

© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2013
УДК 616 – 089.843: 611.36 + 611.013 + 611.4 + 57.083

Імуногістохімічна характеристика диференціації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки за різних умов експериментальної трансплантації

Р.В.Салютін, М.Ф.Соколов, В.М.Сірман, В.А.Шаблій, Л.А.Панченко

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України
Київ, Україна

Проведено експериментальне дослідження на щурах, яким в ішемізовану й інтактну м'язову тканину задньої кінцівки трансплантували гемопоетичні стовбурові клітини людини 6-8 тижнів гестації. Надалі проведено імуногістохімічне дослідження (визначення експресії антитіл до фактора Віллебранта, колагену IV типу і віментину) процесів що протікають в м'язовій тканині після трансплантації стовбурових клітин, за різних умов експерименту. Отримані результати дозволяють судити про перспективність подальших досліджень у цьому напрямі.

Ключові слова: ішемія, стовбурові клітини, фетальна печінка.

ВСТУП

Клітинна терапія, що проводиться з використанням як аутологічного, так і алогенного матеріалу, є однією з найбільш пріоритетних напрямів розвитку сучасної медицини [1, 2].

Клінічна трансплантація стовбурових клітин (особливо кісткового мозку) все ширше застосовується для відновлення тканин після видалення ракових утворень, заміщення кісткових і хрящових дефектів, відновлення шкірного покриву після опіків, функціонального відновлення ушкоджень тканин серця і мозку, викликаних інфарктами, інсультами і дегенеративними захворюваннями, а також для лікування критичної ішемії нижніх кінцівок, відновлення функцій печінки і стимуляції кровотворення [3-5].

Однак застосування клітин аутологічного походження має і свої недоліки: зменшення популяції стовбурових клітин відносно віку, накопичення дефектних генів, болючість отримання матеріалу, необхідного для виділення клітинної популяції. Тому привертає увагу дослідників унікальне і не в повній мірі досліджуване джерело плюріпотентних стовбурових клітин - фетальна печінка.

Враховуючи значний клінічний потенціал гемопоетичних стовбурових клітин та визначення перспективності їх використання в комплексному лікуванні хворих з хронічною ішемією кінцівок, нами було проведено експеримент, метою якого було дослідити за допомогою імуногістохімічних методів процеси, що відбуваються в м'язовій тканині після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки (ГСКФП) у залежності від різних умов їх трансплантації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальна частина роботи була виконана на базі відділу експериментальної хірургії Національного інституту хірургії та трансплантології з використанням 80 щурів, що знаходились при кімнатній температурі на звичайному лабораторному раціоні. Середня маса щурів складала $368,42 \pm 7,21$ г, вік — $6 \pm 1,2$ місяця. Оперативні втручання проводилися під кетаміновим наркозом зі збереженням усіх умов асептики та антисептики.

Тварини були розподілені на три групи: 1 (контрольна) група — тварини, у яких була змодельована ішемія кінцівки (модельовання ішемії м'язової тканини задньої кінцівки у щура проводилося за методом Т.А.Князевої [6]); 2 гру-

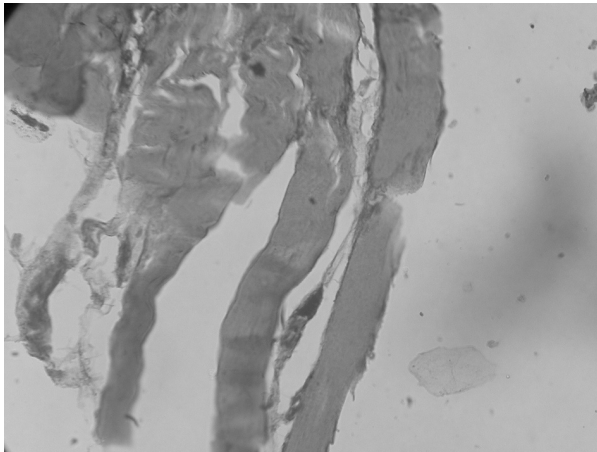


Рис. 1. 1 група. 25 доба змодельованої ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 20.

па — тварини, яким в інтактні м'язи кінцівки трансплантовані ГСКФП, 3 група — тварини, яким на фоні ішемії кінцівки (третя доба змодельованої ішемії) були введені ГСКФП.

ГСКФП людини 6-8 тижнів гестації з фенотипом CD 34⁺, CD 38⁺, CD 45Ra^{low}, CD 71^{low} (кількість КУО-ГМ $140,0 \times 10^3$), вводили через шприць підфасціалью смужкою по медіальній поверхні стегна.

