

НАРУШЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА В ПЕРИОД ПОЗДНИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ ТИОТРИАЗОЛИНОМ*С.М. Придруга, Р.Н. Борис*

Резюме. Политравма в период поздних проявлений травматической болезни сопровождается выраженными нарушениями гуморального иммунитета, которые проявляются увеличением содержания в сыворотке крови циркулирующих иммунных комплексов и иммуноглобулинов классов А, М, G на 14-28-ые сутки эксперимента. Применение тиотриазолина сопровождается меньшим напряжением гуморального иммунитета, что сопровождается статистически достоверно низким содержанием в сыворотке крови ЦИК, Ig А, М, G относительно нелеченных животных во все сроки наблюдения.

Ключевые слова: политравма, гуморальный иммунитет, тиотриазолин.

A VIOLATION OF THE HUMORAL COMPONENT OF IMMUNITY DURING THE PERIOD OF LATE MANIFESTATIONS OF WOUND DYSTROPHY AND ITS CORRECTION BY THIOTRIAZOLINE*S.M. Prydruha, R.M. Borys*

Abstract. Polytrauma during the period of late manifestations of wound dystrophy is accompanied by marked disturbances of the humoral immunity, manifested by an increasing content of blood serum circulating immune complexes (CIC) and immunoglobulin of classes A, M, G in serum on the 14th-28th day of the experiment. The application of thiotriazoline is accompanied by a lesser tension of humoral immunity, which was accompanied by a statistically significantly lower blood serum content of CIC, Ig A, M, G, regarding untreated animals during all periods of observation.

Key words: polytrauma, humoral immunity, thiotriazoline

SHEE "State Medical University Named by I.Ya. Gorbachevsky" (Ternopil),
SM "Ukrainian Scientific-Research Institute of Transport Medicine Ministry of the Health of Ukraine" (Odesa)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 1 (65). – P. 96-101

Надійшла до редакції 04.02.2013 року

© С.М. Придруга, Р.М. Борис, 2013

УДК 616-092.4:612.356:591.4

*Р.В. Салютін, Д.Б. Домбровський, С.С. Паляниця, В.А. Шаблій,
Р.М. Борис, Г.С. Лобинцева, О.В. Буслович*

ЗМІНИ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ КАПІЛЯРІВ ТА ГІСТОЛОГІЧНОЇ СТРУКТУРИ ІШЕМІЗОВАНОЇ ТА ІНТАКТНОЇ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ IN VIVO

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

Резюме. Досліджена в експерименті ультраструктура ендотеліальних клітин капілярів та гістологічна структура м'язової тканини на різних етапах після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки.

Доведено, що за умов ішемії стовбурові клітини фетальної печінки стимулюють процеси ангиогенезу, а

при трансплантації 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, гістологія.

Вступ. Одним із перспективних напрямів лікування хворих на облітеруючі та оклюзійні захворювання периферичних артерій кінцівок, яким із цілої низки причин виконати реконструктивно – відновні оперативні втручання на судинах неможливо, є застосування клітинних технологій [3, 5].

В останні роки в клінічну практику увійшли методи клітинної терапії, які ґрунтуються на застосуванні аутологічних стовбурових клітин кісткового мозку. Однак широке клінічне використання стовбурових клітин кісткового мозку проблематичне, оскільки процедура їх отримання достатньо складна, а в результаті вдається отримати

© Р.В. Салютін, Д.Б. Домбровський, С.С. Паляниця, В.А. Шаблій,
Р.М. Борис, Г.С. Лобинцева, О.В. Буслович, 2013

мати мезенхімальні клітини з низьким потенціалом трансдиференціювання [1, 4].

Альтернативним джерелом активних та, що достатньо важливо, плюропотентних стовбурових клітин є тканини ембріофетального походження, а особливо фетальна печінка. Гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки (ГСКФП) мають значний, однак, на сьогодні мало досліджений, потенціал клітинної диференціації [2].

Проведені наукові дослідження вказують на можливості диференціювання стовбурових клітин фетальної печінки адипогенним, хондрогенним та остеогенним шляхами, але всі ці дослідження проводились *in vitro* із додаванням до середовищ, на яких культивувалися клітини певних факторів, що стимулювали розвиток диференціації в зазначеному напрямку.

Дослідження потенціалу диференціації *in vivo* в експерименті, з використанням різних створених умов, дозволяє спрогнозувати можливі напрями клітинної диференціації та обґрунтувати практичне застосування методу клітинної трансплантації.

