

ГІСТОЛОГІЧНА СТРУКТУРА М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА АНГІОГЕНЕЗУ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ АСПІРАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

©Р. В. Салютін¹, Д. Б. Домбровський², С. С. Паляниця¹, Л. А. Панченко¹, В. М. Сірман¹, В. А. Шаблій¹

Координатор центр трансплантації органів тканин і клітин МОЗ України¹

Буковинська обласна клінічна лікарня²

РЕЗЮМЕ. Проведено експериментальне дослідження з метою вивчення перспективності використання клітинних препаратів ембріонального походження для активації процесів ангіогенезу в умовах ішемії.

З використанням гістологічних та імуногістохімічних методів доведена активація процесів неоангіогенезу de novo після трансплантації стовбурових клітин фетальної печінки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ішемія, гістологія, імуногістохімія, стовбурові клітини.

Вступ. Не зважаючи на досягнення сучасної ангіохіургії, відсоток незадовільних результатів після виконання реконструктивно-відновливих втручань у хворих з оклюзійним та облітеруючим ураженням периферійного артеріального русла залишається достатньо високим, а у 40 % хворих виконати оперативне втручання взагалі неможливо, у зв'язку з відсутністю анатомічних передумов [1, 2]. Все частіше сьогодні з'являються дослідження щодо використання методу терапевтичного ангіогенезу у пацієнтів з «нереконструкуванням» ураженням судинного русла, в тому числі за рахунок трансплантації стовбурових клітин кісткового мозку [3, 4].

Однак клінічне використання кісткового мозку в якості джерела мезенхімальних стовбурових клітин проблематичне, оскільки процедура його отримання достатньо складна і в результаті вдається зібрати малу кількість клітин, що поміж тим мають низький потенціал трансдиференціювання дорослих мезенхімальних клітин [5]. Більш високі потенції до стимуляції процесів ангіогенезу мають гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки людини 6–8 тижнів гестації, що експресують CD 34+, CD 38+, CD 45Ra^{low}, CD 71^{low}, що обумовлюють теоретичне підґрунтя щодо їх застосування з метою стимуляції ангіогенезу за умов ішемії.

Мета дослідження – дослідити за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів особливості процесів ангіогенезу після трансплантації аспірату кісткового мозку та гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки за умов ішемії в експерименті.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження виконано на 90 нелінійних білих шурах, які перебували у стандартних умовах віварію. Середня маса щурів складала ($372,0 \pm 7,6$) г., вік – ($6,0 \pm 1,2$) місяці. Хірургічні втручання проводились

під кетаміновим наркозом з дотриманням всіх умов асептики та антисептика.

Тварини були поділені на 3 групи: I (контрольна) група – тварини, у яких була змодельована ішемія кінцівки. Моделювання ішемії задньої кінцівки у щура проводили за методом Т. А. Князевої [6]. II група – тварини, яким на 3 добу експериментальної ішемії в м'язі стегна вводили алогенний аспірат кісткового мозку, одержаний з діафізів стегнових кісток. III група – тварини, яким на фоні ішемії кінцівки (3 доба змодельованої ішемії) були введені підфасціально смужкою по медіальній поверхні стегна ГСКФП людини 6–8 тижнів гестації.

У тварин I групи дослідний матеріал (м'язи стегна з медіальної та латеральної поверхні дослідної кінцівки) отримували на 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 та 25 добу після моделювання ішемії на кінцівці. Біопсію м'язової тканини у щурів II та III груп виконували на 2, 4, 11, 19, 22 після клітинної трансплантації, тобто на 5, 7, 14, 21 та 25 добу після моделювання ішемії.

Надалі отримані біоптати м'язової тканини були досліджені за допомогою імуногістохімічних (визначалась експресія віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда) та гістологічних методів (забарвлення гематоксиліном-еозином та пікрофуксином по Ван-Гізон).

Результати й обговорення. На 1–5 добу змодельованої ішемії у всіх експериментальних тварин спостерігали розлади кровообігу та зміни реологічних властивостей крові, особливо в венозних судинах. На першу, а особливо на другу та третю добу спостереження в венозних судинах фіксували виражене вогнищеве повнокров'я і стаз еритроцитів, що мало місце в 90 % досліджених препаратів (рис. 1).

