

**ЛЕПТИНЕМИЯ И ПОКАЗАТЕЛИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ РИТМА СЕРДЦА, ПРОГНОЗ  
У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ С ОЖИРЕНИЕМ***Е.М. Радченко<sup>1</sup>, Н.С. Бек<sup>1</sup>, В.И. Потапов<sup>2</sup>*

**Резюме.** Обследование 103 больных гипертонической болезнью с ожирением выявило зависимость от содержания лептина (гипер-, нормо- или гиполептинемия) особенностей автономной кардиорегуляции, электрической систолы желудочков и прогноза неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

**Ключевые слова:** лептин, гипертоническая болезнь, вариабельность ритма сердца.

**LEPTINEMIA, PARAMETERS OF HEART RATE VARIABILITY, AND PROGNOSIS  
IN PATIENTS WITH ESSENTIAL ARTERIAL HYPERTENSION WITH OBESITY***O. Radchenko<sup>1</sup>, N. Bek<sup>1</sup>, V. Potapov<sup>2</sup>*

**Abstract.** An examination of 103 patients with essential hypertension and obesity showed the dependence of autonomic cardioregulation, electrical ventricular systole, and prediction of adverse cardiovascular events on the serum leptin concentration (hyper-, normo- or hypoleptinemia).

**Key words:** leptin, essential hypertension, heart rate variability.

<sup>1</sup>Danylo Halytsky National Medical University (Lviv)<sup>2</sup>The 8<sup>th</sup> Municipal Clinical Hospital (Lviv)

Рецензент – проф. Т.О. Ілашук

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 4 (72). – P. 119-122

Надійшла до редакції 27.10.2014 року

© О.М. Радченко, Н.С. Бек, В.І. Потапов, 2014

УДК 611.013.395:616.13-002-005.4-092.4

*Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, О.В. Буслович, В.М. Боголепов***УЛЬТРАСТРУКТУРА ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ КАПІЛЯРІВ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ  
У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ІШЕМІЮ КІНЦІВОК ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ  
ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ**

Координаційний центр трансплантації органів, тканин та клітин, м. Київ

**Резюме.** Неможливість виконання реконструктивно-відновних оперативних втручань, при ураженні дистального артеріального русла зумовлює пошук та розробку методів непрямой ревазуляризації. Перспективним вбачається використання клітинної трансплантації з метою активації процесів репарації та ангиогенезу в ураженій кінцівці. Проведені доклінічні дослідження, із моделюванням ішемії кінцівки на лабораторних тваринах, показали суттєву стимуляцію процесів ангиогенезу після трансплантації прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки.

У подальшому клітинна трансплантація виконана хворим на хронічну ішемію кінцівок. Застосовуючи методи електронної мікроскопії на ультраструктурному рівні ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини доведено, що клітинна трансплантація призводить до суттєвої активації процесів ангиогенезу у хворих на хронічну ішемію кінцівок, та є перспективним методом непрямой ревазуляризації.

**Ключові слова:** хронічна ішемія, непрямая ревазуляризація, електронна мікроскопія.

**Вступ.** В останні два роки успішно реалізується ідея застосування методу клітинної трансплантації в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок [4, 9]. Використовуючи стовбурові клітини кісткового мозку, вдалося зменшити на 80 % больову реакцію спокою, а за даними ангиографічного дослідження у пацієнтів через півроку після клітинної трансплантації визначали значний розвиток колатеральної артеріальної мережі [6, 8].

Патогенетичні механізми дії клітинної трансплантації полягають у наявності в клітинному субстраті значної кількості біологічно активних

речовин, ростових факторів та цитокінів, які активно впливають на процеси репарації ушкоджених клітин та ангиогенезу [3, 7].

Проте застосування клітин кісткового мозку має суттєві недоліки, а саме: процедура забору кісткового мозку не завжди досить проста, кількість активних стовбурових клітин, що вдається отримати після культивування, варіює у великих межах, враховуючи те, що їх кількість та життєздатність зменшується з віком.

