

Д. Б. Домбровський

# ПОТЕНЦІАЛ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТУ

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

## Вступ

Однією з суттєвих проблем сучасної судинної хірургії є лікування хворих на облітеруючі захворювання артерій кінцівок, яким з тих або інших причин не можна виконати реконструктивні оперативні втручання на судинному руслі кінцівки. Такі хворі заздалегідь приречені до вираженого ішемічного больового синдрому, а потім до неминучої ампутації кінцівки і, як наслідок, довічної інвалідності.

Одним із напрямків досліджень у розв'язанні цієї проблеми є використання клітинних технологій, які включають методи стимуляції хемотаксису ангіогенних клітин у вогнище ураження, або введення ззовні клітин, що збільшують процеси ангіогенезу як за рахунок зростання виділення ангіогенних цитокінів, так і за допомогою безпосередньої реконструкції судинного русла з цих клітин [2; 4].

Застосування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) для розв'язання різних клінічних проблем вважається досить перспективним. В організмі людини джерелом МСК є кістковий мозок і жирова клітковина. Однак клінічне використання кісткового мозку як джерела МСК проблематичне, оскільки процедура його отримання досить складна, і в результаті вдається зібрати малу кількість клітин. Альтернативним джерелом МСК в організмі є жирова тканина, однак характер впливу стовбурових клітин із цього джерела на ішемічні прояви сьогодні мало вивчений [3; 5].

Вивчення потенціалу диференціації МСК — досить цікаве питання, а головне — важливе в плані клінічного застосування. Існують деякі відомості про можливість диференціювання МСК в адипогенному, хондрогенному й остеогенному шляхах, але всі ці дослідження проводились *in vitro* з додаванням до середовищ, на яких культивувалися клітини певних факторів, що стимулювали розвиток диференціації в зазначеному напрямку. Проведення дослідження потенціалу диференціації МСК *in vivo* в експерименті з використанням різних створених умов дозволило б спрогнозувати можливі напрямки застосування даного варіанта клітинної трансплантації в клінічних умовах. Враховуючи актуальність проблеми лікування хворих на ішемію кінцівок, нами проведено дослідження пливу трансплантації МСК жирової тканини в експерименті за умов ішемії та при введенні клітин в умовах відсутності патологічних змін кінцівки.

## Матеріали та методи дослідження

Проведено експериментальні дослідження з використанням нелінійних білих щурів. Загальна кількість тварин — 30 щурів. Усі оперативні втручання на щурах проводилися під кетаміновим наркозом. Середня маса щурів становила  $(374,23 \pm 7,56)$  г, вік  $(6,0 \pm 1,2)$  міс., що знаходилися при кімнатній температурі на звичайному лабораторному раціоні. Усі оперативні втручання проводилися на базі експери-

ментального відділу Національного інституту хірургії та трансплантології АМН України. При проведенні досліджень зберігались усі умови асептики й антисептики. Після закінчення експериментальних досліджень і взяття матеріалу для дослідження тварини виводились із експериментального дослідження шляхом передозування нарकोзу. В усіх дослідних і контрольних групах тварин після закінчення терміну дослідження була взята м'язова тканина медіальної та латеральної поверхонь стегна на боці проведення експерименту, після чого були застосовані електронно-мікроскопічні методи дослідження отриманої м'язової тканини.

Усі тварини були поділені на 2 групи, по 15 тварин у кожній групі: I група — тварини, яким було виконано моделювання ішемії з подальшим уведенням стромально-васкулярної фракції жирової тканини, II група — тварини, в яких не змодельовано ішемію, а стромально-васкулярну фракцію жирової тканини вводили в інтактні м'язи.

Моделювання ішемії тканини кінцівки у щура проводили за методом Т. А. Князевої [1], згідно з яким навколо судинної ніжки, що кровопостачає тканини кінцівки, проводили дві лігатури на відстані 1 см одна від одної та перев'язували артерію разом з веною. Рану пошарово ушивали. За даними авторів, ішемічні прояви виражені вже на 3–4-ту добу після моделювання.

Для отримання стромально-судинної фракції, що містить мезенхімальні стовбурові кліти-



ни, жирову тканину щура, що була отримана з передньої черевної стінки, після значного подрібнення розводили тричі фосфатним буфером Дульбеко й інтенсивно струшували протягом 2–3 хв. Після центрифугування (10 хв при 600 g) жирове кільце та супернатант видаляли, а осад стромально-васкулярної фракції ресуспендували у фізіологічний розчин об'ємом по 0,5 мл на кожну тварину, після чого дану суміш вводили в ішемізовані кінцівки.