Мета дослідження. Визначити, з використанням методів електронної мікроскопії та гістологічного дослідження, особливості впливу на процес ангиогенезу трансплантації гемопоетичних клітин фетальної печінки за умов експериментальної ішемії кінцівки та при уведенні клітин в інтактну м'язову тканину.

Матеріал і методи. Експериментальна робота виконана з використанням 30 нелінійних білих щурів, що знаходились у стандартних умовах віварію. Середня маса щурів – 375,0±8,0 г, вік – 6,0±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 були розподілені на дві групи, по 15 тварин у кожній групі.

I група (дослідна) – щури, яким на третю добу змодельованої ішемії проведено трансплантацію ксеногенних стовбурових клітин: гемопо-

етичні клітини фетальної печінки людини 6-8 тижнів гестації з фенотипом CD 34⁺, CD 38⁻, CD 45Ra^{low}, CD 71^{low} (кількість КУО-ГМ 140.0x10³), виробництва Харківського інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

Моделювання ішемії тканин кінцівки в щура проводилося за методом Т.А.Князевої – перев'язуючи загальноостегову артерію та вену [5]. За даними, ішемічні прояви виражені вже на 3-4-ту добу після моделювання. Клітини в дозі 3-5x10⁶ вводили через шприц (голка 22 G 0/5) підфасціальну смужкою по медіальній поверхні ішемізованого стегна.

II (контрольна) група – тварини, у яких не була змодельована ішемія, а гемопоетичні клітини фетальної печінки вводили в інтактні м'язи медіальної поверхні стегна.

У всіх тварин після закінчення терміну дослідження (на 7, 14-ту та 25-ту добу) була взята біопсія м'язової тканини по медіальній поверхні стегна (на боці проведення експерименту), після чого застосовані електронно-мікроскопічні та гістологічні методи дослідження отриманих біоптатів.

Електронно-мікроскопічне дослідження виконували за загальноприйнятою методикою, на базі відділу патоморфології НІХТ ім. О.О.Шалімова. Зрізи, завтовшки 40-60 нм, отримували на ультратомі УМП-3(Росія) та вивчали в електронному мікроскопі ТЕСЛА БС-500(Росія).

Гістологічне дослідження виконували на базі лабораторії патоморфології ДУ «Інститут педіатрії акушерства та гінекології» АМНУ. Застосована методика забарвлення гематоксилін-еозином давала загальну уяву про тканинну структуру, дозволяла виявити усі клітинні елементи та деякі неклітинні структури. Забарвлення біоптатів пікрофуксином, за методом Ван-Гізон, дозволило нам дослідити динаміку змін сполучної тканини.

Результати дослідження та їх обговорення. У біоптатах м'язової тканини тварин дослідної групи на 7-му добу після трансплантації спостерігалися первинні ознаки неангіогенезу, про що свідчила наявність молодих ендотеліоцитів із різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел.

Нові ендотеліоцитоподібні клітини мали збільшене ядро, чіткі структури цитоплазматич-

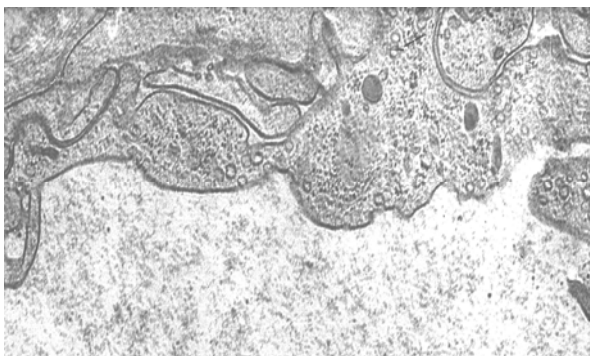


Рис. 1. Дослідна група, 7-доба після клітинної трансплантації. Фрагмент ендотеліоцита неокапіляра з піноцитозними бульбашками та наявністю гранул Вейбеля – Палладе. x 20000

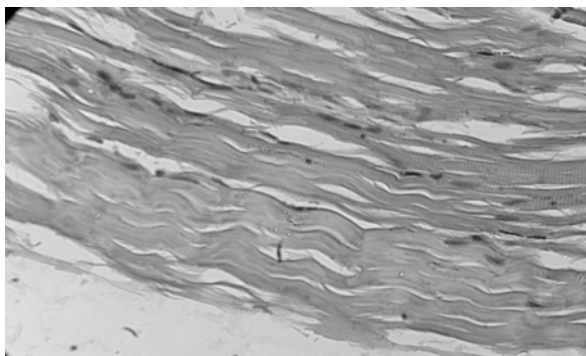


Рис. 2. Дослідна група, 7-доба після клітинної трансплантації. Структура м'язопучка без змін. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофотографія. Об.10; Ок. 20

ного 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, які є маркерами неоангіогенезу (рис. 1).

