

Р. В. Салютін

ЗМІНИ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ КАПІЛЯРІВ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ АСПІРАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ І ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України,
Національний інститут хірургії та трансплантології
ім. О. О. Шалімова НАМН України, Київ

Проблема лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок, зумовлену ураженням дистального судинного русла, залишається актуальною в сучасній ангиології. Це обумовлено високим рівнем незадовільних наслідків реконструктивно-відновних операцій та відсутністю анатомічних можливостей щодо їх виконання в 30–40 % клінічних випадків [1; 2].

У комплексному лікуванні цієї категорії хворих використовують методи непрямой ревазуляризації, до яких зараховують і трансплантацію стромальних стовбурових клітин кісткового мозку в ішемізовані м'язи ураженої кінцівки [3; 4].

Однак широке клінічне використання клітин кісткового мозку обмежене певними технологічними проблемами та низьким потенціалом трансдиференціювання дорослих мезенхімальних клітин [5].

Альтернативним джерелом активних плюрипотентних клітин є фетальна печінка, гемопоетичні стовбурові клітини якої мають значний, однак мало досліджений потенціал клінічного використання [6]. Незважаючи на те, що гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки (ГСКФП) застосовуються в комплексному лікуванні різних захворювань — хвороби Паркінсона, цукрового діабету, ішемічної хвороби серця тощо, повідомлення про їх використання в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок фактично відсутні [7; 8].

Мета дослідження — в експерименті дослідити особливості впливу трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки людини й аспірату кісткового мозку на процеси ангиогенезу на рівні ультраструктури ендотеліоцитів капілярів ішемізованої м'язової тканини.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено у відділі експериментальної хірургії Національного інституту хірургії та трансплантології АМН України на 50 інбред-

них самцях білих щурів, що знаходились у стандартних умовах віварію. Середня маса щурів становила (375,0±8,0) г, вік (6,0±1,2) міс. На першому етапі дослідження усім тваринам під кетаміновим наркозом, у стерильних умовах виконано оперативне втручання — змодельована ішемія нижньої кінцівки за методом Т. А. Князевої. Згідно з даними автора даного методу, на 3-тю добу після операції у тварин формується ішемія кінцівки [9].

На другому етапі тварини були поділені на 2 групи:

I група (контроль) — 25 щурів, яким на 3-тю добу експериментальної ішемії в м'язи стегна введено алогенний аспірат кісткового мозку, одержаний з діафізів стегнових кісток.

II група (дослідна) — 25 щурів, яким на 3-тю добу змодельованої ішемії проведено трансплантацію ксеногенних стовбурових клітин: ГСКФП 6–8 тиж. гестації з фенотипом CD34⁺, CD38⁺, CD45Ra^{low}, CD71^{low} (кількість КУО-ГМ 140,0·10³).

Клітини вводили підфасціально смужкою по медіальній поверхні ішемізованого стегна.

У тварин обох груп дослідний матеріал (м'язи стегна) отримували під кетаміновим наркозом, з медіальної та латеральної поверхні дослідної кінцівки на 5-ту, 7-му, 14-ту, 21-шу та 25-ту добу змодельованої ішемії.

Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки м'язової тканини фіксували у 2,5%-му розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері (рН — 7,2–7,4) і дофіксували в 1%-му розчині OsO₄.

Матеріал зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації і фіксували в аралдиті. Ультраструктури ендотеліоцитів контрастували у процесі зневоднення матеріалу насиченим розчином уранілацетату, а на зрізах — цитратом свинцю. Зрізи завтовшки 40–60 нм отримували на ультратомі УМТП-3 (Росія) та вивчали в електронному мікроскопі ТЕСЛА БС-500 (Росія).



Результати дослідження та їх обговорення

На 5-ту–7-му добу після моделювання ішемії (2-гу–4-ту добу після трансплантації аспірату кісткового мозку) в ендотеліоцитах тварин контрольної групи фіксували ознаки дегенеративно-дистрофічного стану, що було обумовлено триваючим ішемічним ураженням.

Про це свідчила наявність у матриксі незначної кількості вільних рибосом, мультивезикальних тілець і патологічно зміненого комплексу Гольджі, який складався з незначної кількості везикул різного калібру. Базальна мембрана ендотеліоцитів була відсутньою, з розпушеним, місцями потоншеним позаклітинним компонентом й ознаками розривів.