Трансплантацію мезенхімальних клітин жирової тканини клітини проводили в ішемізовані кінцівки на 3-тю добу після моделювання ішемії підфасціально тонкою смужкою на медіальній поверхні стегна. У тварин обох груп дослідний матеріал (м'язи стегна) отримували з медіальної та латеральної поверхні дослідної кінцівки на 4, 11, 25-ту добу після трансплантації МСК на кінцівку. Після отримання дослідного матеріалу проводили електронно-мікроскопічні дослідження.

Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки м'язової тканини фіксували в 2,5%-му розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері (рН — 7,2–7,4) і дофіксували в 1%-му розчині  $\text{OsO}_4$ . Матеріал зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації й укладали в аралдит. Морфологічні структури контрастували в процесі зневоднення матеріалу на-

сиченим розчином ураніацетату, а на зрізах — цитратом свинцю. Зрізи завтовшки 40–60 нм, одержані на ультратомі УМТП-3, вивчали в електронному мікроскопі ТЕСЛА БС-500.

Були вивчені: інтактні ендотеліоцити капілярів, ендотеліоцити при ішемії, а також капіляри в процесі їх новоутворення.

### Результати дослідження та їх обговорення

При дослідженні на 4-ту добу у тварин I групи ендотеліоцити характеризуються різним ступенем вираженості цитоплазматичних органел. Зі зростанням просвіту мікросудини поступово збільшується і кількість ендотеліоцитів, які його утворюють. З'являлася значна кількість цитоплазматичних виростів, що містять безліч піноцитозних пухирців (рис. 1).

У процесі зсуву ендотеліальних клітин або їх відособлення формуються міжклітинні просвіти. Надалі такі тяжі клітин завдяки подальшій каналізації перетворюються на своєрідні клітинні трубки. Такі утворення до цього терміну набувають вигляду зрілих капілярів. У складі стінки мікросудин видно фрагменти базальної мембрани, що формується.

Спостерігалася виражена вакуолізація цитоплазми й органел. Люмінальна поверхня вкрита пластівчастою речовиною і мала нерівні контури. Ве-

лики ядра ендотеліоцитів із пухким хроматином, що конденсує по периферії, локалізовані ближче до люмінальної поверхні, містять ексцентрично розташоване ядро. Цитоплазма ендотеліальних клітин має різну електронну щільність, яка залежить від ступеня розвитку ендоплазматичної сітки та рибосомального апарату.

У вогнищах активної проліферації мезенхімальних клітин траплялися як темні, так і світлі малодиференційовані елементи з ознаками стовбурових клітин. Мезенхімальні клітини були представлені дрібними зірчастими формами (7–10 мкм) із кількома відростками різної довжини. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення було на користь ядра. Ядро, багате еухроматином, містило 1–2 щільних ядра. У тонкому світлому обідку цитоплазми зрідка виявлялися дрібні поодинокі мітохондрії, слабовиражений апарат Гольджі, небагато коротких каналів гладкої ендоплазматичної сітки і численні вільні рибосоми (рис. 2).

Молоді ендотеліоцити характеризуються різним ступенем електронної щільності цитоплазми. В останній визначаються полісоми, помірно розвинений ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії з наявністю щільного матриксу.

У II групі тварин на 3-тю добу після трансплантації поверхня ендотеліоцитів капілярів по-

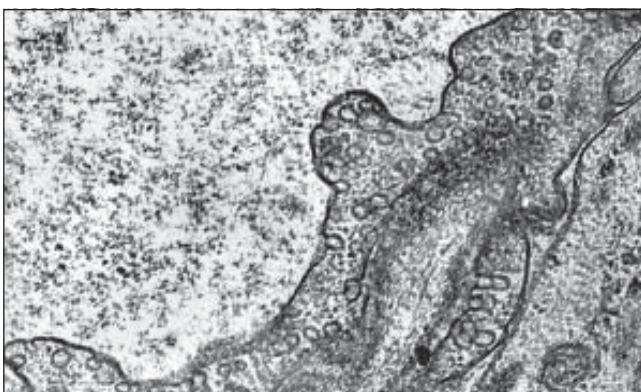


Рис. 1. Фрагмент ендотелію капіляра з мікроростами цитоплазми ендотеліоцитів і наявністю великої кількості мікровезикул.  $\times 20\ 000$