Експресуючи маркери CD 34<sup>+</sup>, CD 38<sup>-</sup>, CD 45Ra<sup>low</sup>, CD 71<sup>low</sup>, прогеніторні клітини фетальної печінки зумовлюють більш високі потенції до

© Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, О.В. Буслович, В.М. Боголепов, 2014

стимуляції процесів репарації та ангиогенезу, ніж аутологічні клітини кісткового мозку [2].

Незважаючи на те, що стовбурові клітини фетальної печінки застосовуються в комплексному лікуванні різних захворювань - хвороби Паркінсона, цукрового діабету, ішемічної хвороби серця тощо [1, 5], повідомлення про наукові дослідження, присвячені застосуванню стовбурових клітин у комплексному лікуванні хворих на хронічну критичну ішемію кінцівок, фактично відсутні.

**Мета дослідження.** Дослідити на ультраструктурному рівні процеси, що відбуваються в ендотеліоцитах капілярів м'язової тканини ішемізованої кінцівки хворих на хронічну ішемію кінцівок після трансплантації прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки.

**Матеріал і методи.** Прогеніторні клітини фетальної печінки людини 6-8 тижнів гестації з фенотипом CD 34<sup>+</sup>, CD 38<sup>-</sup>, CD 45Ra<sup>low</sup>, CD 71<sup>low</sup> (кількість КУО-ГМ 140.0x10<sup>3</sup>) отримували згідно з договором з біотехнологічної лабораторії ТОВ «Інститут клітинної терапії». Клітинний трансплантат вводили внутрішньом'язово в кінцівку (сегмент гомілка-стопа), у вигляді доріжки вздовж оклюзійних артерій.

Методика застосована в 10 пацієнтів (всі чоловіки) з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок у хворих на облітеруючий ендартеріїт (4), облітеруючий атеросклероз (6), які перебували на лікуванні у відділі мікросудинної та пластичної хірургії Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова та клініці «Інститут клітинної терапії». Середній вік пацієнтів складав 53,5 року. Обстеження пацієнтів до операції включало доплерографію артерій, рентгенконтрастну ангиографію, лазерну флуометрію мікроциркуляторного русла. У всіх осіб констатовано неможливість виконання реконструктивно-відновних оперативних втручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки.

Перед трансплантацією та через шість місяців після першої трансплантації отримували біопсійний матеріал м'язів ішемізованої кінцівки для наступного проведення ультраструктурних досліджень.

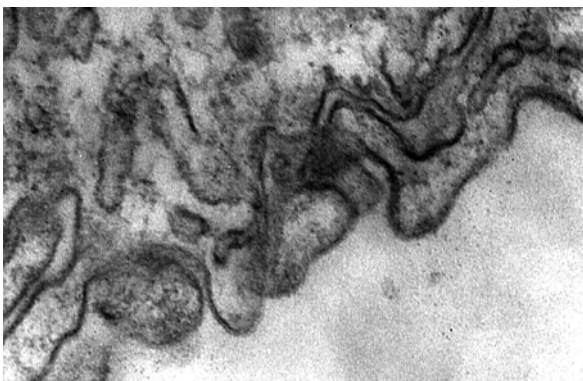


Рис. 1. Мембранні утворення неправильної форми люмінальної поверхні цитоплазми ендотеліальних клітин. x 25000

Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки тканини фіксували в 2,5 % розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері (рН – 7,2-7,4) і дофіксували в 1 % розчині оксиду осмію. Матеріал зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації і укладали в аралдит. Морфологічні структури контрастували в процесі зневоднення матеріалу насиченим розчином ураніацетату, а на зрізах - цитратом свинцю. Зрізи товщиною 40-60 нм, що отримані на ультратомі LKB-III, вивчали в електронному мікроскопі ПМ – 125К.

**Результати дослідження та їх обговорення.** При первинному дослідженні спостерігається помірна гідратація ендотеліоцитів, але частіше такі клітини звичайних розмірів і форми. На люмінальній поверхні плазматичної мембрани визначаються мікрровирости і мембранні структури складної конфігурації (рис. 1).

