 року