



Л.В. Бабийчук, В.П. Невзоров,
О.Ф. Невзорова, В.Г. Бабийчук

*Институт проблем
криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков*

*ГУ «Институт общей
и неотложной хирургии»
НАМНУ, г. Харьков*

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ АРХИТЕКТонику МИОКАРДА МОЛОДЫХ КРЫС С НЕВРОГЕННОЙ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Резюме. Установлено положительное влияние криоконсервированных гемопоэтические стволовых клеток кордовой крови на динамику восстановления типичной субмикроскопической организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых крыс после развития стойкой неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензии. Активируется биоэнергетическое обеспечение сократительной функции кардиомиоцитов. На 30 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови наблюдается существенное повышение метаболической и репаративной активности в кардиомиоцитах и эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда молодых крыс. Структурным подтверждением выше изложенного являются позитивные перестройки внутриклеточных мембран, появление в саркоплазме кардиомиоцитов делящихся форм митохондрий, увеличение количества полисом, рибосом и гранул гликогена.

Ключевые слова: *ультраструктура миокарда, митохондриальная дисфункция, артериальная гипертензия, кардиомиоциты, криоконсервированные гемопоэтические стволовые клетки кордовой крови.*

Введение

К настоящему времени получено большое количество данных, свидетельствующих о роли нарушений нейрогуморальной регуляции кровообращения в патогенезе артериальной гипертензии (АГ) [1, 5]. Наиболее значимыми нейрогуморальными системами регуляции сосудистого тонуса являются: симпато-адреналовая система, ренин-ангиотензиновая система, альдостерон, калликреин-кининовая система, эндотелин-1, система оксида азота (NO).

Особый интерес представляет возможность коррекции выше описанных нарушений с помощью применения препаратов, полученных из кордовой крови [7]. Благодаря своему биохимическому составу кордовая кровь является уникальной субстанцией с разнонаправленной биологической активностью [3].

В научной и клинической практике накоплена значительная информация о положительном влиянии кордовой крови, как на разные органы, системы, клеточные культуры, так и на организм в целом [4, 6].

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на белых молодых половозрелых крысах-самцах линии Вистар

(возраст 6–8 месяцев). Все животные были разделены на три группы:

- первая группа – контрольные (интактные) крысы;
- вторая группа – животные, которым моделировалась неврогенная артериальная гипертензия;
- третья группа – животные с артериальной гипертензией после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови.

Эксперименты на животных проведены в соответствии с Общими принципами работы на животных, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985).

Моделирование неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензии проводилось по методу [2], до получения стойких повышенных цифр АД, путем комплексного, периодического воздействия на организм животных различными видами раздражителей: светового, звукового, электрического.

Животным с неврогенной артериальной гипертензией вводили криоконсервированные



гемопоэтические стволовые клетки кордовой крови человека.

Препарат стволовых гемопоэтических клеток кордовой (пуповинной) крови человека представляет собой взвесь криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови в аутоплазме с концентрацией стволовых CD34⁺ клеток 2-4x10⁵/мл. Сохранность ядродержащих CD45⁺ и стволовых CD34⁺ клеток, а также их жизнеспособность после криоконсервирования определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (BD) (США) с использованием реагентов BD по международному ISHAGE протоколу.

Размороженный препарат, содержащий гемопоэтические стволовые клетки в аутоплазме вводили в дозе 1x10⁵ CD34⁺ клеток на килограмм веса. Препарат доводили до объема 1 мл аутоплазмы. Препараты вводились внутривенно.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации на 3, 7 и 30 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови на фоне артериальной гипертензии и производили забор кусочков ткани миокарда для электронно-микроскопического исследования.

Кусочки миокарда для предварительной фиксации помещали в глутарово-формальдегидный фиксатор на 5-6 часов, затем переносили в 1 % забуференный раствор четырехокси осмия на 3-4 часа при температуре 4 °С для окончательной ее фиксации. Ткань обезживали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, пропитывали и заключали в блоки в смеси эпоксидных смол (эпон-аралдит) по стандартным методикам. Полимеризацию проводили в термостате при 60 °С в течении двух суток.

