



Ю. В. Поляченко, Р. В. Салютін

Національний інститут
хірургії та трансплантології
ім. О. О. Шалімова
АМН України, м. Київ

Координаційний центр
трансплантації органів, тканин
і клітин МОЗ України, м. Київ

© Ю. В. Поляченко, Р. В. Салютін

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕСІВ НЕОАНГІОГЕНЕЗУ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

Резюме. Проведено експериментальне дослідження на щурах з метою дослідження впливу трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки на процеси ангиогенезу в умовах змодельованої ішемії кінцівки. Результати проведеного імуногістохімічного дослідження та аналіз змін ультраструктурних характеристик ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини на етапах експерименту свідчили про безумовну стимуляцію процесів ангиогенезу в ішемізованій м'язовій тканині після клітинної трансплантації та перспективність використання методу клітинної терапії в комплексному лікуванні хворих із хронічною ішемією кінцівок.

Ключові слова: ішемія, ендотеліоцит, стовбурові клітини, фетальна печінка.

Вступ

Лікування хворих з оклюзійним ураженням периферичного (термінального) артеріального русла є актуальною і до кінця не вирішеною проблемою сучасної ангіології [4]. Відсоток незадовільних результатів після виконання реконструктивно-відновних втручань залишається достатньо високим, а у 40% хворих взагалі провести оперативне втручання неможливо у зв'язку з відсутністю анатомічних передумов [5].

Сьогодні все частіше з'являються дослідження з використання методу терапевтичного ангиогенезу у пацієнтів з «нереконструктабельним» ураженням судинного русла, в тому числі за рахунок трансплантації стовбурових клітин кісткового мозку [1, 3].

Однак клінічне використання кісткового мозку як джерела мезенхімальних стовбурових клітин проблематичне, оскільки процедура його отримання достатньо складна, і в результаті вдається зібрати малу кількість клітин.

Більш високу потенцію до стимуляції процесів ангиогенезу мають гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки людини 6—8 тижнів гестації, що експресують CD 34⁺, CD 38⁻, CD 45 Ra^{low}, CD 71^{low}, обумовлюючи теоретичне підґрунтя щодо застосування з метою стимуляції ангиогенезу за умов ішемії клітинних культур ембріонального походження.

Мета дослідження — дослідити за допомогою імуногістохімічних та електронно-мікроскопічних методів вплив трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки людини на процеси ангиогенезу за умов експериментальної ішемії кінцівки.

Матеріали та методи

Експеримент виконано на 65 інбредних самцях білих щурів, які перебували в стандартних

умовах віварію. Середня маса щурів становила $376,0 \pm 7,9$ г., вік $6,0 \pm 1,2$ місяця. На першому етапі дослідження усім тваринам під кетаміновим наркозом, у стерильних умовах змодельована ішемія нижньої кінцівки за методом Т. А. Князевої [2].

Надалі експериментальні тварини були розділені на 2 групи:

I група (контрольна) — 40 щурів, із змодельованою ішемією задньої кінцівки;

II група (дослідна) — 25 щурів, яким на 3 добу змодельованої ішемії виконана трансплантація ксеногенних стовбурових клітин: гемопоетичні клітини фетальної печінки людини 6—8 тижнів гестації з фенотипом CD 34⁺, CD 38⁻, CD 45 Ra^{low}, CD 71^{low} (кількість КУО-ГМ $140,0 \times 10^3$). Клітини вводили через шприць підфасціально смужкою по медіальній поверхні ішемізованого стегна.

У тварин контрольної групи дослідний матеріал (м'язову тканину) отримували з медіальної та латеральної поверхонь дослідного стегна на 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 та 25 добу після моделювання ішемії на кінцівці.

У тварин контрольної групи м'язи стегна вилучали на 5, 7, 14, 21 та 25 добу після моделювання ішемії на кінцівці, оскільки на 3 добу виконували клітинну трансплантацію.

Після отримання біопсійного матеріалу проводили імуногістохімічне (визначення експресії віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда) та електронно-мікроскопічне дослідження.

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз результатів електронно-мікроскопічного дослідження біоптатів м'язової тканини свідчив про те, що перші зміни ультраструктури ендотеліоцитів капілярів мають місце на 1—2 добу після моделювання ішемії. Спостерігали зменшення кількості мікрроворсинок, що свідчить про зниження активності трансендотеліального мі-

кропіоцитозу. Комплекс Гольджі фактично був відсутній, плазматична мембрана пошкоджена.

