

УДК 612.356:616-092.4

Р. В. Салютін

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Координаційний центр трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України
Національний інститут хірургії та трансплантології
ім. О. О. Шалімова АМН України

Резюме. В експерименті на лабораторних щурах досліджені зміни ультраструктури ендотеліальних клітин капілярів м'язової тканини, що відбуваються в після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки. Доведено, що за умов ішемії стовбурові клітини фетальної печінки стимулюють процеси

ангіогенезу, а за умови уведення в інтактну м'язову тканину гемопоетичні стовбурові клітини диференціюються в тканинні макрофаги, загалом не порушуючи структури м'язової тканини.

Ключові слова: гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки, електронна мікроскопія.

Вступ. Важливою проблемою сучасної ангіології є лікування хворих з «нереконструктабельними» ураженнями дистального артеріального русла. Такі хворі заздалегідь приречені до вираженого ішемічного больового синдрому, появи трофічних виразок і гнійно – септичних ускладнень, а потім як наслідок, ампутація кінцівки та пожиттєва інвалідність [1].

Перспективним напрямом досліджень, щодо вирішення цієї проблеми, є застосування клітинних технологій [2,3]. В останні роки з метою стимуляції ангіогенезу використовують автологічні стовбурові клітини (СК) кісткового мозку. Однак широке клінічне використання кісткового мозку як джерела СК проблематичне, оскільки процедура його отримання достатньо складна, і в результаті вдається отримати мезенхімальні клітини з низьким потенціалом трансдиференціювання [4].

Альтернативним джерелом активних та, що достатньо важливо, плюрипотентних СК є тканини ембріофетального походження, а особливо фетальна печінка. Гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки (ГСКФП) мають значний, однак на сьогодні мало досліджений, потенціал клітинної диференціації, котрий відноситься до процесів ангіогенезу [5].

Існує низка наукових публікацій про можливості диференціювання стовбурових клітин фетальної печінки в адипогенному, хондрогенному та остеогенному шляхах, але всі ці дослідження проводились *in vitro* із додаванням до середовищ, на яких культивувалися клітини певних чинників, що стимулювали диференціацію в зазначеному напрямку. Проведення дослідження потенціалу диференціації *in vivo* в експерименті із використанням різних створених умов дозволило би спрогнозувати можливі напрями застосування даного варіанта клітинної трансплантації в клінічних умовах.

Мета дослідження. З'ясувати особливості впливу на процес ангіогенезу трансплантації гемопоетичних клітин фетальної печінки за умов експериментальної ішемії кінцівки та при уведенні клітин у неішемізовану м'язову тканину.

Матеріал і методи. Експериментальна робота виконана з використанням нелінійних білих щурів, що знаходились у стандартних умовах віварію. Середня маса щурів складала $375,0 \pm 8,0$ г, вік $6,0 \pm 1,2$ місяця. Оперативні втручання виконувалися під кетаміновим наркозом, у стерильних умовах. Після закінчення експериментальних досліджень та забору матеріалу на дослідження тварини виводились із експерименту шляхом передозування наркозу.

Тварини розподілені на 2 групи. I група (25 щурів) – яким на 3-ю добу змодельованої ішемії, за методом Т.А.Князевої [6], виконана трансплантація ксеногенних стовбурових клітин: гемопоетичні клітини фетальної печінки людини 6-8 тижнів гестації з фенотипом CD 34⁺, CD 38⁻, CD 45Ra^{low}, CD 71^{low} (кількість КУО-ГМ $140,0 \times 10^3$).

II група - тварини, в яких не була змодельована ішемія, а гемопоетичні клітини фетальної печінки вводили в інтактні м'язи.

Після закінчення терміну дослідження забирали м'язову тканину медіальної та латеральної поверхонь стегна на боці проведення експерименту. У тварин I групи біоптати м'язової тканини отримували на 5, 7, 14, 21, 25-у добу змодельованої ішемії, тобто на 2, 4, 11, 19, 22-у добу після уведення ГСКФП, а в щурів II групи біопсійний матеріал отримували на 7, 12, 22-у добу після клітинної трансплантації.

Для подальшого 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 в процесі зневоднення матеріалу насиченим розчином ураніацетату, 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 обговорювання.

У біоптатах м'язової тканини тварин першої групи, вже на 2-4-у добу після трансплантації (5-7-а доба змодельованої ішемії) спостерігалися первинні ознаки неангіогенезу, про що свідчила наявність молодих ендотеліоцитів з різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел. 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 зернистого ендоплазматичного ретикулума, мікротрубочки, множинні рибосоми та тільця Вейбеля – Палладе, які є маркерами неангіогенезу (рис.1). Крім того, на тлі великої кількості гранул Вейбеля – Палладе спостерігалася гіперплазія цитоплазматичних виростів та ворсинок.