Из полученных блоков, на ультрамикротоме УМТП-3М, изготавливали ультратонкие срезы, монтировали их на электролитические сеточки и, после контрастирования цитратом свинца, изучали под электронным микроскопом ЭМВ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 кв. Контролем качества гистологической обработки служили кусочки миокарда интактных крыс.

Результаты исследования и их обсуждение

Электронно-микроскопическое исследование кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых интактных крыс показало, что ультраструктурная организация этих клеток находилась в пределах возрастных особенностей.

На 3 сутки после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови молодым крысам с не-

врожденной артериальной гипертензией ультраструктура клеток миокарда соответствовала таковой у экспериментальных животных на 30 сутки после развития стойкой гипертензии без введения препарата.

Сохранялась конденсация хроматина на ядерной мембране кардиомиоцитов. Матрикс ядра имел низкую электронную плотность. Вместе с тем, в перинуклеарной области саркоплазмы несколько увеличивалось количество саркоплазматических органелл.

Уменьшалась степень просветления саркоплазмы, увеличивалось количество митохондрий и крист в них. Матрикс митохондрий приобретал мелкогранулярное строение и среднюю электронную плотность. Снижалась степень разрыхления внутриклеточных мембранных компонентов и набухания митохондрий, уменьшалось количество очагов лизиса наружных мембран и крист. В саркоплазме возрастало количество свободных рибосом, полисом и гранул гликогена. Наблюдалась гипертрофия пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи, однако дезорганизация гладких его мембран сохранялась. Цистерны саркоплазматического ретикулума были значительно расширены и электронно-прозрачны.

В саркоплазме кардиомиоцитов встречались мелкие включения липидов (рис. 1), появлялись, делящиеся формы митохондрий (рис. 2).

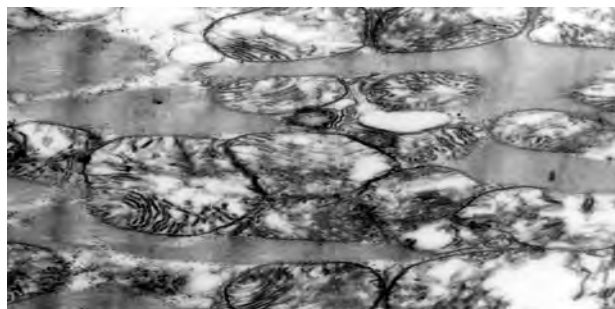


Рис. 1. Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда молодых крыс с артериальной гипертензией на 3 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. Включения липидов в саркоплазме кардиомиоцитов. × 30000. Контрастировано цитратом свинца.

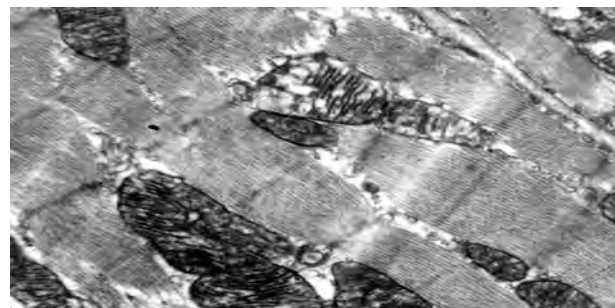


Рис. 2. Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда молодых крыс с артериальной гипертензией на 3 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. Митохондрии с перегородками. × 31000. Контрастировано цитратом свинца.

В этой группе экспериментальных животных ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров оставалась дистрофически изменённой, но в цитоплазме существенно уменьшалось количество очагов лизиса мембранных структур.

Ядра эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда содержали просветлённый матрикс и конденсированный хроматин. Перинуклеарные пространства были неравномерно расширены. Несколько уменьшилась степень разрыхления ядерной мембраны и количество очагов её лизиса.