Велика кількість ендотеліоцитів були набухлими, вакуолізованими, що свідчило про різке порушення водно-електролітного балансу клітин та функції їх цитоскелету та призводило до неспроможності забезпечити повноцінний ендоекзоцитоз та наступну їх деструкцію.

До 5—7 добу експериментальної ішемії в ендотеліоцитах були наявними дегенеративно-дистрофічні зміни, про що свідчили поодинокі вільні рибосоми, плоский та дрібно-везикулярний пластинчастий комплекс, різко просвітлений матрикс.

Мітохондрії мали нетипову структуру та містили нечисленні кристи. Наслідком підвищення проникності судинної стінки був субендотеліальний набряк із відшаруванням ендотеліальних острівців.

На 14 добу експерименту у щурів контрольної групи поглиблювалися дегенеративні процеси, що проявлялось у вигляді різних змін мітохондріальної системи: дисконкомплексції і розпрямлення крист, дисоціації їх мембран. Звертала на себе увагу деструкція пластинчастого комплексу у вигляді плоских цистерн і дрібних везикул, часто розташованих компактно поблизу ядра.

Контури цитоплазми клітин, що контактує з базальним шаром були нерівними, цитоплазматичні відростки неглибоко вдавалися у базальний шар.

Наприкінці дослідження (22—25 доба експерименту) у тварин контрольної групи просвіт капілярів був звужений внаслідок набряку ендотеліоцитів або, навпаки, розширений, заповнений еритроцитами, що свідчило про виражені застійні явища на рівні мікросудин.

У значній кількості капілярів просвіт був заповнений цитоплазматичним детритом десквамованих клітин або стиснутим сполучною тканиною, при цьому перикапілярний простір був заповнений колагеновими волокнами (рис. 1).

Просвітлена цитоплазма ендотеліоцитів поєднувалася зі зменшенням кількості мітохондрій, останні мали невеликі розміри і неправильну форму, з фрагментацією та деструкцією крист.

Відзначалося розширення каналців ендоплазматичної мережі та зруйнований комплекс Гольджі. Люмінальна поверхня ендотеліоцитів практично не містила мікроворсинок, окремі ендотеліоцити мали поодинокі ліпосоми.

Однак необхідно зазначити, що на фоні деструктивних явищ в ендотелії з'являлися недостатньо диференційовані (молоді), порівняльно електроннощільні ендотеліоцити, з наявністю виростів та інвагінацій, великого гомогенізованого ядра, значною кількістю рибосом та полісом (рис. 2).

Параметри та імуногістохімічні характеристики віментину, колагену IV типу і фактору Вілльбранда були виражені нерівномірно та змінювались згідно з динамікою ішемічного процесу.

Найбільш виражена експресія віментину в міжм'язових волокнах, які оточують судинні пучки, а також в мембранах стінки судин венозного і артеріального типів, спостерігалась на 7—14 добу змодельованої ішемії (рис. 3).

Окрім того, на тлі дистрофії і деструкції міопласту були виявлені вогнища фрагментації ме-

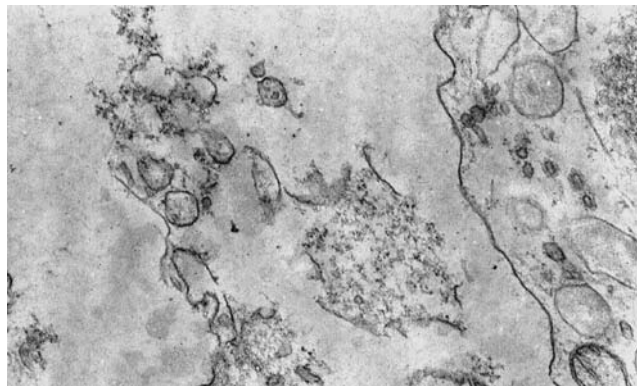


Рис. 1. Контрольна група. 25-та доба змодельованої ішемії. Десквамація фрагментів цитоплазми в просвіт капіляру. $\times 28\,000$

