

© Дрюк М.Ф., Домбровський Д.Б., Задорожня Т.Д., 2010

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

## **ПОТЕНЦІАЛ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЗА ДАНИМИ ІМУНОГІСТОХІМІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

*М.Ф.Дрюк, Д.Б.Домбровський, Т.Д.Задорожня*

*Національний інститут хірургії та трансплантології імені О.О.Шалімова АМН України, м. Київ*

---

**Резюме.** Дослідження проведені на щурах, в ішемізовану та інтактну кінцівку яких вводили стромально-васкулярну фракцію жирової тканини. Імуногістохімічними дослідженнями (визначення експресії антитіл до фактора Віллебранда, колагену IV типу та віментину) вивчені процеси, які відбуваються з мультипотентними стромальними клітинами на фоні ішемії та без неї. Одержані результати підтверджують перспективність подальшої розробки даного напрямку.

**Ключові слова:** ішемія, стромальні стовбурові клітини, експеримент.

---

Клітинна і генно-клітинна терапія є одним з пріоритетних напрямів в сучасній медицині. Вона проводиться з використанням як аутологічних, так і гетерологічних клітин [1-3]. Трансплантація аутологічних клітин дедалі ширше застосовується для відновлення тканин після видалення ракових утворень, заміщення кісткових і хрящових дефектів, відновлення шкірного покриву після опіків, функціонального відновлення пошкоджених тканин серця і мозку, викликаних інфарктами, інсультами і дегенеративними захворюваннями, а також для лікування критичної ішемії нижніх кінцівок, відновлення функцій печінки та стимуляції кровотворення [4-6]. Складність забору в достатній кількості, неможливість рутинного використання ембріональних стовбурових клітин з етичних причин, наявність побічних ефектів (порушення серцевого ритму) при використанні скелетних міобластів, а також болючість процедури під час забору скелетних міобластів і мезенхімальних клі-

тин кісткового мозку спонукають до пошуку інших джерел мультипотентних/стовбурових клітин.

У жировій тканині людини сконцентрована популяція клітин, які несуть антиген CD34-115 – мембранний глікофосфопротеїн, який вперше ідентифікований на гематопоетичних клітинах і мультипотентних клітинах, що відносяться до них [7-9]. Перевагами стромальних клітин жирової тканини для використання з терапевтичною метою є технічна простота їх виділення з тканини і можливість отримання в достатній кількості [10, 11].

**Мета дослідження.** На експериментальній моделі ішемії кінцівки вивчити процеси, які відбуваються після трансплантації стромальних клітин жирової тканини.

**Матеріал і методи.** Оперативні втручання на 60 щурах проводили під кетаміновим наркозом. Тварини перебували на звичайному лабораторному раціоні при кімнатній температурі. Середня маса щурів –

374,23±7,56 г, вік – 6±1,2 міс. Тварини поділені на три групи: I група – тварини, яким моделювали ішемію кінцівки; II – тварини, яким в інтактні м'язи кінцівки вводили стромально-васкулярну фракцію жирової тканини; III – тварини, яким на фоні ішемії кінцівки вводили стромально-васкулярну фракцію жирової тканини. Умови асептики та антисептики під час досліджень забезпечені повністю. Моделювання ішемії тканин кінцівки у щура проводили за методом Т.А.Князевої (1974), при якому ішемічні прояви виражені вже на 2-3 добу після моделювання.

Для отримання стромально-васкулярної фракції, збагаченої мультипотентними стромальними клітинами, жирову тканину щура з передньої черевної стінки (передочеревинний жир) після значного подрібнення обробляли колагеназою (фрагменти жирової тканини інкубували у 0,075 % розчині колагенази, тип I, упродовж 30 хв). Отриману суміш розводили у співвідношенні 1:3 фосфатним буфером Дульбеко та інтенсивно струшували 2-3 хв. Після центрифугування (10 хв при 2500 об/хв) жирове кіль-