Фіксували наявність периваскулярного набряку, частина ендотеліальних клітин судин була

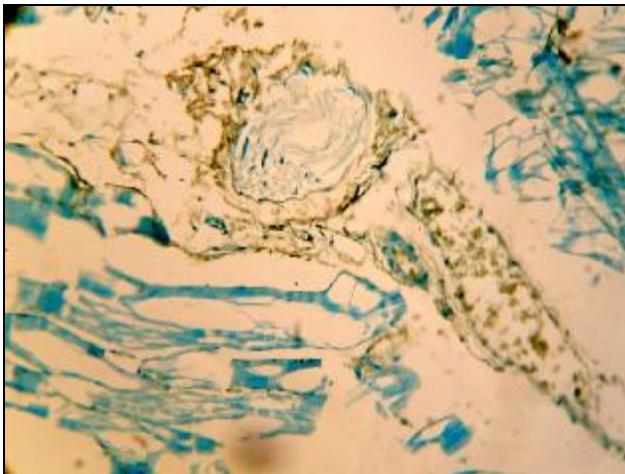


Рис.1. Група I. Сьома доба ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептovідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 20.

некротизованою та злущеною. Судинна стінка нерівномірно інфільтрована макрофагами та лімфоцитами. Втрачалася окресленість м'язових волокон, еозинофілія та з'являлася базофілія. Відмічалася активація гістіоцитів, особливо макрофагів.

На 7–14 доби спостереження відмічали прогресивне збільшення деструктивних процесів в м'язових волокнах з наявністю ділянок некрозу, ліпідної дистрофії, вакуолізації та набряку. Спостерігали прогресуючу десквамацію та некроз ендотеліальних клітин з наступною облітерацією просвіту судин. Зустрічалось розшарування і набряк судинної стінки, на тлі набряку міжм'язових ділянок спостерігали крововиливи. На 14 добу експериментальної ішемії в деяких біоптатах спостерігали ділянки лімфо-макрофагальної гістіоцитарної реакції в 35 % випадків з наступною тенденцією до зменшення.

На 21–25 доби експериментальної ішемії в більшості спостережень повнокров'я та стази були менш вираженими – 20 % випадків. Однак з'являлися фібропластичні зміни стінки судин, спостерігалися потовщення та фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучної тканини. Параметри та імуногістохімічні характеристики віментину, колагену IV типу і фактора Віллебранда були виражені нерівномірно та змінювались згідно з динамікою ішемічного процесу.

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

Найбільш виражену експресію віментину в міжм'язових волокнах, які оточують судинні пучки, а також в мембраних стінки судин венозного і ар-

теріального типів спостерігали на 7–14 добу ішемії. У цей термін в стінці повнокровних артеріальних судин та ділянках розшарованої стінки венул була найбільш вираженою експресія колагену IV типу (рис. 2).

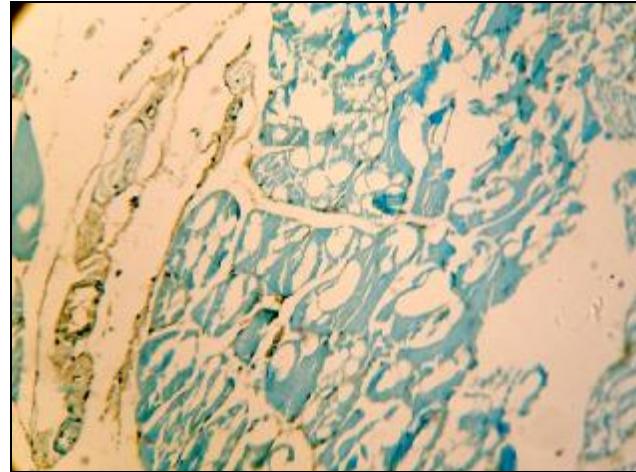


Рис. 2. Група I. Двадцять п'ята доба. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептovідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 20.

Таким чином, з 2 до 14 доби ішемічного ураження в м'язовій тканині фіксуються значні патологічні зміни, а саме – розлад кровообігу в судинах, особливо венозного типу, деструкція та дистрофічне перетворення м'язових волокон. Прояв дегенеративно-дистрофічних змін в м'язовій тканині та капілярні мережі на 20–25 доби експерименту дещо зменшувався, проте з'являлося виражене фіброзування і склероз стінки судин в перимізії.

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

В біоптатах тварин II групи на 2–4 і 11–19 добу після трансплантації аспірату кісткового мозку, в тканинах м'язового симпласту та судинах, які розташовані в проміжній тканині, у всіх спостереженнях переважали деструктивно-дистрофічні процеси. Патологічні зміни характеризуються нерівномірністю, мають вогнищеву або дифузну структуру. Okрім того, дистрофія м'язових волокон супроводжується зникненням поперечної послугованисті та локальною гомогенізацією.