У тварин 1 та 3 груп досліджуваний матеріал (м'язи стегна з медіальної та латеральної поверхні досліджуваної кінцівки) отримували на 3, 5, 7, 14, 21 та 25 добу після моделювання ішемії на кінцівці. Біопсію м'язової тканини у щурів 2 групи виконували на 7-12-22 добу піс-

ля клітинної трансплантації. Надалі отримані біоптати м'язової тканини були досліджені за допомогою імуногістохімічних методів, визначалася експресія віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імуногістохімічні характеристики віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда у щурів 1 групи були нерівномірно виражені і змінювалися відносно динаміки ішемічного ураження. Так, на 7-14 добу експерименту експресія віментину була найбільш вираженою (від початку моделювання ішемії) в міжм'язових волокнах, які оточують судинні пучки, а також у мембранах стінок венул та артеріол. Окрім того, на тлі дистрофії і деструкції міопласту були виявлені вогнища фрагментації мезенхімальних структур, які зменшувалися і зникали до 22-25 доби після моделювання ішемії (рис. 1).

При цьому експресія колагену IV типу є найбільш виражена на 7-14 добу ішемії в стінці повнокровних артеріальних судин та вогнищево в розволокненній стінці венул (рис. 2).

Імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, особливо була виражена на 3 та 7 добу експериментальної ішемії в повнокровних судинах ендомізю та перимізю.

Отже, змодельована ішемія кінцівки призводить до розладу кровообігу та деструктивно-дистрофічними змінам м'язової тканини, які поступово зменшуються до 22-25 доби експерименту.

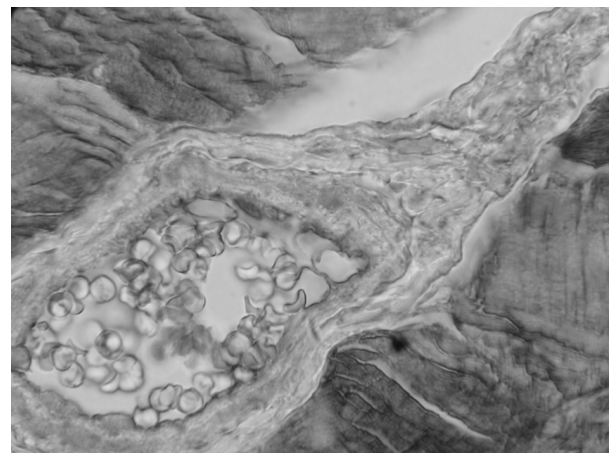
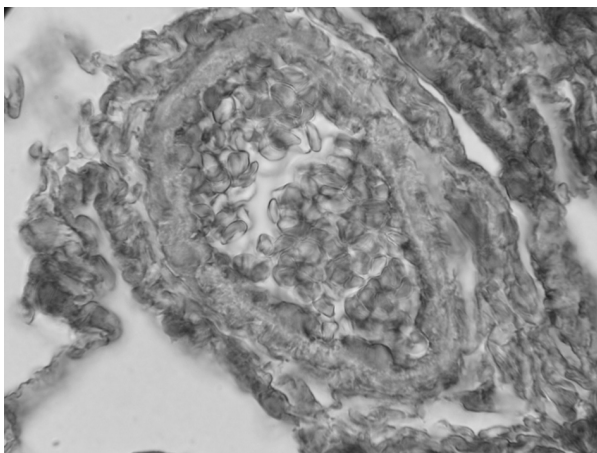


Рис. 2. Колаж. 1 група. 10 доба ішемії. Експресія колагену IV типу в стінці повнокровної артеріальної і венозної судин, в яких спостерігається стаз еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40.

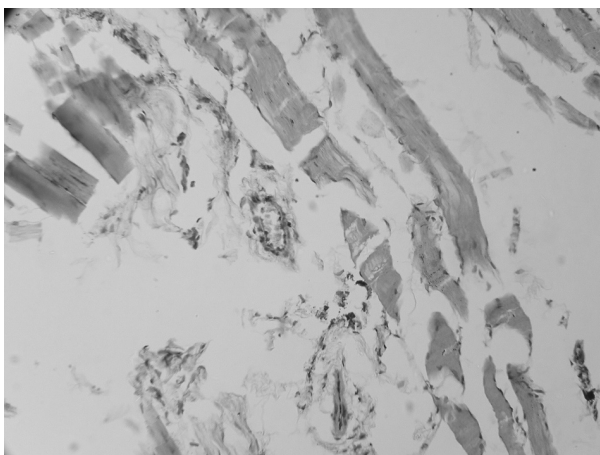


Рис. 3. 3 група. Експресія колагену IV типу у вогнищі регенерації. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40.



Рис. 4. 3 група. 22 доба після клітинної трансплантації. Експресія фактора Віллебранда в новоутворених судинах, які розташовуються в ендомізії. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40.

Імуногістохімічне дослідження біоптатів м'язової тканини тварин 2 групи (трансплантація клітин фетальної печінки в інтактну м'язову тканину) свідчило про незмінність експресії досліджуваних факторів на всіх термінах експерименту.

Експресія моноклональних антитіл до віментину, колагену IV типу, а також до фактора Віллебранда не відрізнялась від експресії в інтактній м'язовій тканині. Імуногістохімічна реакція на віментин спостерігалась у вигляді тонких волокнистих структур у мезенхімі.

Колаген IV типу експресувався в базальних шарах мембранних структур міосімпласту.

У щурів 3 групи починаючи із 7 доби експериментальної ішемії (4 доба після трансплантації ГСКФП) спостерігали за формуванням судинних структур, які фіксуються на імуногістохімічному рівні за допомогою реакції на віментин.