Перикапілярний простір низької електронної щільності, міжклітинні з'єднання зберігаються. Структура деяких капілярів відрізняється мозаїчністю, що відображає їх поліфункціональні властивості, які характеризуються невираженими ознаками зрілості.

Спостерігається набряк базальної мембрани ендотелію, її потоншення і, в це же час, посилення в деяких клітинах піноцитозної активності. Виявляються деструктивно змінені цитоплазматичні відростки значної довжини, що вдаються до просвіту капіляра. Крім того, трапляється в просвіті капілярів значна кількість структур цитоплазми, які вільно розташовувались у просвіті судини, що свідчить про пошкодження цитоплазматичної мембрани ендотеліальних клітин. Просвіт деяких капілярів цілком заповнений цитоплазматичним детритом десквамованих клітин.

Підвищення проникності базального шару визначається в наявності екстравазатів, що виявляються довкола багатьох капілярів і складаються з білкової частини та еритроцитів. У вогнищах деструкції м'язової тканини ендоплазматичний ретикулум розвинений недостатньо і представлений внутрішньоклітинними заокругленими каналами або цистернами. У клітинах з електронно-щільним матриксом цитоплазми везикули пластинчастого комплексу, мітохондрії і гранулярний

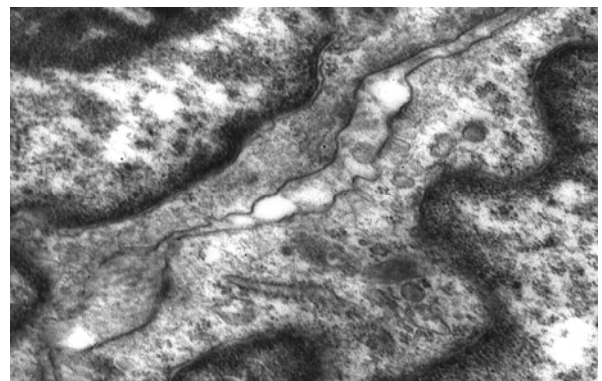


Рис. 2. Дві низькодиференційовані клітини формують первинну міжклітинну щілину (канал). x 23000

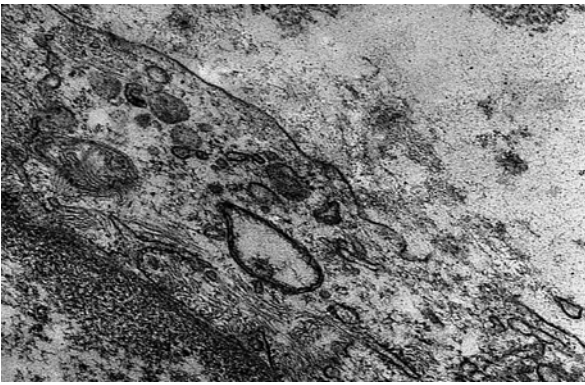


Рис. 3. Цитоплазматичні структури новоутвореної ендотеліальної клітини з наявністю гранул Вейбеля–Палладе, вакуолей, мікрофіламентів, полісом та елементів ендоплазматичної мережі. х 25000

ендоплазматичний ретикулум ледве помітні. Вільна клітинна мембрана слабо інвагує, має гладеньку структуру. У ендотеліальних клітинах переважають зміни, що пов'язані з набряком цитоплазми: набрякання мітохондрій і цистерн гранулярної ендоплазматичної мережі, локальні розширення перинуклеарного простору, зниження піноцитозу, деструкція цитоплазматичних волокон і мікротрубочок.

Набряк ендотеліальних клітин зазвичай супроводжується звуженням просвіту капіляра, зменшенням кількості або навіть зникненням люмінальних цитоплазматичних виростів. Рідко трапляються вакуолі, мієлінові фігури і осміофільні тільця, відсутні ліпідні крапельки і гранули ліпофусцину, зменшена кількість цитоплазматичних волокон, інших клітинних структур. Цистерни ендоплазматичної мережі помірно розширені. У мітохондріях спостерігається деструкція крист, кількість цих структур має тенденцію до зменшення. У деяких ендотеліоцитах має місце зникнення процесів мікропіноцитозу.