У деяких клітинах відмічалась активація пластичних процесів, про що свідчила гіпертрофія та гіперплазія елементів ендоплазматичного ретикулу-

ма, пластинчастого комплексу, наявність множинних поліморфних везикул та вакуолей.

Структура первинних неокапілярів, що формуються, характеризувалася мозаїчністю, що свідчить про їхню поліфункціональність. З одного боку, це зумовлено наявністю високо диференційованих ендотеліоцитів із відносно вираженими ознаками зрілості, з іншого – збереженням пластичних властивостей, що вказує на участь у процесах формування неомікросудин.

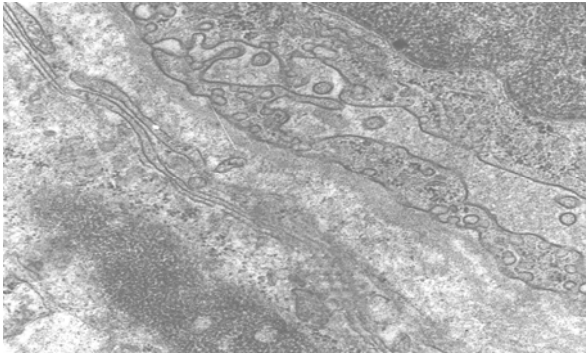


Рис. 3. Контрольна група, 7-ма доба після трансплантації ГСКФП. Цитоплазматичні органи функціонально активного ендотелію з чітко вираженою базальною мембраною. Структура останньої з ділянками просвітлення та лізису (праворуч знизу) x 15000

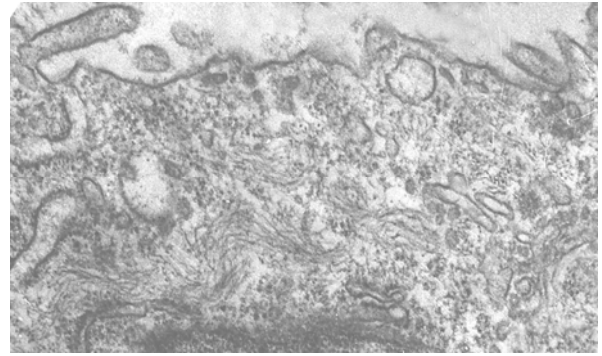


Рис. 4. Дослідна група, 14-та доба після трансплантації ГСКФП. Фрагмент ендотеліоцита з вираженими ознаками диференціювання та функціональної активності. x 22000

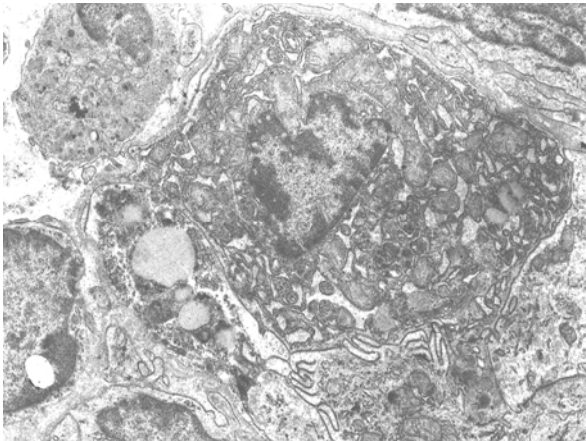


Рис. 5. Контрольна група, 14-та доба після трансплантації ГСКФП. Зона клітинної проліферації та диференціювання. Велика клітина в центрі – макрофаг, по периферії котрого низько диференційовані клітини, нагадуючи стовбурові. x 15000

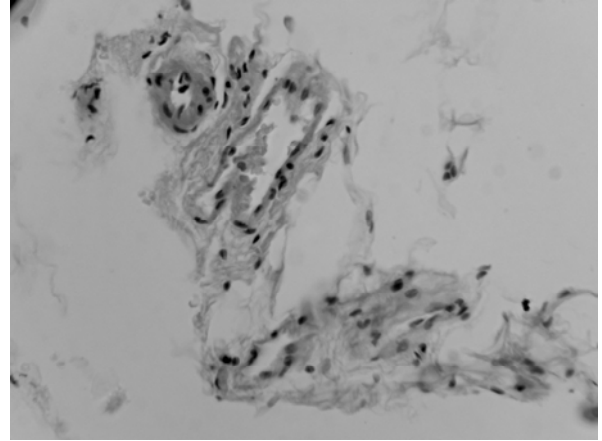


Рис. 6. Контрольна група, 14-та доба після клітинної трансплантації. Міосимпласт, переваскулярної активації макрофагів та гістоцитів. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван-Гізона. Мікрофотографія. Об.10, Ок. 20