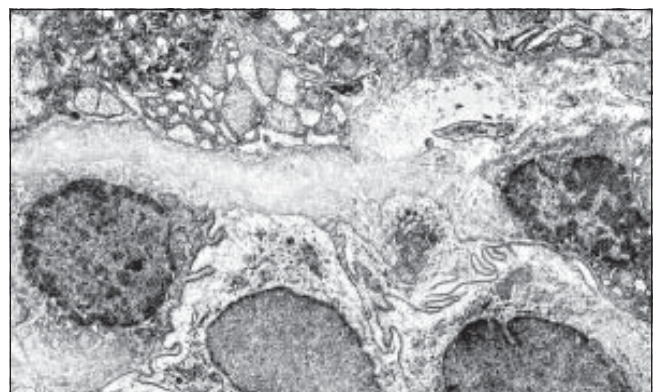


Рис. 2. Малодиференційовані гетерогенні клітини ділянки активної проліферації.  $\times 15\ 000$

рівняно нерівна — з численними виростами та мікроворсинками, оберненими як у просвіт судини, так і до базальної мембрани. Відростки сусідніх ендотеліоцитів з'єднуються кінець у кінець або з невеликими перекриттями, утворюючи десмосомоподібні структури. За межами базальної мембрани ендотеліоцитів трапляються перицити, макрофаги, фібробласти, лейкоцити.

Екстрацелюлярний простір заповнений волокнистими структурами й аморфною речовиною. Тут виявляються локуси проліферуючих клітин, багато які з них нагадують малодиференційовані клітини мезенхіми, серед яких трапляються молоді ендотеліоцити. За морфологічними ознаками деякі ендотеліоцити нагадують макрофаги, що їх оточують (рис. 3).

У тварин I групи на 11-ту добу в ендотеліоцитах чітко визначалися місця контакту гранулярної та гладкої ендоплазматичної сітки. Остання представлена короткими трубками і маленькими нагромадженнями округлих або витягнутих пухирців. Крім того, вздовж внутрішньої поверхні клітинної мембрани розташовувалися множинні вакуолі, що є глибокими інвагінаціями клітинної оболонки.

Численні пухирці були пов'язані з цистернами ендоплазматичної сітки, особливо у ділянці пластинчастого комплексу.

Траплялася значна кількість піноцитозних пухирців. Лізосоми виявлялися рідко, мали звичайну форму і щільність, їх мембрана практично не були змінені.

З боку базальної мембрани виявлялися малодиференційовані ендотеліоцитоподібні клітини з вираженими піноцитозними везикулами. Проте у деякій кількості клітин наявність звивистих контурів ядра, глибокочатого хроматину, особливо розташованого вздовж ядерної мембрани, свідчила про зневоднення та зморщування клітин. Окремі ендотеліоцити мали явні ознаки дегенерації. Ядра їх пікнотичні, цитоплазма містила вакуолі та везикули, заповнені дрібногранулярним вмістом.

Про посилення білкового обміну в ендотеліоцитах свідчить розширений гранулярний ретикулум, гіперосмірований матрикс мітохондрій, а також поява досить значної кількості полісом, окремих везикулярних структур у цитоплазмі та великих мікроворсинок (рис. 4).

У деяких клітинах вакуолі містили мембранні обривки та мієлінові фігури. Мітохондрії мали незначні ознаки набухання з помірною вакуолізацією, фрагментацією та дезорганізацією.

Хроматин розташовувався в центральних ділянках ядра відносно рівномірно, а по периферії концентрувався у вигляді суцільних електронно-щільних мас. Звертає на себе увагу звивистість ядерної оболонки. Рівень її складчастості варіює від

невеликих поверхневих заглиблень до глибоких численних інвагінацій, що надають ядру неправильної форми. Окремі інвагінації представлені цитоплазматичними острівцями різної величини та конфігурації.