Митохондрии обладали электронно-прозрачным матриксом, разрыхлённой наружной мембраной и дезорганизованными кристами. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума сильно расширялись. На его мембранах наблюдалось небольшое количество рибосом. В цитоплазме отростков эндотелиоцитов несколько увеличивалось количество микропиноцитозных пузырьков (рис. 3).

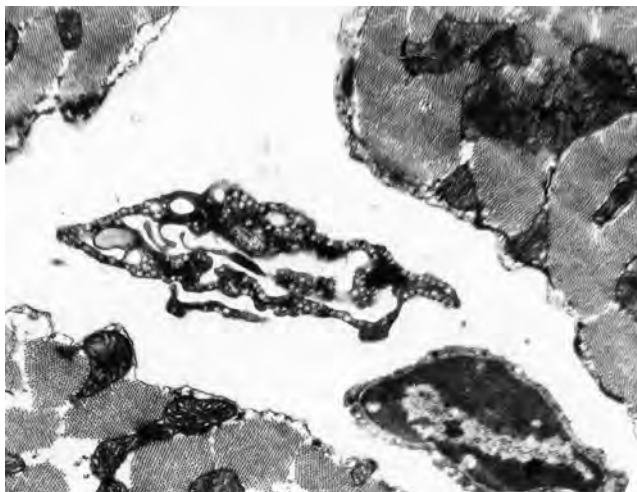


Рис. 3. Ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых крыс с артериальной гипертензией на 3 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. Многочисленные микропиноцитозные пузырьки в цитоплазме отростков эндотелиоцитов. $\times 37000$. Контрастировано цитратом свинца.

На 7 сутки после введения стволовых гемопоэтических клеток кордовой крови экспериментальным молодым животным с артериальной гипертензией наблюдались изменения субмикроскопической архитектоники органелл клеток миокарда характерные для повышения активности внутриклеточных метаболических процессов.

Существенно снижалась степень конденсации хроматина в ядре кардиомиоцитов. Большая часть гранул деконденсированного хроматина равномерно распределялась по площади среза ядра. Ядерная мембрана приобретала чётко контурированную структуру. Перинуклеарные пространства были равномерно рас-

ширены. Матрикс ядра оставался существенно просветлённым.

Наряду с этим, встречались кардиомиоциты с набухшими митохондриями, часть которых подвергалась очаговому лизису наружных мембран и крист. У значительного числа митохондрий возрастало количество крист, их матрикс обладал умеренной электронной плотностью и мелкозернистой структурой (рис. 4).

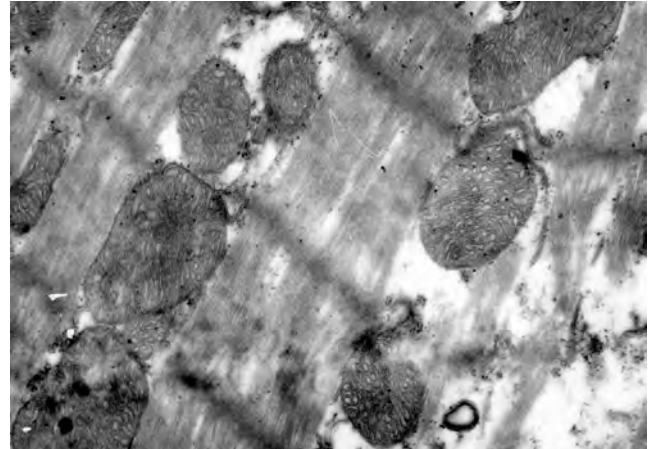


Рис. 4. Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда молодых крыс с артериальной гипертензией на 7 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. Митохондрии средней электронной плотности. $\times 36000$. Контрастировано цитратом свинца.

В препаратах встречались кардиомиоциты, в саркоплазме которых располагались делящиеся формы митохондрий, т.е. митохондрии имеющие «гантелевидную» форму и характерные перетяжки. Саркоплазма оставалась существенно просветлённой, в ней возрастало количество гранул гликогена, рибосом и полисом.

