

**АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ  
ЛЕЧЕНИЯ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)  
РОГОВОЙ Н.А.<sup>1,2</sup>, АЛЕКСЕЕВ С.А.<sup>1</sup>, ХРЫЩАНОВИЧ В.Я.<sup>1,2</sup>, КЛИМЧУК И.П.<sup>2</sup>,  
НЕЛИПОВИЧ Е.В.<sup>2</sup>**

*1 - Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск Республика Беларусь*

*2 - УЗ «4-я ГКБ им. Н.Е.Савченко» г. Минск Республика Беларусь*

*Актуальность.* Во всем мире ХОЗАНК поражены 12-14% популяции, причем заболеваемость возрастает до 20% после 75 лет, которая в 22% случаев приводит к ампутации. Около 30% пациентов имеют ограничения для выполнения прямой реваскуляризации конечности, прежде всего по причине поражения дистального русла. У 53,2% пациентов с атеросклерозом наблюдается поражение 2-х и более артерий голени.

Перспективы лечения ХОЗНК в последнее десятилетие ассоциируются с ростом и активацией микрососудистого русла нижних конечностей посредством молекулярно-клеточных механизмов тканевой и клеточной репарации. К ним относят имплантацию стволовых клеток (СК), применяемую на протяжении последних 15 лет и позволяющую улучшить перфузию в тех случаях, когда исчерпаны все другие возможные методы лечения.

*Цель.* Целью исследования является изучить процессы восстановления ишемизированных тканей мышц нижних конечностей в экспериментах с использованием лабораторных животных.

*Материалы и методы.* Экспериментальные исследования выполнены на 60 крысах-самках Wistar массой 250-280 г, содержащихся в условиях конвенционального вивария Института физиологии НАН Беларуси.

Моделирование КИНК осуществляли следующим способом: по внутренней поверхности правого бедра выделяли бедренную артерию и изолировали при помощи тонких щипцов от огибающей подвздошной артерии до подкожной и подколенной бифуркаций. Оба конца артерии были перевязаны шовным материалом 5/0, участок между лигатурами иссекали (~2-2,3 см), разрез ушивали шовным материалом.

- Все животные были разделены на следующие группы:
- Группа 1. Интактные (n=6);
- Группа 2. Модель КИНК (n=13);
- Группа 3. Модель КИНК с введением мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в дозе 1 млн/кг периартериально на 14-е сутки (КИНК+МСК периартериально) (n=6);
- Группа 4. Модель КИНК с введением МСК ЖТ в дозе 1 млн/кг внутримышечно на 14-е сутки (КИНК+МСК в/м) (n=6);
- Группа 5. Модель КИНК с введением МСК ЖТ в дозе 1 млн/кг с комбинированным введением (периартериально и внутримышечно) на 14-е сутки (КИНК+МСК комбинированно) (n=6);
- Группа 6. Модель КИНК с введением пентоксифиллина (ПТФ) в/в в дозе 24 мг/кг на 14-е сутки (КИНК+ПТФ) (n=12);
- Группа 7. Модель КИНК с введением Алпростадил в/в в дозе 2,4 мкг/кг на 14-е сутки (КИНК+алпростадил) (n=12).

Порог ноцицептивной реакции на механический стимул (ПНР) определяли до операции по моделированию КИНК, а также на 14, 28 и 60-е сутки после нее с помощью альгезиметра в тесте «Рэндалла-Селитто» (Panlab, Испания). Для изучения морфологической картины мышц бедра и голени проводили стандартное гистологическое исследование.

Проводили иммуногистохимическое исследование. Количественную оценку плотности кровеносных сосудов (количество сосудов в 1 мм<sup>2</sup>) проводили путем подсчета  $\alpha$ -SMA-положительных артериол и CD31-положительных капилляров в 30-и полях зрения при увеличении  $\times 200$ . Для рецепторов к сосудистому эндотелиальному фактору роста VEGFR-1 и VEGFR-2 определялись наличие экспрессии, локализация (цитоплазма, мембрана) и выраженность (выраженная, умеренная, слабая). Уровень экспрессии оценивали на основании определения оптической плотности окрашивания маркеров VEGFR-1 и VEGFR-2 в цитоплазме клеток с помощью компьютерной программы обработки данных Image J (1.49k, США), выражая результаты в условных единицах (у.е.) оптической плотности.