Траплялися клітини, в яких були відсутні мікропіноцитозні везикули, а ущільнені ділянки цитоплазми поєднувалися з ділянками низької щільності. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум майже у всіх клітинах був слабо розвинений, розширений, з нечіткими профілями.

Клітинне ядро мало просвітлену нуклеоплазму, великозернистий хроматин, зібраний у грудочки та розташований біля внутрішньої ядерної мембрани. Мітохондрії мали нетипову структуру — з електроннощільним матриксом і дезорієнтованими, скороченими й шорсткими кристами.

Водночас у тварин дослідної групи вже на 5-ту, а особливо на 7-му добу експерименту (4-та доба після клітинної трансплантації), спостерігались ознаки неоангіогенезу, про що свідчила наявність молодих ендотеліоцитів із різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел, які формували молоді неокапіляри.

Нові ендотеліоцитоподібні клітини мали збільшене ядро, контуровані структури цитоплазматичного 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 ретикулума, пластинчастого комплексу, наявність множинних поліморфних везикул і вакуолей.

Структура неокапілярів характеризувалася мозаїчністю. Це було обумовлено наявністю високодиференційованих ендотеліоцитів (з відносно вираженими ознаками зрілості та збереженими пластичними властивостями), що брали участь у процесі формування неомікросудин.

На 14-ту добу експерименту (11-та доба після клітинної трансплантації) в електроннограмах біоптатів тварин контрольної групи була наявною незначна кількість молодих незрілих ендотеліальних клітин, які мали збільшену кількість

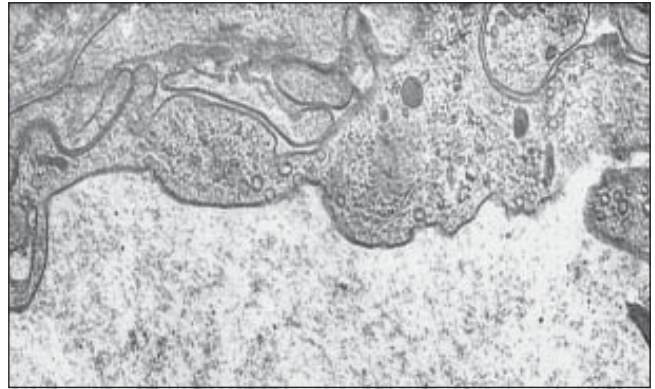


Рис. 1. Ендотеліоцит неокапіляра з піноцитозними бульбашками та наявністю гранул Вейбеля — Палладе. $\times 20\,000$

клітинних відростків, подовжених і переплєтених між собою або розташованих паралельно. Їхня клітинна мембрана мала звивисту структуру, сусідні відростки формували вузькі щілиноподібні порожнини, що поєднувалися десмосоподібними контактами.

Наявність ендотеліоцитів зі зміненою формою ядра й інвагінацією ядерної мембрани вказувала на збільшення їхньої площі та компенсаторну гіперфункцію клітини, що свідчило про триваючу гіпоксію клітин.

Пластинчастий комплекс був слабо розвинутий, у цитоплазмі виявлялися хаотично розташовані міофібрили, поодинокі лізосоми. Мітохондрії мали округлу або овальну форму, помірну електронну щільність, напівзруйновані кристи та світлий матрикс.

Доволі часто між незрілими ендотеліоцитами фіксували порушення клітинних взаємовідношень — міжклітинні проміжки були значно розширеними, а в утворених порожнинах виявлялися фрагменти деструктивно змінених міжклітинних контактів і мембранних елементів, що свідчило про значні порушення міжклітинної взаємодії на даний термін дослідження.

У біоптатах м'язової тканини тварин дослідної групи на 14-ту добу спостереження значна кількість ендотеліоцитів мала ущільнений матрикс із достатньою кількістю везикул, мультивезикулярних тілець, вільних рибосом і полісом, потовщених мікроворсинок, мікрофіламентів, мікротрубочок і цистерн, що свідчило про міотичну й функціональну активність.

Лише у деяких клітинах зберігалася гіоплазія структурних елементів пластинчастого комплексу й ознаки набряку ендотеліоцитів. Чітко виявлялися неокапіляри, які складалася зі світлих, набряклих ендотеліоцитів.

Водночас інші судини були розширеними та переповненими еритроцитами. Цитоплазма більшості ендотеліоцитів була просвітленою, з мітохондріями невеликих розмірів, кристи яких мали ознаки набряку.