Цистерны саркоплазматического ретикулума и Т-системы умеренно расширялись. Пучки миофибрилл в кардиомиоцитах располагались параллельными рядами и имели поперечную исчерченность.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи гипертрофирован, его гладкие мембраны собраны в стопки, параллельно ориентированы и окружены большим числом мелких, электронно-прозрачных везикул.

Ядра эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых крыс имели удлинённую форму. Ядерная мембрана была умеренно разрыхлена, однако очаги её лизиса отсутствовали. Перинуклеарные пространства равномерно расширялись. В центральной области ядра образовывалась зона очень низкой электронной плотности. Глыбки конденсированного хроматина располагались вблизи ядерной мембраны. В ядрах эндотелиальных клеток иногда обнаруживались осмиофильные ядрышки.

Матрикс митохондрий имел мелкозернистую структуру и небольшое количество крист.



Очаги лизиса наружных мембран и крист встречались редко. В цитоплазме отростков эндотелиоцитов кровеносных капилляров существенно возрастало количество микропиноцитозных пузырьков. Цитоплазматическая мембрана не имела очагов лизиса, однако оставалась умеренно разрыхлённой, утолщенной и обладала повышенной степенью осмиофилии.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи умеренно гипертрофирован, в области его локализации отсутствовали, как вторичные лизосомы, так и включения липидов.

На 30 сутки после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови у молодых крыс с артериальной гипертензией ультраструктурная организация клеток миокарда в основном приобретает типичное строение.

Миофибриллы в кардиомиоцитах имели параллельную ориентацию и хорошо выраженную поперечную исчерченность. Ядра кардиомиоцитов содержали преимущественно деконденсированный хроматин, гранулы которого диффузно рассеяны по матриксу ядра. Ядерная мембрана чётко контурировалась, на ней отсутствовали очаги лизиса. Изредка в кардиомиоцитах определялись ядерные мембраны с очагами разрыхления. Перинуклеарные пространства сохраняли постоянную ширину на всём протяжении среза.

Митохондрии набухшие, с полиморфным матриксом, часть их имела мелко гранулярный матрикс, обладающий средней электронной плотностью. Многочисленные кристы были параллельно ориентированы, наружные мембраны митохондрий чётко контурированы. Отдельные митохондрии имели очаговое просветление матрикса и разрыхленные наружные мембраны и кристы (рис. 5).

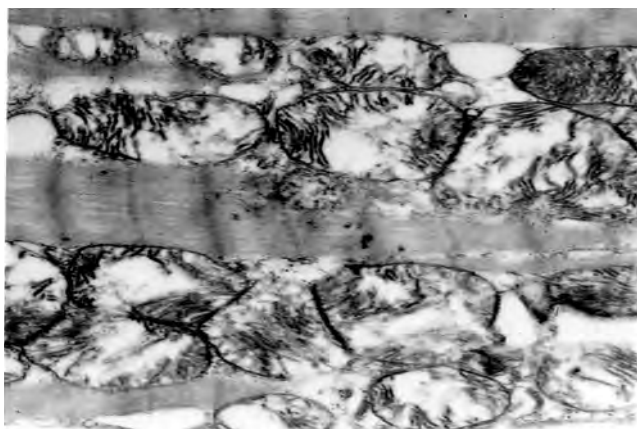


Рис. 5. Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда молодых крыс с артериальной гипертензией на 30 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. Очаговое просветление матрикса митохондрий. $\times 35000$. Контрастировано цитратом свинца.

Цистерны саркоплазматического ретикулама и Т-системы умеренно расширялись. По сравнению с предыдущими сроками экспериментальных наблюдений в саркоплазме кардиомиоцитов отсутствовали включения липидов, возрастало количество гранул гликогена, рибосом и полисом (рис. 6).