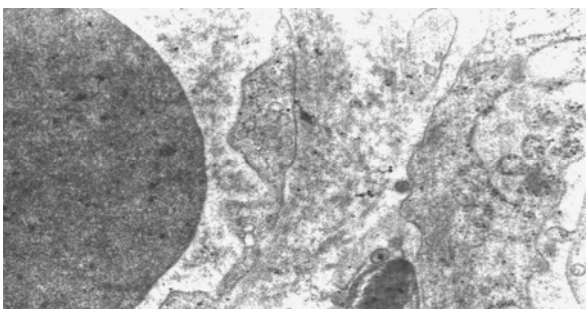


Рис. 7. Дослідна група, 25-та доба після клітинної трансплантації. Неокапіляр, утворений із молодих ендотеліоцитів, у просвіті еритроцит. x 20000

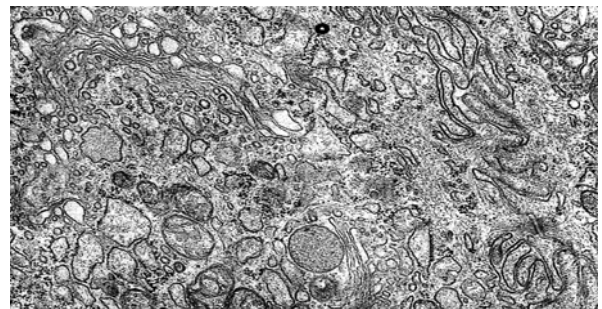


Рис. 8. Контрольна група, 25-та доба після клітинної трансплантації. Помірної щільності матрикс цитоплазми макрофага з органами. Зверху зліва пластинчастий комплекс. x 25000

Дані проведеного гістологічного дослідження свідчили, що на 7-му добу після трансплантації ГСКФП у міопласті мали місце мозаїчні зміни – переважала кількість незмінених структур, які відповідали тканинним характеристикам неушкодженої м'язової тканини (рис. 2).

Гранулярна ендоплазматична мережа ендотеліоцитів представлена у вигляді внутрішньоклітинних каналів або цистерн, у цитоплазмі реєстрували пов'язані з мітохондріями рибосоми.

Пластинчастий комплекс представлений плоскими цистернами та маленькими бульбашками. Розширення цистерн пластинчастого комплексу або його редукції не спостерігалось. Аналіз гістологічних препаратів м'язового симпласта на 7-му добу експерименту виявив звичайну (не змінену) структуру м'язових волокон, вогнища міосимпласта без особливостей.

У біоптатах м'язової тканини тварин дослідної групи на 14-ту добу експерименту виявлялися первинні неокапіляри, які склалися із світлих, набряклих ендотеліоцитів. Перекапілярний простір був розширеним, 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.

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 (рис. 4).

На 14-ту добу експерименту ультраструктура ендотеліоцитів капілярів щурів контрольної групи, порівняно із 7-ю добою дослідження, не змінювалась. Лише на деяких ділянках внаслідок скупчення хроматину втрачалася двоконтурність мембрани.

Але на електроннограмах були відмічені зони проліферації недиференційованих клітин, які склалися з незначної кількості клітин, що нагадували молоді ендотеліоцити та значної кількості макрофагів (рис. 5).

Гістологічна картина біоптатів м'язової тканини особливо не змінювалась, однак необхідно відмітити наявність вогнищ переваскулярної активності макрофагів та гістоцитів (рис. 6).

Наприкінці дослідження у тварин першої (дослідної) групи, спостерігалась інтенсифікація процесів ангиогенезу з активним формуванням молодих ендотеліоцитів та некапілярної сітки (рис. 7).

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.

Чисельні піноцитозні бульбашки розташовувалися переважно поблизу внутрішньої поверхні цитоплазматичної мембрани. Виявлялась значна кількість мікрофібрил та мікрофіламентів. Частина піноцитозних бульбашок збільшувалась у розмірах та утворювала великі вакуолі.

У той же час аналіз представлених електроннограм другої групи свідчив про значне зростання (порівняно з 14-ю добою експерименту) кількості недиференційованих макрофагів.