Прекапілярний простір був розширеним, містив матеріал низької електронної щільності та колагенові волокна, а також незрілі клітини — молоді ендотеліоцити. Останні мали збільшене ядро та цитоплазму, що містила піноцитозні везикули й тісно прилягала до базальної мембрани.

На 21-шу–25-ту добу після моделювання ішемії ендотелій капілярів м'язової тканини тварин контрольної групи був представлений сплюсненими клітинами, які містили мікропіноцитозні везикули та були розташовані як по вільному краю, так і вздовж базального шару.

Траплялися різко потоншені ендотеліоцити з незначним вмістом просвітленої цитоплазми та зменшеною кількістю мікропіноцитозних везикул, фіксувалися розпушення, потоншення та руйнація позаклітинного компонента базального шару.

У молодих ендотеліоцитах спостерігали поживавлення обмінних процесів, про що свідчив розширений гранулярний ретикулум, гіперосмований матрикс мітохондрій, наявність піноцитозних везикул і тілець Вейбеля — Палладе, а також поява значної кількості полісом та окремих фібрилярних структур (рис. 2).

Ядерний хроматин молодих ендотеліоцитів збирався грудками, особливо на периферії. Спостерігалися помірні зміни мітохондріальної системи — дисконкомплексация та розплавлення крист, дисоціація їхніх мембран і деструкція структурних елементів пластинчастого комплексу.

Однак в електроннограмах доволі часто спостерігали наявність деструктивно змінених ендотеліоцитів, фрагменти яких траплялися у просвіті капілярів — це свідчило про розриви цитоплазматичних мембран ендотеліальних клітин.

Водночас аналіз електроннограм біоптатів тварин дослідної групи на 21-шу–25-ту добу дослідження показав, що спостерігалась інтенсифікація процесів ангиогенезу з активним формуванням молодих ендотеліоцитів і некапілярної сітки (рис. 3).

Люмінальна поверхня ендотеліальних клітин мала значну кількість відростків, що збільшувало площу структур, які забезпечують трансен-

дотеліальний транспорт. Цитоплазматичний матрикс із дещо зниженою електронною щільністю містив вільні рибосоми, а вздовж внутрішньої поверхні клітинної мембрани розташовувалися множинні мікроворсинки.

Численні піноцитозні бульбашки розташовувалися переважно поблизу внутрішньої поверхні цитоплазматичної мембрани. Позаклітинний матеріал складався з незмінених або розщеплених колагенових фібрил, фрагментів еластичних волокон, деякої кількості зернистої речовини.

Ретикулярна сітка була добре розвинута, представлена внутрішньоклітинними каналами і цистернами. Виявлялася значна кількість мікрофібрил і мікрофіламентів.

Частина піноцитозних бульбашок збільшувались у розмірах та утворювала великі вакуолі. У поодиноких випадках спостерігалися зони деструкції цитоплазми старих ушкоджених ендотеліоцитів — з люмінальної поверхні відбувалося злушення мікроворсинок у просвіт капіляру.

Таким чином, експериментальне дослідження показало, що при трансплантації кісткового мозку в ішемізовані м'язи протягом майже всього періоду спостереження відбувалися виражені деструктивні процеси, обумовлені триваючою ішемією.

Слід зазначити, що в даній групі дослідження спостерігалась активація компенсаторних сил ендотеліоцитів, яка проявлялася в появі молодих ендотеліоцитів. Однак вони з'являються лише на 14-ту добу змодельованої ішемії (11-та доба після трансплантації), містять дезорганізовані органели та мікрофіламенти, тобто такі клітини функціонально не повноцінні. Лише на 22-гу добу після трансплантації спостерігається поява функціонуючих ендотеліоцитів.