Процес неоангіогенезу підтверджується результатами дослідження експресії колагену IV типу, який переважно локалізується в мембранних структурах нових судин та судинних пучків, а також у вогнищах регенерації (рис. 3).

Починаючи з 11 доби після трансплантації ГСКФП спостерігали ознаки появи «молодих ендотеліоцитів», а на 22 добу після клітинної трансплантації виражена експресія фактора Віллебранда була виявлена в новоутворених судинах, які розташовувалися в ендомізії та вогнищах міопласту, а також у міжм'язових волокнах у вигляді первинних судин (рис. 4).

Отже, трансплантація ГСКФП на тлі експериментальної ішемії призводить до активної сти-

муляції регенераторних процесів і ангіогенезу, про що свідчить збільшена експресія віментину (вже з 4-ї доби після трансплантації стовбурових клітин) та фактора Віллебранда, який локалізується в стінці новоутворених артеріальних судин. Окрім того, у щурів 3 групи протягом усього терміну дослідження відмічено значне зменшення фіброзування м'язової тканини, що підтверджується динамікою змін експресії колагену IV типу та мезенхімального фактора віментину.

ВИСНОВКИ

Таким чином, трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки людини в ішемізовану м'язову тканину призводить до активації процесів ангіогенезу, що обумовлює компенсування ішемічного ураження. Вже на 4 добу після трансплантації стовбурових клітин імуногістохімічним методом фіксується формування первинних судинних структур, з 11 доби експерименту активно з'являються молоді ендотеліоцити, які вже на 22 добу утворюють активно функціонуючу мережу з новоутворених капілярів.

У той же час введення гемопоетичних стовбурових клітин в інтактну м'язову тканину експериментальних щурів не призводило до жодних змін імуногістохімічних реакцій.

Ключовим моментом, що СПРЯМОАУЄ процес диференціації стовбурових клітин, є характер середовища, куди відбувається трансплантація клітин і яке зумовлює зміни клітин у необхідному напрямі в межах їх потенціалу диференціації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Pena Duque M.A. Angiogenesis // Arch. Cardiol. Mex. — 2003. — Vol. 73. — P. 109-111.
2. Kinnaird T., Stabile E., Epstein S.E., Fuchs S. Current perspectives in therapeutic myocardial angiogenesis // J. Interv. Cardiol. — 2003. — Vol. 16, №4. — P. 289-297.
3. Rosell-Novel A., Montaner J., Alvarez-Sabin J. Angiogenesis in human cerebral ischemia // Rev. Neurol. — 2004. — Vol. 38, №11. — P. 1076-1082.
4. Rajnoch J., Viklicky O. Angiogenesis and organ transplantation // Folia. Microbiol. — 2004. — Vol. 49, №5. — P. 499-505.
5. Uzan G. Therapeutic use of stem cells. II. Adult stem cells // Rev. Prat. — 2004. — Vol. 54, №14. — P. 1515-1527.
6. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани // Вестник Акад. мед. наук СССР. — 1974. — №12. — С. 3-8.

Р.В.Салютин, Н.Ф.Соколов, В.М.Сирман, В.А.Шаблій, Л.А.Панченко. Иммуногистохимическая характеристика дифференциации гемопоэтических стволовых клеток при разных условиях экспериментальной трансплантации. Киев, Украина.

Ключевые слова: ишемия, стволовые клетки, фетальная печень.

Фетальная печень является уникальным и недостаточно изученным источником плюрипотентных стволовых клеток, при этом особый интерес вызывают факторы, которые способствуют их направленной дифференциации *in vivo*. Нами было проведено экспериментальное исследова-

ние на крысах, которым в ишемизированную и интактную мышечную ткань задней конечности трансплантировали гемопоэтические стволовые клетки человека 6-8 недели гестации. В дальнейшем проведено иммуногистохимическое исследование (определение экспрессии антител к фактору Виллебранта, коллагену IV типа и виментина) процессов, протекающих в мышечной ткани после трансплантации стволовых клеток при разных условиях эксперимента. Полученные результаты позволяют судить о перспективности дальнейших исследований в данном направлении.

R.V.Salyutin, M.F.Sokolov, V.M.Sirman, V.A.Shablii, L.A.Panchenko. Immunohistochemical description of differentiation of haemopoetic stem cells of fetal liver at different terms of experimental transplantation. Kyiv, Ukraine.

Key words: ischemia, stem cells, fetal liver.

Fetal a liver is unique and by the investigational not enough source of pluripotents of stem cells, the special curiosity is caused by factors that influence on their directed differentiation of *in vivo*. By us experimental research was conducted on rats which in ischemic and intact muscular tissue of hindlimb was transplanted by haemopoetic stem cells of fetal liver of man 6-8 weeks hestation. In future conducted immunohistochemical research (determination of expression of antibodies to the factor of Villebrand, to the collogen IV to the type and vimentine) of processes which take place in muscular tissue after transplantation of stem cells at different terms to the experiment. The got results allow to define perspective of subsequent development of this direction of researches.

Надійшла до редакції 07.10.2012 р.