Комплекс Гольджі має знижену кількість везикул різного калібру. У значній частині ендотеліальних клітин з ущільненим матриксом спостерігається невелика кількість везикул, тілець мультивезикулярних, вільних рибосом і полісом, потовщених мікрворсинок, мікрофіламентів, мікротрубочок і цистерн. Останні в деяких ділянках цитоплазми перетворюються у вакуолі. Досить часто спостерігаються розриви плазматичної мембрани ендотеліальних клітин. Трапляються пікнотичні ядра з конденсованим хроматином і нечіткими ядерними порами. Зміни в ендотеліоцитах у першу чергу спостерігаються з боку мітохондрій і виявляються в набряканні цих органел і просвітленні їх матриксу, а також виявляються значні варіації форми, розмірів і внутрішнього вмісту. Виявляються мітохондрії з наявністю мієліноподібних структур. Змінюється внутрішня структура мітохондрій, виникає розширення міжкристних проміжків і деструкція крист аж до повного їх зникнення.

Спостерігаються капіляри, що здавлені сполучною тканиною і мають звужений просвіт. У

таких випадках реєструється збільшення кількості колагенових волокон. Трапляються також капіляри, що наповнені еритроцитами з ознаками сладж-феномену.

Таким чином, у хворих на хронічну ішемію кінцівок мають місце значні зміни ендотеліальних клітин капілярів м'язової тканини. Спостерігаються як зменшені, так і набряклі, збільшені в розмірах ендотеліоцити. Зв'язок з базальним шаром порушений, має місце підвищення проникливості капіляра, що призводить до виходу компонентів крові в периваскулярну зону. Про суттєве зниження енергетичних процесів у клітині свідчить порушення структури мітохондрій, які уражуються в ендотеліоцитах найбільше. Поодинокі ендотеліоцитоподібні молоді клітини вказують на процеси ангиогенезу, які мають дуже низьку активність і не забезпечують потреби тканини за умов ішемії.

Через шість місяців після клітинної трансплантації фіксувалося суттєве збільшення просвіту мікросудин, збільшується також кількість оточуючих їх ендотеліоцитів, які мали значну кількість цитоплазматичних виростів та піноцитозних бульбашок. У процесі руху ендотеліальних клітин або їх відособлення формуються міжклітинні просвіти та тяжі.

У подальшому ці клітинні тяжі завдяки процесу каналізації перетворюються у своєрідні клітинні трубочки, з яких формуються зрілі капіляри. У вогнищах активної проліферації мезенхімальних клітин траплялись як темні, так і світлі низькодиференційовані елементи з ознаками стовбурових клітин (рис.2).

Необхідно зауважити, що кількість молодих ендотеліоцитів в електроннограмах до цього терміну (порівняно з минулими) фактично не змінювалась, що свідчило про триваючий процес ангиогенезу.

У кінцевих відділах маргінальні зони сусідніх ендотеліоцитів формують складки, що перекривають одна одну, інвагінації та достатньо великі виступи цитоплазми. Ближче до просвіту мікросудини щільні, сполучнотканинні комплекси були відсутніми, розташовуючись біля базальної частини ендотеліоцитів. Бічні межі клітин звиті, і в розширених ділянках міжклітинного простору спостерігається електроннощільний матеріал. На люмінальній поверхні ендотеліоцитів розташовувалися добре розвинуті відростки.

Початкові сегменти неокapілярів вистелені переважно світлими, а кінцеві відділи – темними та світлими ендотеліальними клітинами, утворюючи різні кількісні комбінації, а зовнішня оболонка представлена адвентиціальними клітинами. Подальша реконструкція судини має як внутрішні, так і позаклітинні механізми. Просвіт капіляра формується з ланцюжків внутрішньоклітинних вакуолей, які мають тенденцію до злиття.