В 20 % спостережень фіксували наявність в перимізії поодиноких ділянок лімфо-макрофагальної інфільтрації на тлі ліпідної дистрофії м'язових волокон (рис. 3).

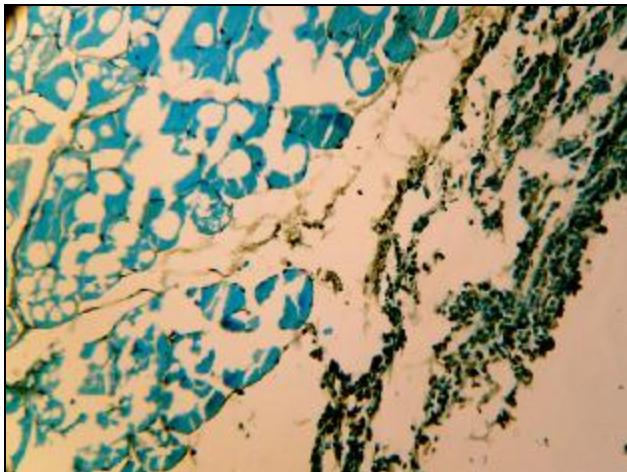


Рис. 3. II група. Позитивна експресія колагену IV типу в ніжноволокнистих структурах у вогнищі лімфо-макрофагальної інфільтрації. Непрямий стрептovідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 10.

На 11–22 добу після введення аспірату кісткового мозку в досліджуваних біоптатах фіксували наявність нерівномірного повнокров'я судин та вираженого вогнищевого периваскулярного набряку (рис. 4).

Поряд з патологічними змінами спостерігали ознаки регенераторних процесів та поступове зменшення дистрофічних проявів в м'язових симпластах. На 19 добу після трансплантації на гістохімічному рівні фіксували наявність компенсаторної реакції. Особливо це спостерігалось при вивченні фактора Віллебранда, який проявлявся у вигляді позитивної реакції в мезенхімальних структурах перимізію

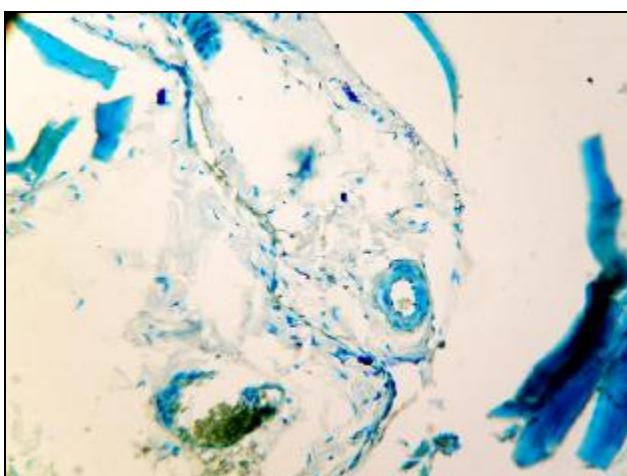


Рис. 4. II група. Виражений периваскулярний набряк та вогнища слабкої експресії віментину на 17 добу експерименту. Непрямий стрептovідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 10.

та зрідка ендомізію та у незрілих клітинних утвореннях, які розташувались поодинокими групами, формуючи “нове” судинне русло (рис. 5). При дослідженні біоптатів м'язової тканини, на 22 добу експерименту були виявлені розташовані інтрaperимезіально дрібні венулярні судини.

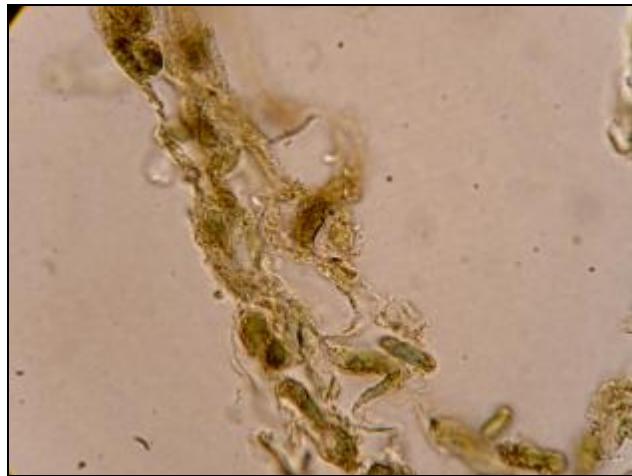


Рис. 5. II група. Експресія фактора Віллебранда на 19 добу після трансплантації в клітинних структурах перимізія, формування судинного русла. Непрямий стрептovідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40.