Окрім того, в ендотеліоцитах спостерігали активацію пластичних процесів, про що свідчила гіпертрофія та гіперплазія елементів ендоплазматичного ретикулума, комплексу Гольджі, наявність множинних поліморфних везикул та вакуолей.

Структура неокapілярів характеризувалася мозаїчністю, що свідчить про їхню поліфункціональність. З одного боку, це зумовлено наявністю високодиференційованих ендотеліоцитів з відносно вираженими ознаками зрілості, з другого - збереженням пластичних властивостей, що вказує на участь у процесах формування неомікросудин.

У той же час ендотелій капілярів м'язової тканини тварин другої групи представлений клітинами помірної електронної щільності, котрі мали численні мікропіноцитозні везикули, мікроросинки, мікротрубочки з добре вираженою базальною мембраною, котра в деяких місцях просвітлюється або повністю зникає. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум ендотеліоцитів представлений у вигляді внутрішньоклітинних каналів або цистерн, у цитоплазмі реєстрували пов'язані з мітохондріями рибосоми. Мала місце переважна центральна локалізація гранулярного ендоплазматичного ретикулума та вакуолярних утворень гладенького ендоплазматичного ретикулума. Пластинчастий комплекс, як правило, представлений плоскими цистернами та маленькими міхурцями.

Найбільш виражені його структури розташовувалися між ядром та гранулярним ендоплазматичним ретикулумом. Розширення цистерн пластинчастого комплексу або його редукції не спостерігалось.

У біоптатах м'язової тканини тварин першої групи в період 14-21-ї доби змодельованої ішемії (11-19-а доба після клітинної трансплантації) виявляли значну кількість ендотеліоцитів, які мали ущільнений матрикс із достатнім числом везикул, мультивезикулярних тілець, вільних рибосом та полісом, потовщених мікроросинок, мікрофіламентів, мікротрубочок та цистерн, що свідчило про мітотичну та функціональну активність (рис.2).

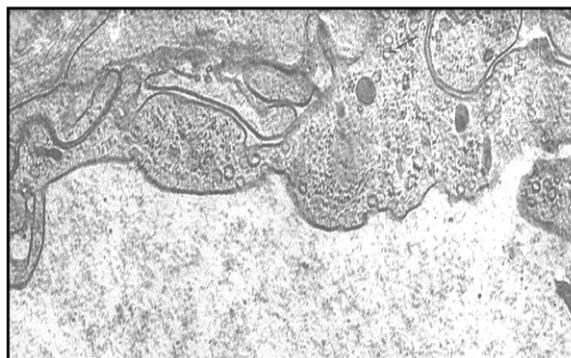


Рис. 1. Ендотелій неокapіляра з піноцитозними міхурцями та наявністю гранул Вейбеля – Палладе. x 20000

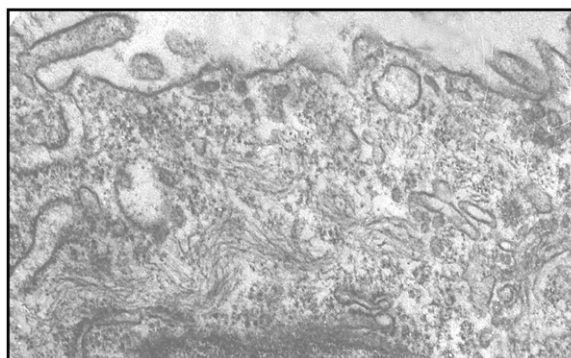


Рис. 2. Ендотеліоцит з вираженими ознаками диференціювання та функціональної активності x 22000

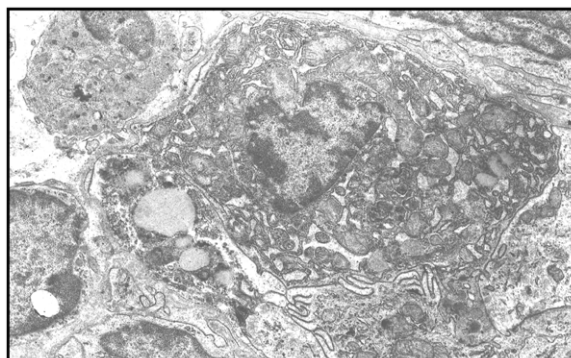


Рис.3. Зона клітинної проліферації та диференціювання. Велика клітина у центрі – макрофаг, по периферії котрого низько диференційовані клітини, що нагадують стовбурові клітини. x 15000

Цитоплазма більшості ендотеліоцитів просвітлена, з мітохондріями невеликих розмірів, крісти яких мали ознаки набряку. Прекапілярний простір розширений, містив матеріал низької електронної щільності та колагенові волокна, а також незрілі клітини – молоді ендотеліоцити.

