

УДК 591.86+616-006.36-089.843

Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, Р.М. Борис, О.В. Буслович, Ю.В. Полозюкова

ЗМІНИ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ КАПІЛЯРІВ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ АСПІРАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

Резюме. Відсоток незадовільних результатів відновних операцій на периферичному сегменті артеріального русла, а також відсутність, у ряді випадків, анатомічних умов до виконання реконструктивного втручання зумовлює пошук і розробку методів непрямой ревазуляризації.

Проведено експериментальне дослідження з метою вивчення перспективності використання гемопоетичних клітин фетальної печінки як стимулятора про-

цесів ангиогенезу в умовах ішемії. На ультраструктурному рівні доведена ефективність і перспективність використання гемопоетичних клітин фетальної печінки як індуктора процесів неангиогенезу *de novo* при ішемії кінцівки.

Ключові слова: ішемія, непрямая ревазуляризація, електронна мікроскопія, стовбурові клітини.

Вступ. Проблема лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок, яка зумовлена ураженням дистального судинного русла, залишається актуальною проблемою сучасної ангиології. Це зумовлено високим рівнем незадовільних наслідків реконструктивно-відновних операцій та відсутністю анатомічних можливостей щодо їх виконання в 30-40 % клінічних випадків [6, 9].

У комплексному лікуванні цієї категорії хворих використовують методи непрямой ревазуляризації, до яких відносять і трансплантацію стромальних стовбурових клітин кісткового мозку в ішемізовані м'язи ураженої кінцівки [3, 7]. Однак широке клінічне використання клітин кісткового мозку обмежене певними технологічними проблемами та низьким потенціалом трансдиференціювання дорослих мезенхімальних клітин [5].

Альтернативним джерелом активних плюропотентних клітин є фетальна печінка, гемопоетичні стовбурові клітини якої мають значний, однак, мало досліджений потенціал клінічного використання [1]. Незважаючи на те, що гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки (ГСКФП) застосовуються в комплексному лікуванні різних захворювань - хвороби Паркінсона, цукрового діабету, ішемічної хвороби серця тощо, повідомлення про їх використання в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок фактично відсутні [2, 8].

Мета дослідження. Дослідити в експерименті особливості впливу трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки людини та аспірату кісткового мозку на процеси ангиогенезу на рівні ультраструктури ендотеліоцитів капілярів ішемізованої м'язової тканини.

Матеріал і методи. Дослідження проведено у відділі експериментальної хірургії Національного інституту хірургії та трансплантології АМН України на 50 інбредних самцях білих щурів, що знаходились у стандартних умовах виварію. Середня маса щурів складала 375,0±8,0 г, вік 6,0±1,2 місяця. На першому етапі дослідження всім тва-

ринам під кетаміновим наркозом, у стерильних умовах виконано оперативне втручання - змодельована ішемія нижньої кінцівки за методом Князевої Т.А. Згідно з даними автора даного методу на третю добу після операції у тварин формується ішемія кінцівки [4].

На другому етапі тварини були розподілені на дві групи:

I група (контроль) - 25 щурів, котрим на 3-тю добу експериментальної ішемії в м'язи стегна уведено алогенний аспірат кісткового мозку, одержаний з діафізів стегнових кісток.

II група (дослідна) - 25 щурів, яким на 3-тю добу змодельованої ішемії проведено трансплантацію ксеногенних стовбурових клітин: ГСКФП 6-8 тижнів гестації з фенотипом CD 34⁺, CD 38⁺, CD 45Ra^{low}, CD 71^{low} (кількість КУО-ГМ 140.0x10³). Клітини вводили підфасціальну смужкою по медіальній поверхні ішемізованого стегна.

Дослідний матеріал (м'язи стегна) отримували під кетаміновим наркозом, з медіальної та латеральної поверхні дослідної кінцівки на 5, 7, 14, 21-шу та 25-ту добу змодельованої ішемії. Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки м'язової тканини фіксували у 2,5 % розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері (рН - 7,2-7,4) і дофіксували в 1 % розчині OsO₄.

Матеріал зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації і фіксували в аралдиті. Ультраструктури ендотеліоцитів контрастували у процесі зневоднення матеріалу насиченим розчином уранілацетату, а на зрізах - цитратом свинцю. Зрізи завтовшки 40-60 нм отримували на ультратомі УМТП-3 (Росія) та вивчали в електронному мікроскопі ТЕСЛА БС-500 (Росія).

Результати дослідження та їх обговорення. На 5-7-му добу після моделювання ішемії (2-4-ту добу після трансплантації аспірату кісткового мозку) в ендотеліоцитах тварин контрольної групи фіксували ознаки дегенеративно-дистрофічного стану, що було зумовлено триваючим ішемічним ураженням.

Про це свідчила наявність у матриксі незначної кількості вільних рибосом, мультивезикальних тілець та патологічно зміненого комплексу Гольджи, котрий складався з незначної кількості везикул різного калібру. Базальна мембрана ендотеліоцитів була відсутньою, з розпушеними місцями, потоншеним позаклітинним компонентом та ознаками розривів.

Траплялися клітини, в яких були відсутні мікропіноцитозні везикули, а ущільнені ділянки цитоплазми поєднувалися з ділянками низької щільності. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум майже у всіх клітинах був слабо розвинений, розширений, з нечіткими профілями.

Клітинне ядро мало просвітлену нуклеоплазму, великозернистий хроматин, зібраний у грудочки та розташований біля внутрішньої ядерної мембрани. Мітохондрії мали нетипову структуру – з електроннощільним матриксом та дезорієнтованими, скороченими та жорсткими кристами.

Водночас у тварин дослідної групи вже на 4-ту добу після клітинної трансплантації, спостерігались ознаки неангіогенезу, про що свідчила наявність молодих ендотеліоцитів із різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел, які формували молоді неокапіляри.

Нові ендотеліоцитоподібні клітини мали збільшене ядро, контуровані структури цитоплазматичного матриксу, вільні рибосоми та поодинокі піноцитозні везикули. У цитоплазмі виявлялися мітохондрії з нормальною щільністю, контрастним профілем зернистої ендоплазматичної сітки, мікротрубочки, множинні рибосоми та тільця Вейбеля – Палладе, котрі є маркерами неангіогенезу (рис. 1).

У деяких клітинах відмічалась активація пластичних процесів, про що свідчила гіпертрофія та гіперплазія елементів ендоплазматичного ретикулума, пластинчастого комплексу, наявність множинних поліморфних везикул та вакуолей.

Структура неокапілярів характеризувалася мозаїчністю. Це було зумовлено наявністю високодиференційованих ендотеліоцитів (з відносно вираженими ознаками зрілості та збереженими пластичними властивостями), що брали участь у процесі формування неомікросудин.

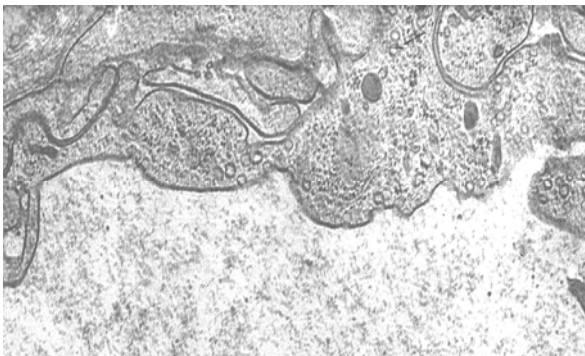


Рис. 1. Ендотеліоцит неокапіляра з піноцитозними бульбашками та наявністю гранул Вейбеля – Палладе. x 20000

На 14-ту добу експерименту (11-та доба після клітинної трансплантації) в електронограмах біоптатів тварин контрольної групи була наявною незначна кількість молодих незрілих ендотеліальних клітин, які мали збільшену кількість клітинних відростків, подовжених та переплетених між собою або розташованих паралельно. Їх клітинна мембрана мала звивисту структуру, сусідні відростки формували вузькі щілиноподібні порожнини, котрі поєднувалися десмосоподібними контактами.

Наявність ендотеліоцитів із зміненою формою ядра та наявністю інвагінацій ядерної мембрани вказувало на збільшення їх площини та компенсаторну гіперфункцію клітини, що свідчило про триваючу гіпоксію клітин.

Пластинчастий комплекс слабо розвинутий, у цитоплазмі виявлялися хаотично розташовані міофібрили, одиночі лізосоми. Мітохондрії округлої або овальної форми, помірної електронної щільності з напівзруйнованими кристами та світлим матриксом.

Досить часто між незрілими ендотеліоцитами фіксували порушення клітинних взаємовідношень – міжклітинні проміжки значно розширені, а в утворених порожнинах виявляли фрагменти деструктивно змінених міжклітинних контактів та мембранних елементів, що свідчило про значні порушення міжклітинної взаємодії на даний термін дослідження.

У біоптатах м'язової тканини тварин дослідної групи на 14-ту добу спостереження значна кількість ендотеліоцитів мала ущільнений матрикс із достатнім числом везикул, мультивезикулярних тілець, вільних рибосом та полісом, потовщених мікроворсинок, мікрофіламентів, мікротрубочок та цистерн, що свідчило про мітотичну та функціональну активність.

Лише в деяких клітинах зберігалася гіпоплазія структурних елементів пластинчастого комплексу та ознаки набряку ендотеліоцитів. Чітко виявлялися некапіляри, які склалися зі світлих, набряклих ендотеліоцитів. Водночас інші судини були розширеними та переповнені еритроцитами. Цитоплазма більшості ендотеліоцитів просвітлена, з мітохондріями невеликих розмірів, кристи яких мали ознаки набряку.

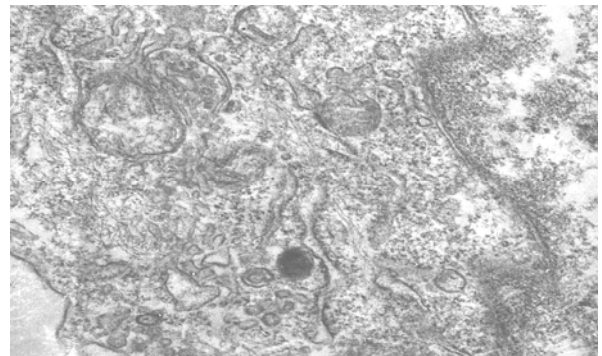


Рис. 2. Фрагмент молодого ендотеліоциту з ознаками клітинної трансформації. x 28000

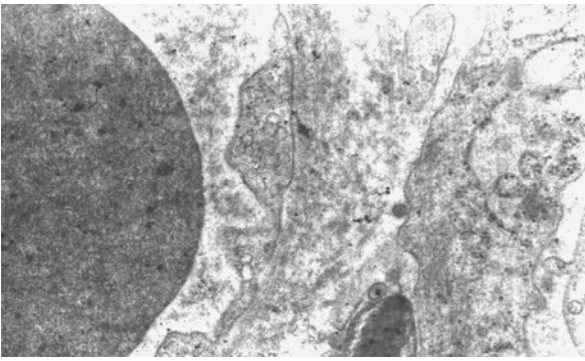


Рис. 3. Неокапіляр, утворений із молодих ендотеліоцитів, у просвіті котрого еритроцит $\times 20000$

Прекапілярний простір розширений, містив матеріал низької електронної щільності та колагенові волокна, а також незрілі клітини – молоді ендотеліоцити. Останні мали збільшене ядро та цитоплазму, котра містила піноцитозні везикули й тісно прилягала до базальної мембрани.

На 21-25-ту добу після моделювання ішемії ендотелій капілярів м'язової тканини тварин контрольної групи представлений сплосченими клітинами, які містили мікропіноцитозні везикули та були розташовані як по вільному краю, так і вздовж базального шару.

Траплялися різко потоншені ендотеліоцити з незначним вмістом просвітленої цитоплазми та зменшеною кількістю мікропіноцитозних везикул, фіксувалося розпушення, потоншення та руйнація позаклітинного компонента базального шару.

У молодих ендотеліоцитах спостерігали поживлення обмінних процесів, про що свідчив розширений гранулярний ретикулум, гіперосмований матрикс мітохондрій, наявність піноцитозних везикул та тілець Вейбеля – Палладе, а також поява значної кількості полісом та окремих фібрилярних структур (рис. 2).

Ядерний хроматин молодих ендотеліоцитів збирався грудками, особливо на периферії. Спостерігалися помірні зміни мітохондріальної системи – дискмплексація та розплавлення крист, дисоціація їх мембран та деструкція структурних елементів пластинчастого комплексу.

Однак в електроннограмах досить часто спостерігали наявність деструктивно змінених ендотеліоцитів, фрагменти котрих траплялися в просвіті капілярів – що свідчило про розриви цитоплазматичних мембран ендотеліальних клітин.

Водночас при аналізі електроннограм біоптатів тварин дослідної групи на 21-25-ту добу дослідження показував інтенсифікацію процесів ангиогенезу з активним формуванням молодих ендотеліоцитів та неокапілярної мережі (рис. 3).

Люмінальна поверхня ендотеліальних клітин мала значну кількість відростків, що збільшувало площу структур, які забезпечують трансендотеліальний транспорт. Цитоплазматичний матрикс із дещо зниженою електронною щільністю містив вільні рибосоми, а вздовж внутрішньої поверхні клітинної мембрани розташовувалися множинні мікрроворсинки.

Чисельні піноцитозні бульбашки розташовувалися переважно поблизу внутрішньої поверхні цитоплазматичної мембрани. Позаклітинний матеріал складався з незмінених або розщеплених колагенових фібрил, фрагментів еластичних волокон, деякої кількості зернистої речовини.

Ретикулярна мережа була добре розвинутою та представлена внутрішньоклітинними каналами і цистернами. Виявлялася значна кількість мікрофібрил та мікрофіламентів.

Частина піноцитозних бульбашок збільшувалась у розмірах та утворювала великі вакуолі. У поодиноких випадках спостерігалися зони деструкції цитоплазми старих ушкоджених ендотеліоцитів – з люмінальної поверхні відбувалося злушення мікрроворсинок у просвіті капіляра.

Таким чином, експериментальне дослідження показало, що при трансплантації кісткового мозку в ішемізовані м'язи упродовж майже всього періоду спостереження мали місце виражені деструктивні процеси, зумовлені триваючою ішемією.

Слід зазначити, що в даній групі дослідження спостерігалась активація компенсаторних сил ендотеліоцитів, котра проявлялась у появі молодих ендотеліоцитів. Однак вони виникають лише на 14-ту добу змодельованої ішемії (11-ту добу після трансплантації), містять дезорганізовані органели та мікрофіламенти, тобто такі клітини функціонально неповноцінні. Лише на 22-ту добу після трансплантації спостерігається поява функціонуючих ендотеліоцитів.

Водночас у тварин дослідної групи вже на 5-7-му добу ішемічного стану (2-4-ту добу після трансплантації гемопоетичних клітин фетальної печінки в ішемізовану м'язову тканину), спостерігається активація процесів ангиогенезу: виникали молоді ендотеліоцити з різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел та наявністю тілець Вейбеля – Палладе.

На 14-ту добу спостереження мали місце активно функціонуючі ендотеліоцити, які беруть участь у формуванні неокапіляра, а вже на 25-ту добу (22-гу після трансплантації) у біоптатах м'язової тканини фіксували наявність розвинутої та функціонуючої неокапілярної мережі.

Висновки

1. Трансплантація аспірату кісткового мозку та гемопоетичних клітин фетальної печінки призводить до активації процесів неоангиогенезу, а саме: появі молодих ендотеліоцитів із різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел та тільки Вейбеля-Палладе. Однак уведення в ішемізовану м'язову тканину гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки призводить до більш вираженої інтенсифікації процесів ангиогенезу порівняно з тваринами контрольної групи, яким трансплантували аспірат кісткового мозку.

2. Активність процесів неоангиогенезу, котрі спостерігаються у тварин дослідної групи навіть в умовах повної тотальної ішемії, свідчить про перспективу застосування гемопоетичних стов-

бурових клітин фетальної печінки в осіб із критичною ішемією кінцівок.

Література

1. Кухарчук О.Л. Ствобурові клітини фетальної печінки: проблеми ідентифікації та перспективи застосування в клінічній медицині / О.Л. Кухарчук, Т.М. Ганжа // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 147-153.
2. 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. трансплант. – 2005. – Т. 1, № 2. – С. 34-35.
3. Дрюк Н.Ф. Непрямые методы ревазуляризации при хронической критической ишемии как альтернатива ампутации / Н.Ф. Дрюк, А.В. Самсонов // Праці ХХ з'їзду хірургів України. – Тернопіль, 2002. – С. 591-593.
4. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т.А. Князева // Вестн. Акад. мед. наук СССР. – 1974. – Т. 2, № 12. – С. 3-8.
5. Кухарчук А.Л. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / А.Л. Кухарчук, В.В. Радченко, В.М. Сирман. – Черновцы: Золоті литаври, 2004. – 505 с.
6. Baumgartner I. Management of peripheral vascular disease / I. Baumgartner, R. Schainfeld, L. Graziani // Annu. Rev. Med. – 2005. – № 56. – P. 249-272.
7. Dormandy J.A. Fate of the patient with chronic leg ischaemia / J.A. Dormandy, M. Nahir, G. Ascady // J. Cardiovasc. Surg. (Torino). – 1999. – Vol. 4, № 30. – P. 50-57.
8. 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.
9. Surg B.J. Vascular Society of Great Britain and Ireland // B.J. Surg. – 2007. – № 94: issue 2. – P. 1-13.

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КАПИЛЛЯРОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АСПИРАТА КОСТНОГО МОЗГА И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ

Р.В. Салютин, С.С. Паляница, Р.Н. Борис, Е.В. Буслович, Ю.В. Полозюкова

Резюме. Процент неудовлетворительных результатов восстановительных операций на периферическом сегменте артериального русла, а также отсутствие, в ряде случаев, анатомических условий к выполнению реконструктивного вмешательства обуславливает поиск и разработку методов непрямої ревазуляризации.

Проведено экспериментальное исследование с целью изучения перспективности использования гемопоэтических клеток фетальной печени, как стимулятора процессов ангиогенеза в условиях ишемии. На ультраструктурном уровне доказана эффективность и перспективность использования гемопоэтических клеток фетальной печени как индуктора процессов неоангиогенеза de novo при ишемии конечности.

Ключевые слова: ишемия, непрямої ревазуляризация, электронная микроскопия, стволовые клетки.

CHANGES OF THE ULTRASTRUCTURE OF ENDOTHELIOCYTES OF THE MUSCULAR TISSUE CAPILLARIES UPON TRANSPLANTING THE BONE MARROW ASPIRATE AND HEMOPOIETIC STEM CELLS OF THE FETAL LIVER

R. V. Saliutin, S. S. Paliantsia, R. M. Borys, O. V. Buslovych, Yu. V. Polozukova

Abstract. The percentage of unsatisfactory results of restorative surgery on the peripheral segment of the arterial bed, as well as the absence in a number of cases of anatomical conditions for the performance of reconstructive interference stipulates a search and an elaboration of methods of indirect revascularization. An experimental research has been carried out for the purpose of studying the prospects of using hematopoietic cells of the fetal liver as stimulator of the processes of angiogenesis under ischemic conditions. The efficacy and perspectiveness of using hematopoietic cells of the fetal liver as an inducer of the processes of de novo neoangiogenesis in case of an ischemic extremity has been proved at the ultrastructural level.

Key words: ischemia, indirect revascularization, electron microscopy, stem cells.

Coordinating Center of Transplanting Organs, Tissue and Cells of Ukraine's MHP (Kyiv)

Рецензент – проф. Ю.Є. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 2 (66). – P. 110-113

Надійшла до редакції 23.10.2012 року