це і супернатант видаляли, а осад, який містив мультипотентні клітини строми судин, лейкоцити, еритроцити, ресуспендували в фізіологічний розчин. Дану суміш (стромально-васкулярну фракцію жирової тканини) вводили в ішемізовані кінцівки на 3-тю добу після моделювання ішемії підфасціально тонкою смужкою на медіальній поверхні стегна. У всіх дослідних та контрольних групах тварин після закінчення терміну дослідження проведено забір м'язової тканини з медіальної та латеральної поверхонь стегна на 3-тю, 5-ту, 7-му, 14-ту, 21-шу і 25-ту доби після моделювання ішемії. Використані імуногістохімічні (визначення експресії віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда) методи дослідження м'язової тканини.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Імуногістохімічні параметри віментину, колагену IV типу і фактора Віллебранда у I групи тварин були виражені нерівномірно і змінювалися в динаміці ішемії. Експресія віментину була найбільшою на 7-14 доби від моменту моделювання ішемії в міжм'язових волокнах, що оточують судин-

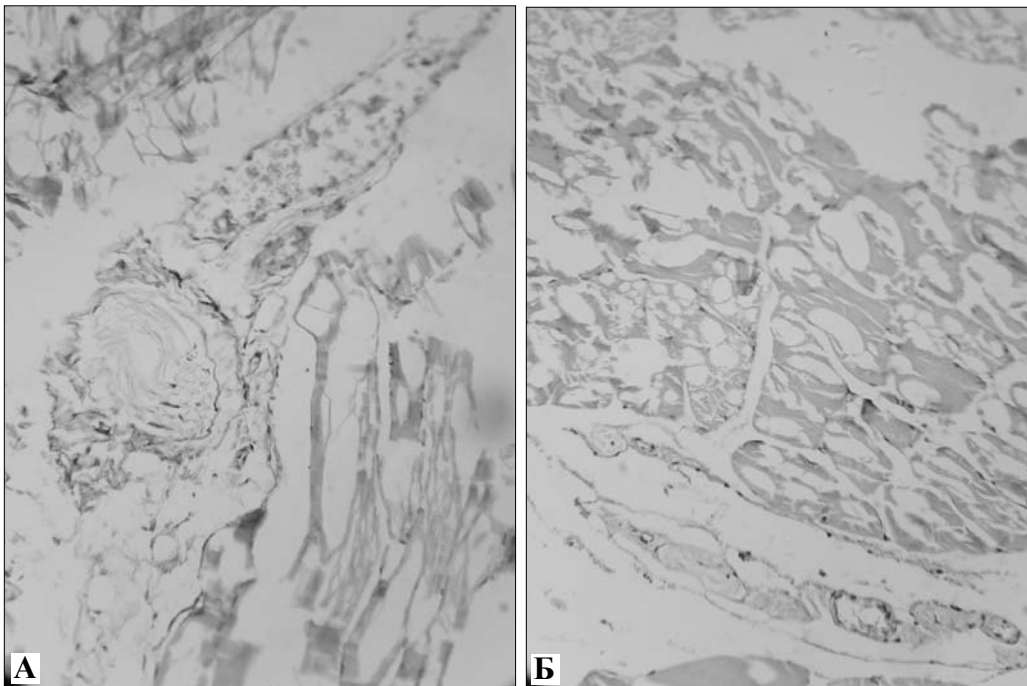


Рис. 1. Сьома (А) і двадцять п'ята (Б) доби ішемії (група I). Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептовідін-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікропрепарати. Об. 20, ок. 10.

ні пучки, а також в мембранах стінок венозних та артеріальних судин. Виявлені вогнища фрагментації мезенхімальних структур на тлі дистрофії і деструкції міосимпласту, які зменшувалися і зникали до 20-25 діб після моделювання ішемії (рис. 1). На 7-14 доби ішемії експресія колагену IV типу найбільше виражена в стінці артеріальних судин, вогнища експресії колагену IV типу – в розволоненій стінці венул при їх пов-

нокров'ї (рис. 2). Фактор Віллебранда експресувався в ендотеліальних структурах судин (рис. 3). Особливо виражена реакція в повнокровних судинах, в ендомізії, перимізії – на 2-гу і 7-му доби ішемії. Отже, внаслідок моделювання ішемії на 2-10 доби спостерігали виражені зміни, які характеризували розлад кровообігу в судинах, особливо венозного типу; деструкція і дистрофія м'язових волокон зменшувалися на 20-25 доби

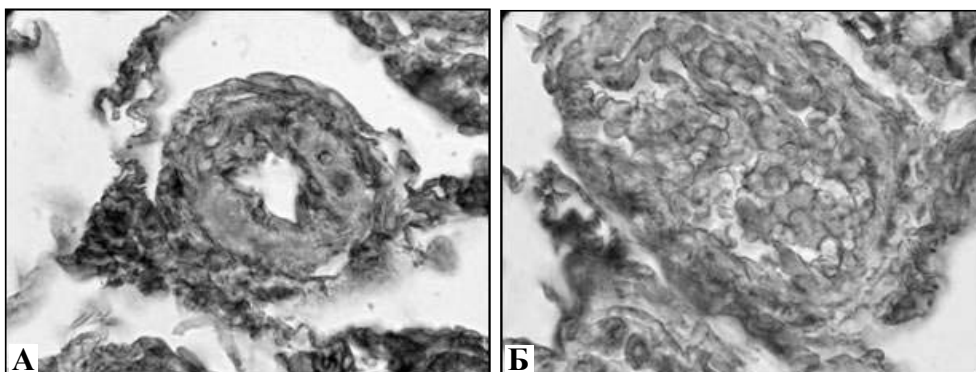


Рис. 2. Десята доба ішемії (група I). Експресія колагену IV типу в стінці артеріальної (А) та венозної (Б) судин. У венозній судині повнокров'я і стаз еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікропрепарати. Об. 40, ок. 10.

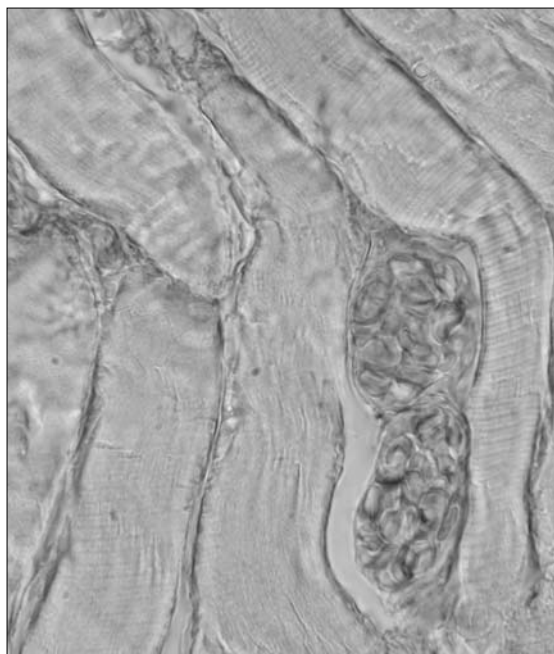


Рис. 3. Друга доба ішемії (група I). Експресія фактора Віллебранда на тлі повнокров'я капілярів і венозних судин, стаз еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікропрепарат. Об. 40, ок. 10.