Лише в деяких клітинах зберігались ознаки гіпоплазії структурних елементів пластинчастого ком-

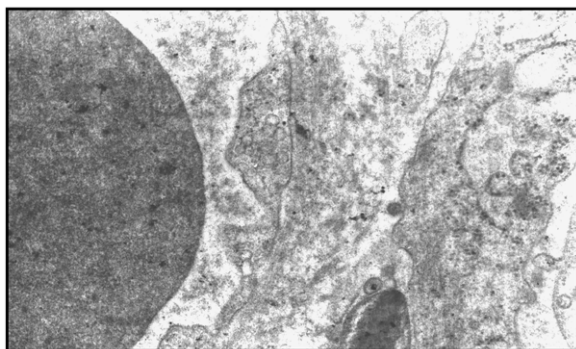


Рис.4. Неокапіляр утворений з молодих ендотеліоцитів у просвіті котрого розташований еритроцит x 20000

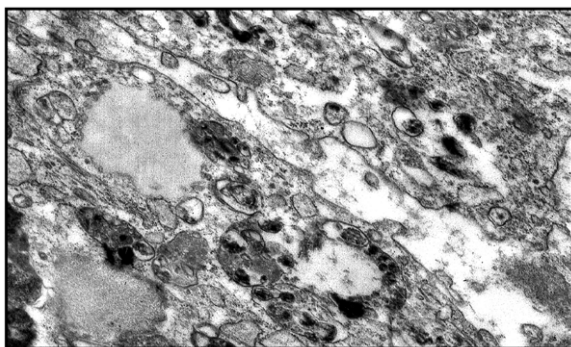


Рис.5. Фрагмент цитоплазми макрофага. Лізосомальні структури з наявністю щільного гранулярного матеріалу та вакуолярних утворень. x 28000

плексу та набряку. Сформовані неокапіляри склалися зі світлих, набряклих ендотеліоцитів.

На 12-у добу експерименту ендотеліоцити шуврів другої групи характеризувалися наявністю невеликих відростків або псевдоподій, нерівною люмінальною поверхнею та тришаровою клітинною мембраною. Позаклітинний матеріал складався з незмінених або розщеплених колагенових фібрил, фрагментів еластичних волокон, деякої кількості зернистої речовини. Клітинне ядро зазвичай округлої форми, з рівномірно розташованим ядерним хроматином.

Привертала увагу незначна звивистість ядерної оболонки, яка утворювала дуже варіабельні заглиблення. У деяких місцях траплялися пори ядерної оболонки, які поєднували цитоплазму та нуклеоплазму.

Необхідно відмітити, що на електронограмах відмічені зони проліферації недиференційованих клітин, котрі склалися з незначної кількості клітин, що нагадували молоді ендотеліоцити та значної кількості макрофагальних клітин (рис.3).

Наприкінці дослідження (25-а доба змодельованої ішемії, 22 після трансплантації), у тварин першої групи спостерігалась інтенсифікація процесів ангіогенезу з активним формуванням молодих ендотеліоцитів та функціонуючої некапілярної сітки (рис.4).

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 мікроворсинки.

Численні піноцитозні міхурці, частина яких збільшувалась у розмірах та утворювала великі вакуолі, розташовувалися переважно поблизу внутрішньої поверхні цитоплазматичної мембрани.

Позаклітинний матеріал складався з незмінених або розщеплених колагенових фібрил, фрагментів еластичних волокон, деякої кількості зернистої речовини. Ретикулярна сітка добре розвинута та представлена внутрішньоклітинними каналами і цистернами. Виявлялася значна кількість мікрофібрил та мікрофіламентів.

В окремих випадках спостерігалися зони деструкції цитоплазми старих ушкоджених ендотеліоцитів – із люмінальної поверхні відбувалося злушення мікроворсинок у просвіт капіляра.

У той же час аналіз представлених електронограм другої групи свідчить про значне зростання (порівняно з 12-ю добою експерименту) кількості недиференційованих макрофагів, які мали незначну кількість оточених облямівкою піноцитозних міхурців. Значною мірою макрофаги виглядали набряклими, у них розташовувалися деструктивно змінені мітохондрії, вакуолі, мікротрубочки та мікрофіламенти.