Водночас у тварин дослідної групи вже на 5-ту–7-му добу ішемічного стану (2-гу–4-ту добу після трансплантації гемопоетичних клітин фетальної печінки в ішемізовану м'язову тканину)

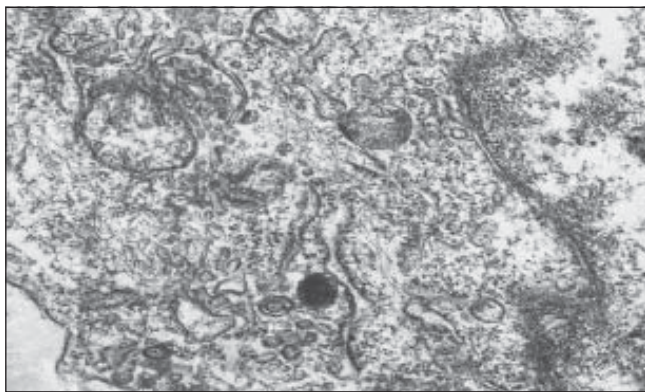


Рис. 2. Фрагмент молодого ендотеліоцита з ознаками клітинної трансформації. $\times 28\ 000$

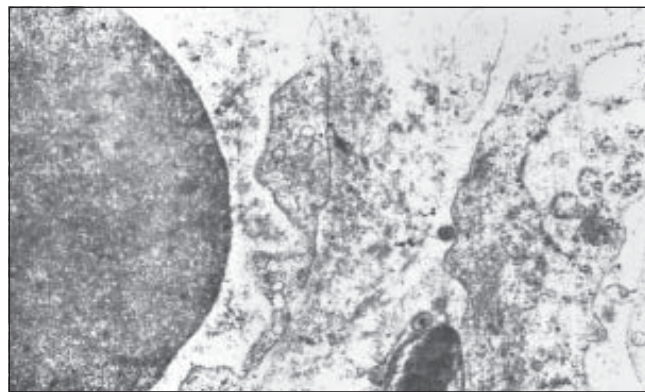


Рис. 3. Некапіляр, утворений з молодих ендотеліоцитів, у просвіті якого еритроцит. $\times 20\ 000$

спостерігається активація процесів ангиогенезу: з'являються молоді ендотеліоцити з різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел і наявністю тілець Вейбеля — Палладе.

На 14-ту добу спостереження виявлялися активно функціонуючі ендотеліоцити, які брали участь у формуванні неокапіляра, а вже на 25-ту добу (22-гу після трансплантації) в біоптатах м'язової тканини фіксували наявність розвинутої та функціонуючої неокапілярної сітки.

Висновки

Трансплантація аспірату кісткового мозку та гемопоетичних клітин фетальної печінки призводить до активації процесів неоангиогенезу, а саме: появи молодих ендотеліоцитів з різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел і тілець Вейбеля — Палладе. Однак введення в ішемізовану м'язову тканину гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки призводить до більш вираженої інтенсифікації процесів ангиогенезу порівняно з тваринами контрольної групи, яким трансплантували аспірат кісткового мозку.

Активність процесів неоангиогенезу, які спостерігаються у тварин дослідної групи навіть в умовах повної тотальної ішемії, свідчить про перспективу застосування гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки у хворих із критичною ішемією кінцівок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Baumgartner I. Management of peripheral vascular disease / I. Baumgartner, R. Schainfeld, L. Graziani // Annu. Rev. Med. — 2005. — N 56. — P. 249-272.
2. Vascular Society of Great Britain and Ireland // B. J. Surg. — 2007. — N 94, issue 2. — P. 1-13.
3. Dormandy J. A. Fate of the patient with chronic leg ischaemia / J. A. Dormandy, M. Nahir, G. Ascady // J. Cardiovasc. Surg. (Torino). — 1999. — Vol. 4, N 30. — P. 50-57.
4. 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.
5. 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.
6. Кухарчук О. Л. Ствобурові клітини фетальної печінки: проблеми ідентифікації та перспективи застосування в клінічній медицині / О. Л. Кухарчук, Т. М. Ганжа // Трансплантологія. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 147-153.
7. Берсенев А. В. Изучение выживания и дифференцировки аллогенных фетальных клеток, трансплантированных в головной мозг пациентам с болезнью Паркинсона, — результаты исследования аутопсийного материала / А. В. Берсенев // Клеточная трансплантология. — 2005. — Т. 1, № 2. — С. 34-35.
8. Lee D. D. Cellular therapies for type 1 diabetes / D. D. Lee, E. Grossman, A. S. Chong // Horm. Metab. Res. — 2008. — Vol. 40, N 2. — P. 147-154.
9. Князева Т. А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т. А. Князева // Вестник Академии мед. наук СССР. — 1974. — Т. 2, № 12. — С. 3-8.

Передплацуйте
і читайте



ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті
Передплатний індекс 48717

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Новітні технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії