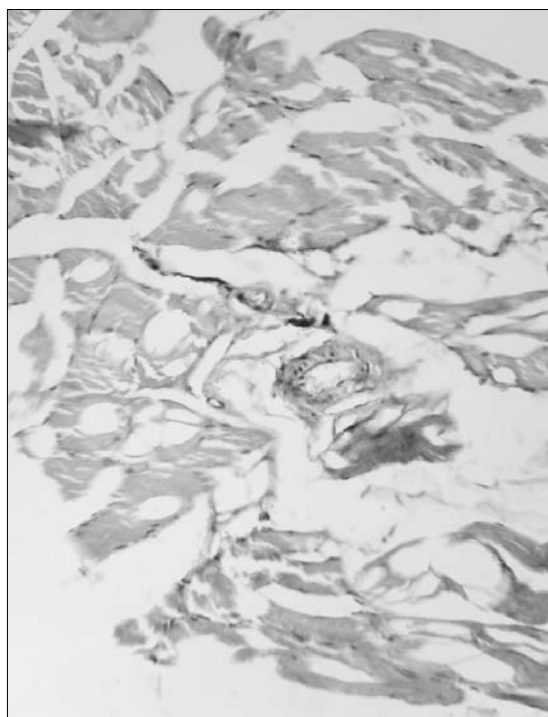


Рис. 4. Вогнищева експресія віментину в проміжній речовині перимізії (група II). Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікропрепарат. Об. 20, ок. 10.

з появою фіброзування та склерозу судинної стінки в перимізії як показника регенерації.

У II групі тварин після введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини в інтактні м'язи кінцівки на 14-ту і 21-шу доби структурні зміни в міосимпласті були аналогічні контрольним (група I). На 7-й день у частині спостережень виявили невеликі вогнища набряку навколишньої проміжної тканини міосимпласту, а також ділянки втрати поперечної посмугованості м'язовими волокнами. Водночас у більшості спостережень виявлено нерівномірне накопичення глікогену в центральних ділянках міосимпласту. У близько 20 % спостережень на 7-й день після введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини мали місце вогнища лімфомакрофагальних інфільтратів. Імуногістохімічна реакція на віментин у цей термін була аналогічна з I групою – у вигляді тонких волокнистих

структур у мезенхімі (рис. 4). Колаген IV типу експресувався в базальних шарах мембранних структур міосимпласту (рис. 5). Отже, в II групі патологічних змін не виявлено, структура м'язових волокон і судин без особливостей. В експресії моноклональних антитіл до віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда патологічних змін не спостерігається. На 7-му добу після трансплантації відмічено наявність вогнищ лімфомакрофагальних інфільтратів.

При дослідженні м'язів ішемізованої кінцівки тварин III групи після введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини вже на 14-ту добу у ділянках перимізію в мезенхімальних структурах спостерігається наявність новоутворених капілярів і судинних тяжів. Імуногістохімічно спостерігається виражена експресія фактора Віллебранда в ендотеліальних клітинах (рис. 6). На 14-21 доби виявлено вогнища ангиогенезу і регенерації з розташованими у

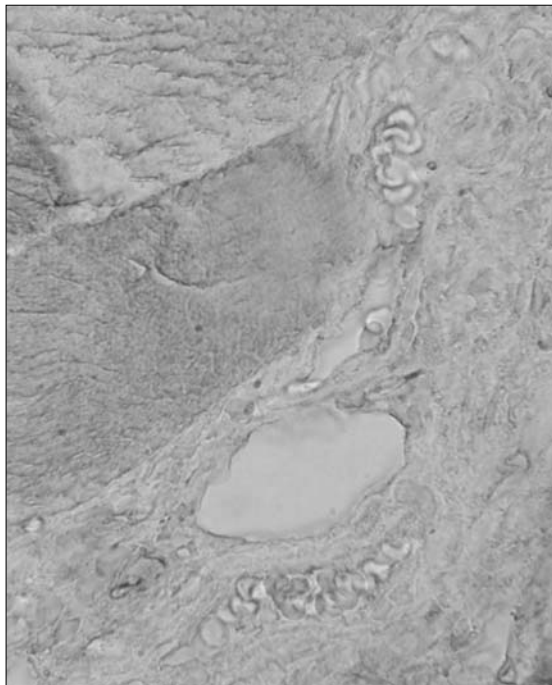


Рис. 5. Експресія колагену IV типу в базальних мембранах довкола міосимпластів (група II). Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікропрепарат. Об. 20, ок. 10.