Цитоплазма мала помірну електронну щільність та містила різні за розміром, формою та щільністю вакуолярні утворення, а також значну кількість фібрилярних та мієлінових утворень, ліпофусцину та дрібно нїздрюватих вакуолярних структур. Рівень складчастості ядерної мембрани макрофагів незначно коливався. Складками вкрита не вся поверхня ядра, на окремих ділянках інвагінації представлені подовженнями тільки перинуклеарного простору. Траплялися тубулярні структури та щільний гранулярний матеріал, у деяких макрофагах мікротрубочки та цитоплазматичні волокна виглядали деструктивно зміненими.

Окрім того, у цитоплазмі наявні пучки найтонших цитоплазматичних волоконць, мультівезикулярні тільця, везикули різного розміру та ліпідні крапленьня. Деякі макрофаги зазнавали дегенеративних змін. Так, у цитоплазмі виявляли незначну кількість піноцитозних міхурців, а також гомогенні невеличкі електроннощільні гранули.

В окремих клітинах спостерігали некротичну дезінтеграцію, фіксували ознаки помірного лізису внутрішньоклітинних мембранних структур. Клітинний детрит не концентрувався, а розповсюджувався в міжклітинному просторі. Цитоплазматичний матрикс мав помірну електронну щільність.

У деяких везикулах розташовувався різної електронної щільності дрібнозернистий матеріал. Більш великі вакуолі містили мембранні уривки та мієлінові фігури (рис.5).

Вакуолі містили мембранні уривки та різної величини мієлінові фігури. На фоні лізису гранулярний ендоплазматичний ретикулум фактично був відсутній, подекуди зберігалися залишки цитоплазматичного фібрилярного матеріалу.

Місцями в мікрофібрилярних масах спостерігалися збережені пучки більш – менш паралельних фібрил та колагенових волокон з нечіткими контурами, а структури з домішками аморфної речовини значно переважали за об'ємом кількість волокнистих структур.

Проведені ультраструктурні дослідження показали, що при трансплантації ГСКФП у зону ішемії стимулюються процеси ангиогенезу – поява неендотеліоцитів та формування функціонуючої некапілярної сітки. Цілком імовірно це відбувається як за рахунок ендотеліальних клітин існуючих судин, так і внаслідок стимуляції репаративних процесів і безпосередньої трансформації трансплантованих стовбурових клітин. Крім того, введення гемопоетичних стовбурових клітин зменшує загибель клітин ендотелію в процесі ангиогенезу за умов ішемії.

У випадку трансплантації ГСКФП в інтактну м'язову тканину, де відсутнє ішемічне ураження клітин та біологічно активні речовини, які притаманні даному патологічному процесу, трансплантовані клітини активно перетворюються на активно функціонуючі макрофаги. Структурно-функціональні характеристики ендотеліальних та м'язових клітин у ділянці трансплантації не змінювалися, за винятком незначної запальної реакції на початкових стадіях, що спричинена самою трансплантацією.

ДИФЕРЕНЦИРОВКА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

Р. В. Салютин

Резюме. В эксперименте на лабораторных крысах изучены изменения ультраструктуры эндотелиальных клеток капилляров мышечной ткани, которые происходят после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток фетальной печени. Установлено, что в условиях ишемии стволовые клетки фетальной печени стимулируют процессы ангиогенеза, а при введении в интактную мышечную ткань гемопоэтические стволовые клетки дифференцируются в тканевые макрофаги, при этом не нарушая структуру мышечной ткани.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки фетальной печени, электронная микроскопия.

DIFERENTIATION OF HEMOPOIETIC STEM CELLS OF FETAL LIVER UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS

R. V. Saliutin

Abstract. In an experiment on laboratory rats changes of the ultrastructure of the endothelial cells of the capillaries of the muscular tissue, taking place after the transplantation of hemopoietic stem cells of fetal liver have been studied. It is corroborated that under the conditions of ischemia the stem cells of the fetal liver stimulate the processes of angiogenesis, and in case of the introduction into the intact muscular tissue the hemopoietic stem cells are differentiated into tissue macrophages without violating the structure of the muscular tissue.

Key words: hemopoietic stem cells of fetal liver, electron microscopy.

Coordinating Center of Transplantation of Organs, Tissues and Cells of Ukraine' MHP
National Institute of Surgery and Transplantology named after A.A. Shalimov of Ukraine; AMS

Buk. Med. Herald. – 2010. – Vol. 14, №3 (55). – P.115-118.

Рецензент – д.мед.н. Ф. В. Гринчук

Надійшла до редакції 25.05.2010 року

© Р. В. Салютин, 2010