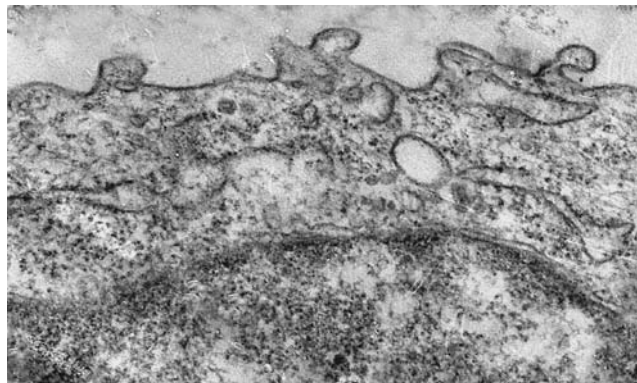


Рис. 2. Незрілий ендотеліоцит неокапіляру. $\times 28\,000$

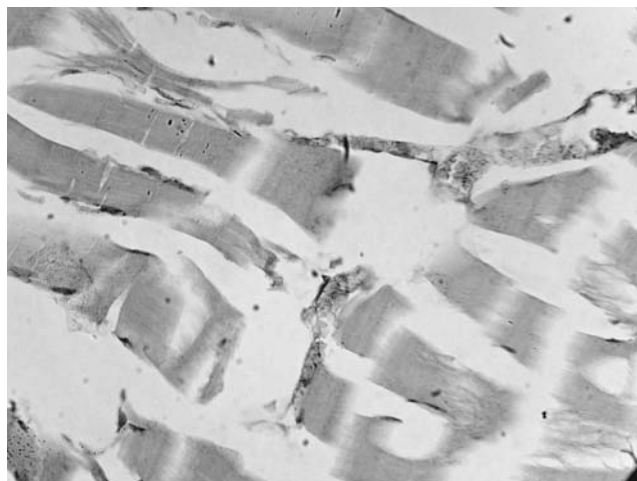


Рис. 3. Сьома доба ішемії. Експресія віментину в перимізії докола судин. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 20.



зенхімальних структур, які зменшувалися і зникали до 22—25 доби після моделювання ішемії.

Експресія колагену IV типу на 7—14 добу ішемії була найбільш вираженою в стінці повнокровних артеріальних судин та ділянках розволокнутої стінки вени.

Імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, особливо була виражена на 2 і 7 добу експериментальної ішемії в повнокровних судинах ендомізію та перимізію (рис. 4).

Таким чином, починаючи вже з 1—2 доби експерименту, ішемічне ураження призводить до деструктивного перетворення ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини, яке характеризується дезорганізацією внутрішньоклітинних органел та руйнацією базальної мембрани клітини. Фактич-

но до 22—25 доби експерименту ультраструктура ендотеліоцитів капілярів зруйнована, а просвіт капілярів obtурований клітинним цитоплазматичним детритом.

Дещо збільшена експресія фактора Віллебранда та колагену IV типу, на 2—7 добу може свідчити як про незначну короткотривалу регенераторно-компенсаторну реакцію ендотелію на ішемічне ураження, так і на викид досліджуваних маркерів із зруйнованих ендотеліоцитів.

У тварин дослідної групи на 2—4 добу після клітинної трансплантації (5—7 доба експериментальної ішемії) фіксували ознаки неангіогенезу, а саме — наявність молодих ендотеліоцитів з різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел, що формували первинний неокапіляр. Нові ендотеліоцитоподібні клітини мали збіль-

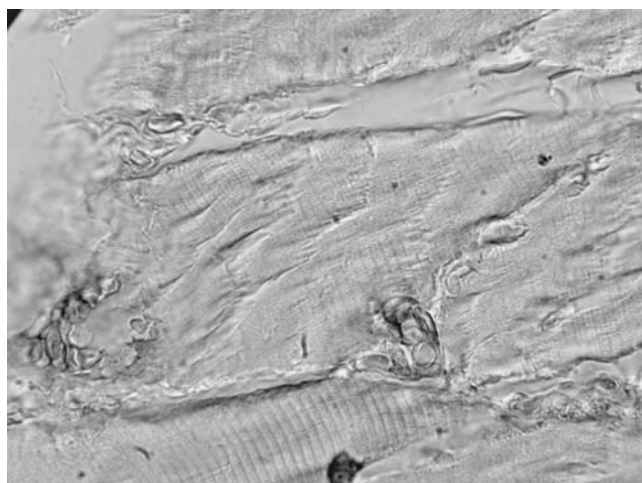


Рис. 4. Контрольна група. Друга доба ішемії. Експресія фактора Віллебранда на тлі повнокров'я капілярів і судин венозного типу, стази еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10. Об. 40.



Рис. 6. 22-га 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 $\times 400$

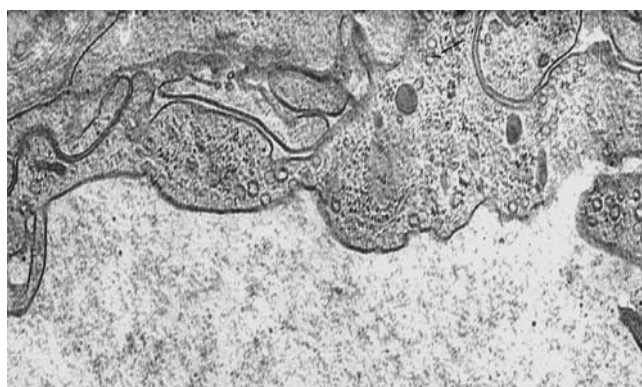


Рис. 5. Ендотелій неокапіляру з піноцитозними бульбашками та наявністю гранул Вейбеля—Палладе. $\times 20000$

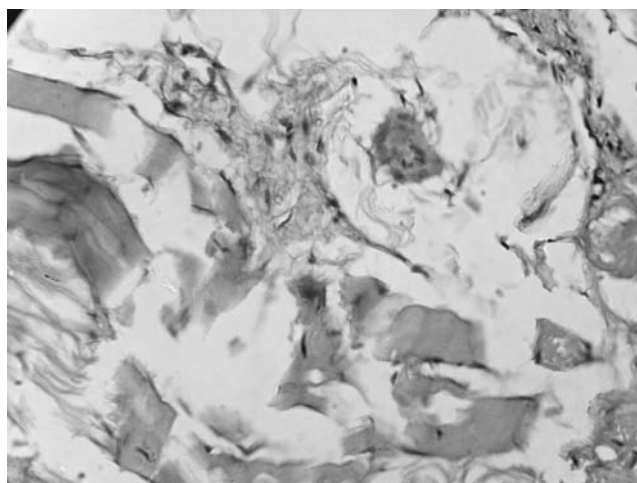


Рис. 7. Дослідна група. 14-та доба експерименту. Експресія віментину в судинних структурах, що формуються. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія $\times 400$



шене ядро, контуровані структури цитоплазматичного матриксу, вільні рибосоми та поодинокі піноцитозні везикули. У цитоплазмі виявлялись мітохондрії з нормальною щільністю, контрастним профілем зернистої ендоплазматичної сітки, мікротрубочки, множинні рибосоми та тільця Вейбеля—Палладе, які є маркерами неоангіогенезу є синтезованим фактором Віллібранда (рис. 5).

Структура первинних неокапілярів характеризувалась мозаїчністю, що свідчить про їхню поліфункціональність.

На 14 добу експерименту ендотеліоцити щурів дослідної групи мали ознаки значної мітотичної та функціональної активності.

Лише у деяких клітинах зберігалась гіпоплазія структурних елементів пластинчастого комплексу та ознаки набряку ендотеліоцитів. Чітко виявлялись функціонуючі неокапіляри, які склалися зі світлих набряклих ендотеліоцитів.

До 22—25 доби після введення гемопоетичних стовбурових клітин фіксували інтенсифікацію процесів ангіогенезу з активним формуванням молодих ендотеліоцитів та некапілярної сітки.

У поодиноких випадках спостерігались зони деструкції цитоплазми старих ушкоджених ендотеліоцитів — з люмінальної поверхні відбувалось злушення мікрворосинок у просвіт капіляру.

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження свідчив про те, що у щурів дослідної групи вже на 3 добу після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки в ендотеліальних клітинах спостерігалась помірна експресія фактора Віллібранда, яка збільшувалась в наступні терміни дослідження.

На 22—25 добу після клітинної трансплантації, мала місце виражена експресія фактора Віллібранда в новоутворених судинах, які розташовувались в ендомізії та вогнищах міопласту, а також в між'язових волокнах у вигляді первинної капілярної мережі (рис. 6).

З 7—14 доби експерименту фіксували ознаки активності неоангіогенезу: значна експресія віментину в судинних структурах свідчила про формування неокапіляру (рис. 7).

Процес неоангіогенезу підтверджувався результатами дослідження експресії колагену IV ти-

пу, який переважно локалізувався в мембранних структурах нових судин та судинних пучків, а також у вогнищах регенерації.

Отже, трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки в ішемізовану м'язову тканину приводить до активації ангіогенезу, а саме: вже на 2—4 добу після введення стовбурових клітин з'являються молоді ендотеліоцити, мають місце ознаки формування первинних капілярів та їх активне функціонування вже на 19 добу після клітинної трансплантації. Процеси неоангіогенезу, які були визначені за допомогою електронно-мікроскопічного дослідження, підтверджувались результатами імуногістохімічного аналізу — тенденційним поступовим збільшенням експресії фактора Віллібранда, віментину та основного будівельного матеріалу базальної мембрани капіляру — колагену IV типу.