У тварин II групи в цей термін ендотеліальні клітини містили значну кількість мікровідростків, мікровезикул, мікроворсинок. Цитоплазма мала різну електронну щільність, яка залежала від ступеня розвитку ендоплазматичної сітки, пластинчастого комплексу та рибосомального апарату. В ядрах ендотеліоцитів реєструвався конденсуючий по периферії хроматин. У наволоядерній зоні виявлявся пластинчастий комплекс, який складався з цистерн сплюснень і дрібних везикул; більшість мітохондрій, гладкий ендоплазматичний ретикулум, вільні рибосоми та полісоми. Спостерігалася значна кількість молодих клітин, що формуються з розвитими внутрішньоклітинними мікрофіламентами, численними рибосомами та виростами на верхній клітинній мембрані.

Дані електронної мікроскопії у тварин I групи на 25-ту добу дослідження характеризувалися тим, що цитоплазматичний матрикс мав низьку електронну щільність. На люмінарній поверхні ендотеліоцитів розташовувалися добре виражені відростки. Ядро, як правило, мало овальну форму. Хроматин роз-

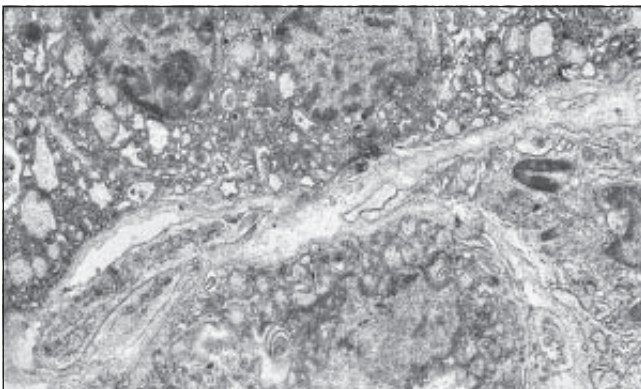


Рис. 3. Ділянка проліферації та трансформації малодиференційованих клітин.  $\times 15\ 000$

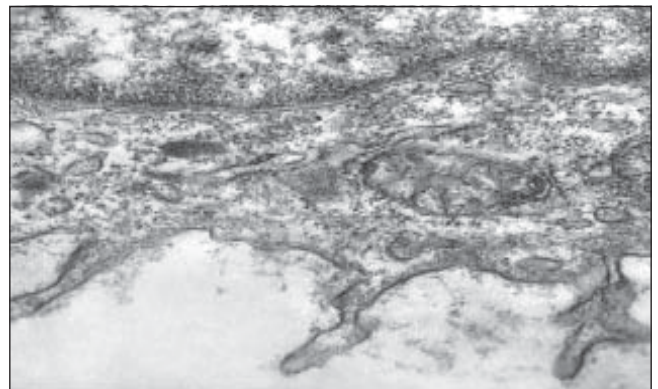


Рис. 4. Фрагмент ендотеліоцита з ознаками вираженої функціональної активності.  $\times 28\ 000$



ташовувався відносно рівномірно. Виявлялися чітко виражені пори ядерної оболонки, що сполучали вміст цитоплазми та нуклеоплазми. Траплялися ядра з перерозподілом хроматину або частковим його розпорошенням. Поблизу ядра розташовувався пластинчастий комплекс.

Цитоплазма між зонами пластинчастого комплексу зайнята мітохондріями, безліччю полісомних розеток і цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки. Виявлялися дрібні пучки тонких цитоплазматичних волокон, везикули різних розмірів, ліпідні включення. У деяких клітинах мітохондрії мали підвищеної щільності матрикс і щільно упаковані кристи. Дуже невелика частина мітохондрій мала ознаки набухання, що рідко супроводжувалося фрагментацією та дезорганізацією крист.

Цитоплазматична мембрана клітин зони трансплантації II групи тварин мала псевдоподії, інвагінації та мікровезикули, що здійснюють транспорт речовин через клітину. Поверхня клітини, обернена в просвіт судини, часто мала нерівні контури, а звернена до базальної мембрани — була гладкою.

У периферичних ділянках цитоплазми клітин, що за всіма ознаками нагадують макрофаги, як правило, були наявні поодинокі мітохондрії та везикулярні структури. Більшість мікровезикул локалізувалися в безпосередній близькості від цитоплазматичної мембрани і прямо відкривалися на її поверхню або знаходилися в тісному контакті з нею. Траплялися поодинокі рибосоми і полісоми.