Значною мірою макрофаги виглядали набряклими, у них розташовувалися деструктивно змінені мітохондрії, вакуолі, мікротрубочки та мікрофіламенти. Пластинчастий комплекс складався з дещо розширених цистерн та вакуолей. У цитоплазмі траплялася значна кількість фібрилярних та мієлінових утворень, ліпофусцину та дрібно нідздрюватих вакуолярних структур. Рівень складчастості ядерної мембрани макрофагів незначно коливався.

Були наявні пори ядерної оболонки, котрі поєднували вміст цитоплазми та нуклеоплазми. Окрім того, у цитоплазмі були наявними пучки найтонших цитоплазматичних волоконць, мультивезикулярні тільця, везикули різного розміру та ліпідні вкраплення. Пластинчастий комплекс, як правило, був представлений плоскими цистернами та дрібними бульбашками. Розширені цистерни пластинчастого комплексу або його редукція траплялися рідко (рис. 8).

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

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 змінювались.

Висновки

1. Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки людини в ішемізовану м'язову тканину щура призводить до активності процесів ангиогенезу.

2. Перспективним вбачається дослідження методу клітинної трансплантації, а саме введення стовбурових клітин фетальної печінки, у комплексному лікуванні хворих з ішемією кінцівок.

3. Трансплантовані стовбурові клітини в неуряжену ішемією м'язову тканину не змінюють її гістологічної структури та ультраструктури ендотеліоцитів капіляра, а перетворюються на макрофаги.

Перспективи подальших досліджень. Результати проведеного експериментального дослідження свідчать про те, що трансплантація ГСКФП в ішемізовану м'язову тканину призводить до індукції процесів ангиогенезу - появи не-ендотеліоцитів та формування первинної некапілярної сітки.

Література

1. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т.А. Князева // Вестн. Акад. мед. наук СССР. – 1974. – № 12. – С. 3-8.
2. 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.
3. Meta-analysis of popliteal-to-distal vein bypass grafts for critical ischemia / M. Albers, M. Romiti, F.C. Brochado-Neto [et al.] // J. Vasc. Surg. – 2006. – № 43 (3). – P. 498-503.
4. Structural and functional remodeling of skeletal muscle microvasculature is induced by simulated microgravity / M.D. Delp, P.N. Colleran, M.K. Wilkerson [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 278-299.
5. Laissy J.P. Imaging of the lower limb arteries: when, how and why? / J.P. Laissy, J.M. Pernes // J. Radiol. – 2004. – № 85. – P. 845-850.

ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КАПИЛЯРОВ И ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ И ИНТАКТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

*Р.В. Салютин, Д.Б. Домбровский, С.С. Паляница, В.А. Шаблій,
Р.Н. Борис, Г.С. Лобынцева, Е.В. Буслович*

Резюме. Изучена в эксперименте ультраструктура эндотелиальных клеток капилляра и гистологическая структура мышечной ткани на разных этапах после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток фетальной печени.

Доказано, что в условиях ишемии стволовые клетки фетальной печени стимулируют процессы ангиогенеза, а при трансплантации в интактную мышечную ткань гемопоэтические стволовые клетки дифференцируются в тканевые макрофаги, при этом не разрушая структуру мышечной ткани.

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

CHANGES OF THE CAPILLARY ENDOTHELIOCYTES AND THE HISTOLOGICAL STRUCTURE OF ISCHEMIZED AND INTACT MUSCULAR TISSUE UPON TRANSPLANTING HEMOPOIETIC STEM CELLS OF THE HUMAN FETAL LIVER IN AN EXPERIMENT IN VIVO

*R. V. Saliutin, D. B. Dombrovs'kyi, S. S. Palianytsia, V. A. Shablii,
R. M. Borys, H. S. Lobyntseva, O. V. Buslovych*

Abstract. The ultrastructure of the endothelial cells of the capillaries and the histological structure of the muscular tissue at different stages after transplanting hemopoietic stem cells of the fetal liver has been investigated in an experiment. It has been corroborated that under the conditions of the ischemia the stem cells of the fetal liver stimulate the processes of angiogenesis, whereas upon being transplanted into the intact muscular tissue the hemopoietic stem cells differentiate into tissue macrophages, without disturbing the structure of the muscular tissue in general.

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

Coordinating Center of Transplanting Organs,
Tissues and Cells of Ukraine's Ministry of Health Protection (Kyiv)

Рецензент – проф. Ф.В. Гринчук

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 1 (65). – P. 101-105

Надійшла до редакції 17.10.2012 року