*Результат и их обсуждение.* Экспериментальная КИНК сопровождалась развитием механической гипералгезии на 14-е и усугубилась на 28-е сутки исследования, что выражалось в снижении порога ноцицептивной реакции (ПНР) ипсилатеральной конечности на 18,9% (с  $139,8 \pm 1,4$  г до  $113,3 \pm 1,0$  г,  $p < 0,005$ ) и на 36,9% (с  $139,8 \pm 1,4$  г до  $88,2 \pm 1,7$  г,  $p < 0,005$ ) соответственно относительно исходных значений, а также ниже на 13,9% на 14-е сутки и на 32,4% на 28-е сутки относительно интактных животных. После измерений на 14-е сутки осуществляли аллогенную трансплантацию МСК ЖТ разными способами. Антиноцицептивное действие МСК ЖТ, вне зависимости от способа их введения, регистрировали не сразу, а через 2 недели после трансплантации (на 28-е сутки после операции по моделированию КИНК). К окончанию мониторинга на 60-е сутки зарегистрированы следующие значения ПНР: увеличение значений исследуемого показателя на 14,9% при периартериальном введении, на 15,1% при внутримышечном введении и до на 25,8% при комбинированном введении по отношению к таковым значениям на 14-е сутки до введения МСК ЖТ. Статистически значимых различий между значениями ПНР в группах крыс, получивших МСК ЖТ периартериально, внутримышечно и комбинированно установлено не было.

По данным морфометрического исследования на 28 сутки эксперимента во всех группах исследования с разными способами инъекции МСК по отношению к контрольной группе без лечения установлено статистически значимое увеличение количества сосудов в бедре и голени крыс.

По результатам исследования выявлено, что все тестируемые способы коррекции критической ишемии нижних конечностей к 28-м суткам наблюдения вызывают значимое увеличение плотности артериол и мелких артерий в ишемизированных скелетных мышцах лабораторных животных. К 60-м суткам эксперимента усиленный ангиогенез сохраняется в ишемизированных мышцах после трансплантации МСК внутримышечным и комбинированным способами доставки клеток, а также после терапии аллпростацилом. Максимальная плотность  $\alpha$ -SMA-позитивных сосудов зафиксирована после внутримышечного введения МСК на всех наблюдаемых сроках, что указывает на более эффективную стимуляцию ангиогенеза в ишемизированных мышцах. Коррекция ишемии мышц голени крыс тестируемыми препаратами и клеточной терапией МСК при введении их разными способами приводит к статистически значимому увеличению плотности CD31-позитивных капилляров на 28-е и 60-е сутки наблюдений. Среди исследуемых методов лечения ишемии по результатам морфометрического анализа установлено, что внутримышечная инъекция МСК сопровождается активацией процессов формирования новых CD31-позитивных капилляров в большей степени, чем при применении иных способов коррекции ишемии тканей.

ИГХ-анализ показал, что во всех группах исследования выявлена положительная экспрессия к маркеру VEGFR-1, VEGFR-2 различной степени выраженности. Во всех анализируемых группах в мышечных клетках и сосудах крыс на 28-е сутки исследования экспрессия VEGFR-1, VEGFR-2 была более выражена, а к 60-м суткам снижалась. На 28-е сутки наблюдения внутримышечная и комбинированная трансплантации МСК крысам с моделью ишемии сопровождались наиболее выраженной оптической плотностью окрашивания маркера VEGFR-1, VEGFR-2 в эндотелиоцитах сосудов, а на 60-е сутки эксперимента сверхэкспрессия VEGFR-1, VEGFR-2 регистрировалась у грызунов с ишемией после введения аллпростацила.

*Выводы.* Согласно полученным лабораторным и гистологическим данным, внутримышечная трансплантация МСК является оптимальной для коррекции ангиопатии, поскольку сопровождается антиноцицептивным, нормализующим походку и репаративным эффектами.