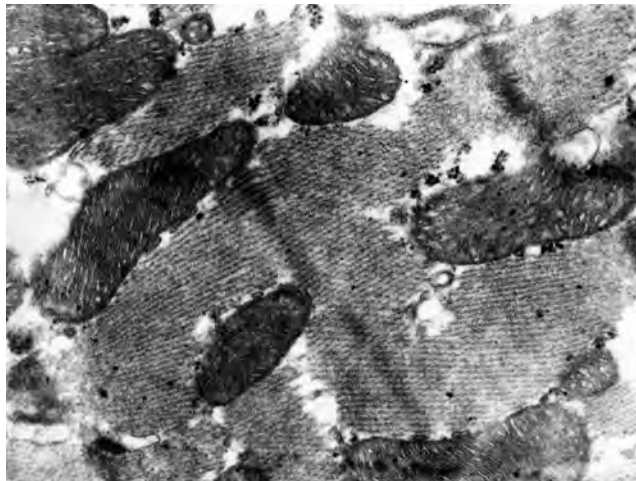


Рис. 6. Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда молодых крыс с артериальной гипертензией на 30 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. Гранулы гликогена в саркоплазме. $\times 32000$. Контрастировано цитратом свинца.

Следует отметить, что саркоплазма кардиомиоцитов сохраняла низкую электронную плотность, а саркоплазматическая мембрана оставалась несколько разрыхлённой.

Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда сохраняла черты умеренно протекающего дистрофического процесса.

Однако в ядрах резко снижалась степень конденсации хроматина, большая часть его переходила в неконденсированную форму. Отсутствовали деструкции наружных мембран и крист митохондрий, но при этом сохранялось их набухание. В цитоплазме отдельных эндотелиоцитов наблюдалась гиперплазия мембран гранулярного эндоплазматического ретикулама и гипертрофия пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи. Цитоплазматическая мембрана утолщена с единичными очагами лизиса. В цитоплазме отростков эндотелиальных клеток выявлялись многочисленные микропиноцитозные пузырьки (рис. 7).

Рассматривая динамику изменений субмикроскопической организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых крыс с неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензией, следует отметить, что на 3-7 сутки после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови наблюдалась тенденция к восстановлению их типичной ультраструктуры. Стабилизи-

ровалось биоэнергетическое обеспечение сократительной функции кардиомиоцитов, что структурно подтверждалось снижением степени набухания митохондрий и увеличением количества крист. В цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров появлялись многочисленные микропиноцитозные пузырьки, что является признаком повышения активности трансцеллюлярного транспорта.



Рис. 7. Ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых крыс с артериальной гипертензией на 30 сутки после введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. Многочисленные микропиноцитозные пузырьки в цитоплазме. $\times 38000$. Контрастировано цитратом свинца.

На 30 сутки после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови наблюдалось существенное повышение метаболической и репаративной активности в кардиомиоцитах и эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда. Структурно это подтверждалось, как позитив-

ными перестройками внутриклеточных мембран, так и появлением в саркоплазме кардиомиоцитов делящихся форм митохондрий и увеличением количества полисом, рибосом и гранул гликогена.

Выводы

1. В группе молодых экспериментальных животных с артериальной гипертензией на 3-7 сутки после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови наблюдается тенденция к восстановлению типичной ультраструктуры субмикроскопической организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров.

2. Нормализуется биоэнергетическое обеспечение сократительной функции кардиомиоцитов, что структурно подтверждается снижением степени набухания митохондрий и увеличением количества крист.

3. В цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда выявляются многочисленные микропиноцитозные пузырьки, что является признаком повышения активности трансцеллюлярного транспорта.