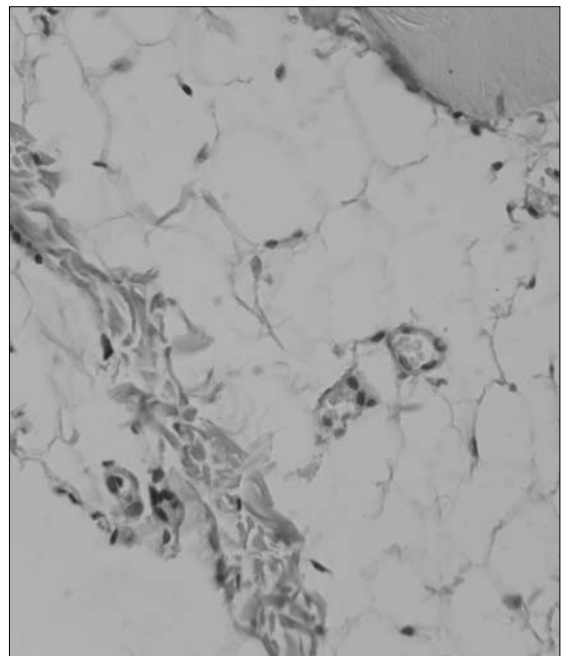


Рис. 6. Чотирнадцята доба ішемії (група III). Експресія фактора Віллебранда в ендотелії новоутворених капілярів і судинних тяжів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікропрепарат. Об. 40, ок. 10.

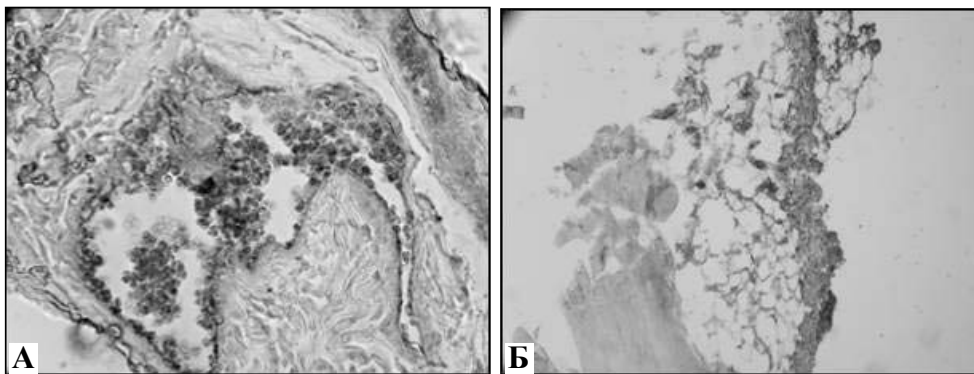


Рис. 7. Чотирнадцята доба ішемії (група III). Слабко виражена експресія віментину в мезенхімальних структурах (А), довкола судин (Б) у перимізії. Непрямий стрепто-відин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікропрепарати. А: об. 40, ок. 10; Б: об. 10, ок. 10.

сполучнотканинних та фіброзних вогнищах множинними дрібними судинами, які спостерігали у всіх випадках. Слабко позитивна експресія віментину (рис. 7) визначалася в мезенхімальних структурах. Виражену імуногістохімічну реакцію на колаген IV типу спостерігали з 14-ї доби (особливо – з 21-ї доби) в потовщеній базальній мембрані судин, розташованих у перимізії. Дані зміни більше виражені в перимізії судин артеріального типу. Новоутворені капілярні структури в ендOPEREMIZIALNYKH структурах зрідка виявлені на 7-му добу, систематично – на 14-ту; судини повнокровні або з одиничними еритроцитами, тобто в них відбувається кровотік.

Отже, введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини, що містить мультипотентні клітини, на тлі ішемії виявило постійну структурну стимуляцію регенераторних процесів та ангиогенезу на 7-14 доби експерименту з наявністю кровотоку в "молодих" судинах, що підтверджено дослідженням експресії фактора Віллебранда. Разом з цим відмічені ознаки зменшення і

відсутності фіброзування, які характерні для розвитку ішемії, що підтверджено дослідженням експресії антитіл до колагену IV типу та мезенхімального фактора – віментину.