Новоутворені клітини характеризувалися помірною осмофільією, наявністю цитоплазматичних відростків, великих мітохондрій та вакуоляр-

них структур. Клітинна мембрана ендотеліоцитів новоутворених капілярів мала мікрворсинки, інвагінації та збільшені вирости що направлені в просвіт капіляра. Люмінальна поверхня вкрита пластівцевоподібною речовиною та мала нерівний контур.

Молоді ендотеліоцити характеризувалися різним ступенем електроннощільної цитоплазми, в якій містяться полісоми, помірно розвинутий ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії з щільним матриксом (рис. 3).

Збільшені ядра молодих ендотеліоцитів містили пухкий хроматин, який конденсувався по периферії і локалізувалися ближче до люмінальної поверхні, та мали ексцентрично розташоване ядро. Виявлялися чітко виражені пори ядерної оболонки, що поєднували вміст цитоплазми та нуклеоплазми. Ендоплазматичний ретикулум представлений короткими нечисленними трубчастими, пластинчастий комплекс мав як дрібні везикули, так і розширені цистерни, що розташовувалися у різних ділянках цитоплазми. Численні бульбашки були пов'язані з цистернами ендоплазматичної мережі, особливо в ділянці пластинчастого комплексу. При цьому фіксували значну кількість піноцитозних бульбашок. Лізосоми траплялися рідко, мали звичайну форму і щільність, а їх мембрани фактично були незмінними.

У більш диференційованих ендотеліоцитах чітко визначалися місця контакту гранулярної та гладенької ендоплазматичної мережі, що представлена короткими трубчастими і невеликими скупченнями округлих або подовжених бульбашок.

Частина ендотеліальних клітин мала ознаки дегенерації, що проявлялись у вигляді просвітлення цитоплазматичного матриксу, втратою мітохондріями крист, зайвою вакуолізацією. Найбільш активно деструкції були підтверджені мікрорирости та люмінальні ділянки цитоплазми. Зрідка траплялися мітохондрії з ознаками набряку, що супроводжувалося фрагментацією та дезорганізацією крист. Тільки в поодиноких спостереженнях були наявними вакуолізовані мітохондрії з деструкцією крист.

Таким чином, аналіз електроннограм на прикінцевий термін дослідження свідчив про наявність у м'язовій тканині активно функціонуючої капілярної мережі. Окрім того, кількість молодих ендотеліоцитів в електроннограмах до цього терміну (порівняно з минулими) фактично не змінювалась, що свідчило про триваючий процес ангіогенезу. Молоді ендотеліоцити характеризуються ознаками триваючої диференціації та внутрішньоклітинної енергетичної активності - різний ступінь електроннощільної цитоплазми, в якій містяться полісоми, помірно розвинутий енд-

плазматичний ретикулум і мітохондрії з щільним матриксом, та гранули Вейбеля-Палладе.

### Висновки

1. Транспланція прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки людини, хворої на хронічну ішемію кінцівок, призводить до активації процесів ангіогенезу, про що свідчать суттєві зміни ультраструктури ендотеліоцитів капілярів, як основної ланки процесу утворення судин *de novo*.

2. Аналіз біоптатів м'язової тканини через шість місяців після клітинної трансплантації свідчив про триваючий процес утворення молодих ендотеліоцитів, які знаходяться на різних етапах диференціації та формують первинні капіляри.

**Перспективи подальших досліджень.** Транспланція прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки людини може бути застосована як ефективний метод непрямой ревазуляризації у хворих з «нереконструктабельним» ураженням дистального артеріального русла кінцівок.

### Література

1. Treatment with autologous bone marrow mononuclear cells in patients with critical lower limb ischaemia. A pilot study / T. Wester, J.J. Jørgensen, E. Stranden [et al.] // *Scand. J. Surg.* – 2008. – Vol. 97, № 1. – P. 56-62.
2. Lachmann N. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery disease: stem cell therapy / N. Lachmann, S. Nikol // *Vasa.* – 2007. – Vol. 36, № 4. – P. 241-251.
3. Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia using autologous bone marrow cell transplantation / H. Matsubara // *Nippon Naika Gakkai Zasshi.* – 2003. – № 10. – P. 877-883.
4. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial / E. Tuteishi-Yuyama, H. Matsubara, T. Murohara [et al.] // *Lancet.* – 2002. – Vol. 360. – P. 427-435.
5. Prognostic factors for critical limb ischemia after autologous bone marrow implantation / M. Oda, K. Kato, K. Toba [et al.] // *J. Cardiol.* – 2007. – Vol. 50, № 4. – P. 235-242.
6. Kirana S. Wound therapy with autologous bone marrow stem cells in diabetic patients with ischaemia-induced tissue ulcers affecting the lower limbs / S. Kirana, B. Stratmann, D. Lammers // *Int. J. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 61, № 4. – P. 690-692.
7. Кухарчук А.Л. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / А.Л. Кухарчук, В.В. Радченко, В.М. Сирман. – Чернівці: Золоті литаври, 2004. – 505 с.
8. Берсенева А.В. Изучение выживания и дифференцировки аллогенных фетальных клеток, трансплантированных в головной мозг пациентам с болезнью Паркинсона - результаты исследования аутопсийного материала / А.В. Берсенева // *Клет. транспл.* – 2005. – Т. 1, № 2. – С. 34-35.
9. Lee D.D. Cellular therapies for type 1 diabetes / D.D. Lee, E. Grossman, A.S. Chong // *Horm Metab Res.* – 2008. – Vol. 40, № 2. – P. 147-154.

## УЛЬТРАСТРУКТУРА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КАПИЛЛЯРОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ

*Р.В. Салютин, С.С. Паляница, Е.В. Буслович, В.Н. Боголепов*

**Резюме.** Невозможность выполнения реконструктивно-восстановительных оперативных пособий, при поражении дистального артериального русла, обуславливает поиск и разработку методов непрямой реваскуляризации. Перспективным представляется использование клеточной трансплантации с целью активации процессов репарации и ангиогенеза в пораженной конечности. Результаты проведенных доклинических исследований, со смоделированной ишемией конечности на лабораторных животных, свидетельствовали о существенной активации процессов ангиогенеза после трансплантации прогениторных стволовых клеток фетальной печени.

В дальнейшем клеточная трансплантация выполнена пациентам с хронической ишемией конечности. Используя методы электронной микроскопии, на ультраструктурном уровне эндотелиоцитов капилляров мышечной ткани доказано, что клеточная трансплантация способствует существенной активации процессов ангиогенеза у больных хронической ишемией конечности, и является перспективным методом непрямой реваскуляризации.

**Ключевые слова:** хроническая ишемия, непрямая реваскуляризация, электронная микроскопия.

## THE ULTRASTRUCTURE OF CAPILLARIES ENDOTHELIOCYTES IN MUSCULAR TISSUE AFTER PROGENITOR FETAL LIVER CELLS TRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH CHRONIC LIMB ISCHEMIA

*R.V. Saliutin, S.S. Palianytsia, O.V. Buslovych, V.M. Bogolepov*

**Abstract.** the failure to perform reconstructive-restorative surgical interventions in distal arterial lesions, justifies the necessity to search and develop indirect methods of revascularization. One of the promising methods is the use of cell transplantation to activate the reparation and angiogenesis processes in the affected limb. The results of carried out preclinical studies with modeled ischemia in laboratory animals have shown significant activation of angiogenesis after transplantation of progenitor fetal liver stem cells.

Consequently, the cell transplantation has been performed in patients with chronic limb ischemia. Using the electron microscopy techniques it was proved that at the ultrastructural level of endotheliocytes of capillaries in muscular tissue, cell transplantation contributes to substantial activation of angiogenesis in patients with chronic limb ischemia, and is a promising method of indirect revascularization.

**Key words:** chronic ischemia, indirect revascularization, electron microscopy.

Coordination Center of organs, tissues and cells transplantation (Kyiv)

Рецензент – д. мед. н. Д.Б. Домбровский

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 4 (72). – P. 122-126

Надійшла до редакції 18.07.2014 року