4. На 30 сутки после введения животным с артериальной гипертензией гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови отмечается существенное повышение метаболической и репаративной активности в кардиомиоцитах и эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда. Это структурно подтверждается позитивными перестройками внутриклеточных мембран, появлением в саркоплазме кардиомиоцитов делящихся форм митохондрий и увеличении количества полисом, рибосом и гранул гликогена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ланг Г.Ф. Гипертоническая болезнь / Г.Ф. Ланг // Л. «Медгиз». – 1950. – С. 459.
2. Шош Й. Неврогенная гипертония. Моделирование заболеваний / Й. Шош // – М.: Медицина. – 1981. – С. 246-247.
3. Cornetta K. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT) / K. Cornetta, M. Laughlin, S. Carter // Biol. Blood Marrow Transplant. – 1995. – № 11, Vol. 2. – P. 149-160.
4. Gluckman E. Hematopoietic reconstitution in a patient with Franconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling / E. Gluckman, H. A. Broxmeyer, A. D. Auerbach // N. Engl. J. Ved. – 1989. – Vol. 32, № 17. – P. 1174-1178.
5. Julius S. Sympathetic Overactivity in Hypertension / S. Julius, S. Nesbitt // Avingtarget. AmJ Hypertens. – 1996. – № 9. – P. 20.
6. Long G. D. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients / G. D. Long, M. Laughlin, B. Madan // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2003. – Vol. 9, № 12. – P. 772-780.
7. Roccanova L. The role of stem cells in the evolution of longevity and its application to tissue therapy / L. Roccanova, P. Ramphal // Tissue Cell. – 2003. – Vol. 35, № 1. – P. 79-81.



ВПЛИВ
КРІОКОНСЕРВОВАНИХ
ГЕМОПОЕТИЧНИХ
СЛОВБУРОВИХ КЛІТИН
КОРДОВОЇ КРОВІ НА
УЛЬТРАСТРУКТУРНУ
АРХІТЕКТОНІКУ
МІОКАРДА МОЛОДИХ
ЩУРІВ З НЕВРОГЕННОЮ
СТРЕС - ІНДУКОВАНОЮ
АРТЕРІАЛЬНОЮ
ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

*Л.В. Бабійчук, В.П. Невзоров,
О.Ф. Невзорова, В.Г. Бабійчук*

EFFECT OF
CRYOPRESERVED CORD
BLOOD HEMOPOIETIC
STEM CELLS ON
ULTRASTRUCTURAL
ARCHITECTURE OF
MYOCARDIUM OF YOUNG
RATS WITH NEUROGENIC
STRESS-INDUCED
ARTERIAL HYPERTENSION

*L.V. Babychuk, V.P. Nevzorov,
O.F. Nevzorova, V.G. Babychuk*

Резюме. Встановлено, позитивний вплив кріоконсервованих гемопоетичних стовбурових клітин кордової крові на динаміку відновлення типової субмікроскопічної організації кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарду молодих щурів після розвитку стійкої неврогенної стрес-індукованої артеріальної гіпертензії. Активується біоенергетичне забезпечення скорочувальної функції кардіоміоцитів. На 30 добу після введення гемопоетичних стовбурових клітин кордової крові спостерігається істотне підвищення метаболічної та репаративної активності в кардіоміоцитах і ендотеліоцитах кровоносних капілярів міокарду молодих щурів. Структурним підтвердженням вище викладеного є позитивні перебудови внутрішньоклітинних мембран, поява в саркоплазмі кардіоміоцитів ділящих форм мітохондрій, збільшення кількості полісом, рибосом і гранул глікогену.

Ключові слова: *ультраструктура міокарду, мітохондріальна дисфункція, артеріальна гіпертензія, кардіоміоцити, кріоконсервовані гемопоетичні стовбурові клітини кордової крові.*

Summary. Positive effect of cryopreserved cord blood hemopoietic stem cells on the dynamics of recovery of typical submicroscopic organization of cardiomyocytes and endotheliocytes of myocardium blood capillaries of young rats after development of stable neurogenic stress-induced arterial hypertension has been found. There is activated bioenergetic provision of contractile function of cardiomyocytes. To the 30th day after introduction of cord blood hemopoietic stem cells there is observed a significant rise in metabolic and reparative activities in cardiomyocytes and endotheliocytes of young rats' myocardium blood capillaries. Structural confirmation of above mentioned is positive re-arrangements of intracellular membranes, appearance in sarcoplasm of cardiomyocytes of dividing forms of mitochondria, increased number of polysomes, ribosomes and granules of glycogen.

Key words: *myocardium ultrastructure, mitochondrial dysfunction, arterial hypertension, cardiomyocytes, cryopreserved cord blood hemopoietic stem cells.*