**Висновки.** 1. Трансплантація стромально-васкулярної фракції жирової тканини на фоні ішемії кінцівки на 3-тю добу викликає активні процеси компенсування ішемічного ураження, на 7-14 доби з'являються молоді ендотеліоцити та ознаки макроструктурних змін, зокрема збільшення експресії віментину та фактора Віллебранда. В цей же термін утворюються трубочки ендотеліоцитів, які на 22-гу добу формують розгалужену, активно функціонуючу сітку новоутворених капілярів. 2. Введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини в інтактні м'язи не викликає жодних змін у структурі м'яза, за винятком наявності на початкових етапах лімфомакрофагальних інфільтратів, що є наслідком, скоріш за все, власне введення стромальної фракції. 3. Ключовим моментом диференціювання стовбурових клітин є характер середовища, куди їх трансплантують.

### Література

1. 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.
2. Current perspectives in therapeutic myocardial angiogenesis / T. Kinnaird, E. Stabile, S. E. Epstein, S. Fuchs // *J. Interv. Cardiol.* – 2003. – Vol. 16, № 4. – P. 289-297.
3. Pena Duque M. A. Angiogenesis / M. A. Pena Duque // *Arch. Cardiol. Mex.* – 2003. – Vol. 73. – P. 109-111.
4. Rajnoch J. Angiogenesis and organ transplantation / J. Rajnoch, O. Viklicky // *Folia. Microbiol.* – 2004. – Vol. 49, № 5. – P. 499-505.
5. Rosell-Novel A. Angiogenesis in human cerebral ischemia / A. Rosell-Novel,

*J.Montaner, J.Alvarez-Sabin // Rev. Neurol. – 2004. – Vol. 38, № 11. – P. 1076-1082. 6. Uzan G. Therapeutic use of stem cells. II. Adult stem cells / G.Uzan // Rev. Prat. – 2004. – Vol. 54. – P. 1515-1527. 7. Стромальні клітки предшественники жирової ткани: виділення, фенотипічні та диференцировочні властивості при монослоїнному культивуванні / А.Ю.Петренко, Ю.А.Петренко, Н.Г.Скоробогатова [и др.] // Ж. АМН України. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 354-365. 8. 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. 9. Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin / M.Stashower, K.Smith, J.Williams, H.Skelton // Dermatol. Surg. – 1999. – Vol. 25. – P. 945-952. 10. 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. 11. 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.*

## ПОТЕНЦІАЛ ДИФФЕРЕНЦІАЦІИ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТОК ЖИРОВОЇ ТКАНИ ПО ДАНИМ ІММУНОГІСТОХІМІИ В ЕКСПЕРИМЕНТЕ

**Резюме.** Исследования проведены на крысах, в ишемизированную и интактную конечности которых вводили стромально-васкулярную фракцию жировой ткани. Иммуногистохимическими исследованиями (определение экспрессии антител к фактору Виллебранда, коллагену IV типа и виментину) изучены процессы, которые происходят с мультипотентными стромальными клетками на фоне ишемии и без нее. Полученные результаты подтверждают перспективность последующей разработки данного направления.

**Ключевые слова:** ишемия, стромальные стволовые клетки, эксперимент.

## POTENTIAL OF THE DIFFERENTIATING THE STROMAL CELLS OF THE FATTY TISSUE BASED ON THE FINDINGS OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN AN EXPERIMENT

**Abstract.** The studies have been carried out on rats whose ischemized and intact extremities were introduced with the stromal-vascular fraction of the adipose tissue. By means of immunohistochemical studies (an evaluation of the expression of antibodies to the von willebrand factor, collagen of type IV and vimentin) the authors have studied the processes, taking place with multipotent stromal cells with underlying ischemia and without it. The findings obtained confirm the prospects of further development of this particular trend.

**Key words:** ischemia, stromal stem cells, experiment.

O.O.Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology of Ukraine's AMS (Kyiv)

Надійшла 21.12.2009 р.

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