Дані проведеного гістологічного дослідження свідчать що, на 2–4 добу після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки в міопласті мали місце мозаїчні зміни – переважала кількість незмінених структур, які відповідали тканинним характеристикам інтактної м'язової тканини. На 11–19 добу спостерігали наявність невеликих вогнищ проліферуючих молодих клітинних форм фібробластів та макрофагальну реакцію.

Починаючи з 2 доби після трансплантації ГСКФП в ендотеліальних клітинах спостерігалась помірна експресія фактора Віллебранда, яка поступово збільшувалась, та на 19–22 доби після клітинної трансплантації спостерігалась виражена експресія фактора Віллебранда в новоутворених судинах, які розташувались в ендомізії та вогнищах міопласти, а також в міжм'язових волоках у вигляді первинної капілярної мережі.

З 4–11 доби експерименту фіксували активне прогресування процесів ангіогенезу, мало місце формування неокапіляра що підтверджувалось позитивною експресією віментину в судинних структурах (рис. 6).

Процес неоангіогенезу підтверджувався результатами дослідження експресії колагену IV типу, який переважно локалізувався в мембраних структурах нових судин та судинних пучків, а також у вогнищах регенерації.

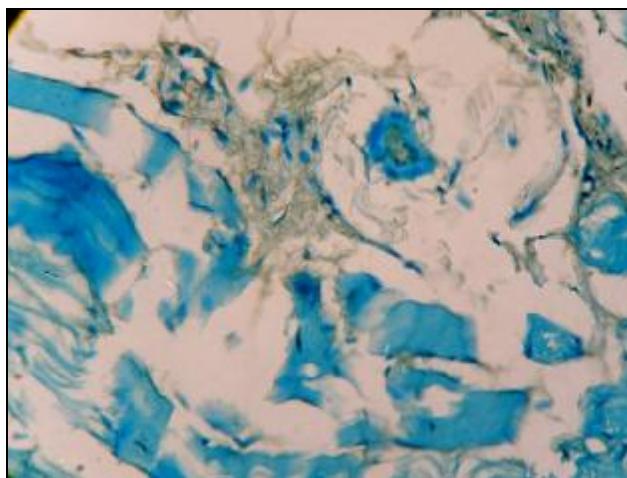


Рис. 6. III група. Експресія віментину в судинних структурах, що формуються. Непрямий стрептovідін-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія х 400.

Висновки. 1. Ішемічний стан призводить до істотної структурно-функціональної руйнації як самої м'язової тканини, так і капілярного русла.

ЛІТЕРАТУРА

1. Клеточная терапия хронической ишемии нижних конечностей / А. Б. Смолянинов, О. Г. Хурцилава, Е. В. Жаров [и др.] // АГ-инфо. – 2007. – № 3. – С. 10–15.
2. Лазаренко В. А. Лечение критической ишемии нижних конечностей с использованием серотонина / В. А. Лазаренко, А. П. Симоненко, Е. В. Лазарев // Ангиология и сос. хирургия. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 130–136.
3. Taylor S. M. Current status of heroic limb salvage for critical limb ischemia / S. M. Taylor // Am. Surg. – 2008. – Vol. 74, №4. – P. 275–284.
4. Alvarez-Dolado M. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomiocytes and hepatocytes / M. Alvarez-Dolado // Nature. – 2003. – Vol. 425. – P. 968–973.
5. Structural and functional remodeling of skeletal muscle microvasculature is induced by simulated microgravity / M. D. Delp, P. N. Colleran, M. K. Wilkerson, M. R. McCurdy // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – № 4. – P. 278–299.
6. Князева Т. А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т. А. Князева // Вестн. Акад. Мед. наук СССР. – 1974. – № 12. – С. 3–8.

HISTOLOGICAL STRUCTURE OF THE MUSCULAR TISSUE AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ANGIOGENESIS AFTER TRANSPLANTATION OF BONE MARROW ASPIRATE AND HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF FETAL LIVER UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ISCHEMIA

©R. V. Saliutin¹, D. B. Dombrovskyi², S. S. Palianytsia¹, L. A. Panchenko¹, V. M. Sirman¹, V.A. Shabliy¹

¹Coordinating Center of Transplantation for Organs, Tissue and Cells of MPH of Ukraine

²Bukovynian Regional Clinical Hospital

SUMMARY. Experimental examination was made with the purpose to learn the perspective of using the clinical preparations of embryonic origin concerning the activation of processes of angiogenesis in ischemic conditions. Using histological and immunohistochemical methods proved the activation process of angiogenesis de novo after transplantation of fetal liver stem cells.

KEY WORDS: ischemia, histology, immunohistochemistry, embryonic stem cells.