Можливо припустити, що трансплантація стовбурових клітин фетальної печінки сприяє відновленню зруйнованої ішемічним станом мікроциркуляторної мережі м'язової тканини як за рахунок стимуляції власних регенераторно-компенсаторних механізмів, так і за рахунок диференціації стовбурових клітин в первинні ендотеліоцити, з яких і формується неокапіляр.

Висновки

1. Ішемічне ураження призводить до прогресуючих деструктивних змін ультраструктури ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини та порушення мікроциркуляторних процесів (за рахунок облітерації мікросудин клітинним детритом), що підтверджується результатами електронно-мікроскопічного та імуногістохімічного досліджень.

2. Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки приводить до стимуляції процесів ангіогенезу — ранній появи молодих ендотеліоцитів з тільцями Вейбеля—Палладе та активному формуванню функціонуючих неокапілярів.

3. Стимуляція процесів ангіогенезу, яка спостерігається після клітинної трансплантації в ішемізованій м'язовій тканині, свідчить про перспективу застосування даного методу лікування у 44 хворих з критичною ішемією кінцівок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дрюк Н.Ф. Непрямые методы реваскуляризации при хронической критической ишемии как альтернатива ампутации / Н.Ф. Дрюк, А.В. Самсонов // Праці XX з'їзду хірургів України. — Тернопіль, 2002. — С. 591—593.
2. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т.А. Князева // Вестн. акад. мед. наук СССР. — 1974. — № 12. — С. 3—8.
3. Baumgartner I. Lessons learned from human gene therapy in patients with chronic critical limb ischemia /

I. Baumgartner // J. Invasive Cardiol. — 2001. — Vol. 13, № 4. — P. 330—332
4. Pell J.P. Epidemiology of critical limb ischaemia / J. P. Pell, F. G. R. Fowkes // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2005. — Vol. 6. — № 2. — P. 23—29.
5. Wasiak K. Surgical results of leg amputation according to Ghormley's technique in the treatment of chronic lower limb ischaemia / K. Wasiak, P. M. Paczkowski, J. M. Garlicki // Acta Chir. Belg. — 2006. — № 106(1). — P. 52—56.



ИММУНОГИСТОХИ-
МИЧЕСКАЯ И УЛЬТРА-
СТРУКТУРНАЯ ХАРАК-
ТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССОВ
НЕОАНГИОГЕНЕЗУ ПОСЛЕ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМО-
ПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕ-
НИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИ-
МЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

*Ю. В. Поляченко,
Р. В. Салютин*

IMMUNOHISTOCHEMICAL
AND ULTRASTRUCTURAL
CHARACTERISTICS
OF THE PROCESSES
OF NEOANGIOGENESIS
AFTER TRANSPLANTATION
OF HEMATOPOIETIC
STEM CELLS OF FETAL
LIVER IN CONDITIONS
OF EXPERIMENTAL
ISCHEMIA

J. Polyachenko, R. Salyutin

Резюме. Проведено (на крысах) экспериментальное исследование с целью изучения влияния трансплантации гемопоэтических стволовых клеток фетальной печени на процессы ангиогенеза в условиях смоделированной ишемии конечности. Результаты проведенного иммуногистохимического исследования и анализ изменения ультраструктуры эндотелиоцитов капилляров мышечной ткани на этапах эксперимента свидетельствовали о безусловной стимуляции процессов ангиогенеза в ишемизированной мышечной ткани после клеточной трансплантации и перспективности использования метода клеточной терапии в комплексном лечении больных с хронической ишемией конечностей.

Ключевые слова: *ишемия, эндотелиоцит, стволовые клетки, фетальная печень.*

Summary. Experimental examination was done on rats to study the impact of transplantation of hematopoietic stem cells in fetal liver for angiogenesis processes in a simulated limb ischemia. The results of immunohistochemical examination and ultrastructural analysis of changes for characteristics of endothelial capillaries of muscle tissue at the stages of the experiment, indicating an absolute stimulation of angiogenesis processes in ischemic muscular tissue after cell transplantation and perspective of using the method of cell therapy in treatment of patients with chronic limb ischemia.

Key words: *ischemia, endotheliocyte, stem cells, fetal liver.*