Розподіл везикулярних інвагінацій на клітинній поверхні має істотне значення у визначенні функціональної активності клітин. Пори клітин представлені зредукованими трансендотеліальними каналами. Вони мали полігональну форму та локалізувалися в найбільш стоншених частинах клітини. Форма і розміри клітинних пор сильно варіювали. Клітинна поверхня часто формувала численні

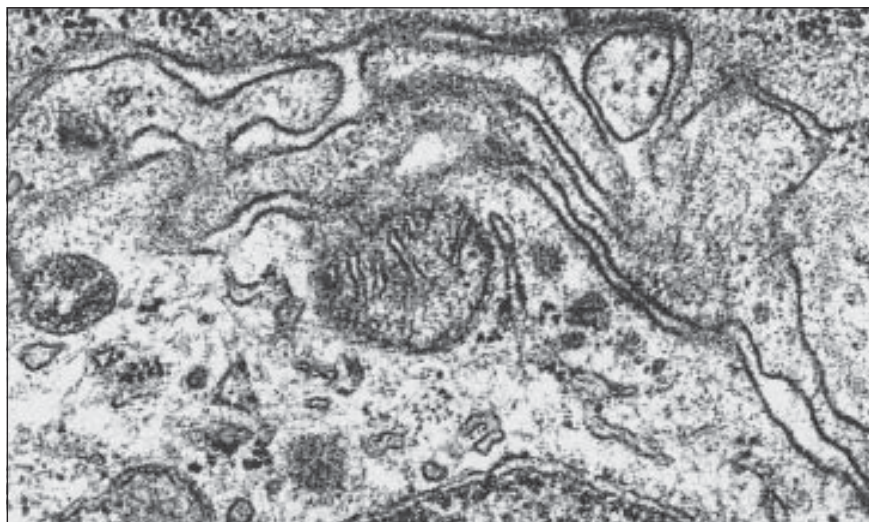


Рис. 5. Фрагмент молодого функціонально активного макрофага.  $\times 22\ 000$

складки, мікровідростки. Цитоплазма містила активні мітохондрії, мікротрубочки, рибосоми, полісоми (рис. 5).

У місці максимальної концентрації елементів цитоскелета мікровезикули й інші вакуолярні утворення практично були відсутні.

Отже, проведені ультраструктурні дослідження показали, що при трансплантації МСК у зону ішемії відбувається стимуляція процесів ангіогенезу як за рахунок ендотеліальних клітин раніше існуючих судин, так і внаслідок стимуляції репаративних процесів і безпосередньої трансформації трансплантованих стовбурових клітин. Крім того, введення МСК зменшує загибель клітин ендотелію в процесі ангіогенезу за умов ішемії.

У разі трансплантації МСК в інтактну м'язову тканину, де відсутнє ішемічне ураження клітин, немає біологічно активних речовин, що притаманні даному патологічному процесу, трансплантовані клітини активно перетворюються на тканинні функціонуючі макрофаги з високими характеристиками життєдіяльності. Структура та функції ендотеліальних і м'язових клітин у ділянці трансплантації не змінювалися, за винятком незначної запальної реакції на початкових стадіях, що спричинена самою трансплантацією.

Таким чином, потенціал диференціації плюрипотентних МСК жирової тканини є різноманітним, і головним чином залежить від активності процесів, що відбуваються в зоні трансплантації клітин. Активація власного потенціалу зниження ішемії тканини призводить до подібної диференціації трансплантованих стовбурових клітин, в умовах коли жодних патологічних процесів у тканині не відбувається, стовбурові клітини перетворюються на макрофаги, які не змінюють структуру тканини, але залишаються активними життєздатними клітинами.

#### ЛІТЕРАТУРА.

1. Князева Т. А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т. А. Князева // Вестник Академии медицинских наук СССР. — 1974. — № 12. — С. 3-8.
2. 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.
3. Therapeutic angiogenesis of critical lower limb ischemia. Review of the literature and prospects of research on stem cells / R. Di Stefano, U. Imbruno, D. Arone, A. Albarini // Ital. Heart. J. Suppl. — 2004. — N 5. — P. 1-13.
4. Laissy J. P. Imaging of the lower limb arteries: when, how and why? / J. P. Laissy, J. M. Pernes // J. Radiol. — 2004. — N 85. — P. 845-850.
5. Sritharan K. The ischaemic leg / K. Sritharan, A. H. Davies // Br. J. Hosp. Med. — 2006. — N 67 (3). — P. 56-68.

