

## ХАРАКТЕРИСТИКА АНГІОГЕНЕЗУ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН З РІЗНИМ ФЕНОТИПОМ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ КІНЦІВКИ

*Р.В. Салютін*

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

**Резюме.** В експерименті доведена ефективність застосування клітин фетальної печінки як індуктора неоангіогенезу при тотальній ішемії кінцівки.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, клітини фетальної печінки, ішемія.

За результатами досліджень Ангіологічної ради Великої Британії, частота виявлення первинної хронічної критичної ішемії кінцівки щороку становить 400 хворих на 1 млн. населення [1], а близько 90 % ампутацій виконуються з приводу вираженої ішемії нижньої кінцівки, зокрема 25 % ампутацій виконуються на рівні голілки або стегна [2]. Окрім того, у 40 % хворих з тромбооблітеруючими ураженнями артерій дистальніше пахвинної зв'язки відсутні анатомічні можливості для виконання прямої реваскуляризації [3].

В останні роки проводяться дослідження, присвячені використанню методів стимульованого ангіогенезу для лікування хворих з ішемічними ураженнями різного генезу (А.Б.Смолянинов и др., 2005). З метою реваскуляризації ішемізованих тканин широко використовуються стромальні стовбурові клітини кісткового мозку [4]. Проте широке клінічне використання цих клітин обмежене певними технологічними труднощами та низьким потенціалом трансдиференціювання дорослих мезенхімальних клітин [5].

Вищі потенції до стимуляції процесів ангіогенезу мають гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки, застосування яких дозволено законом України "Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людей". У науковій літературі дуже мало робіт, присвячених порівняльному аналізу впливу трансплантації клітин кісткового мозку та гемопоетичних клітин фетального походження на процеси ангіогенезу в ішемізованій м'язовій тканині, чим зумовлений даний напрям наукового дослідження.

**Мета дослідження.** Дослідити особливості процесів неоангіогенезу після трансплантації аспірату кісткового мозку та гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки за умов експериментальної ішемії.

**Матеріал і методи.** Дослідження проведено на 45 інбредних самцях білих щурів, які перебували у стандартних умовах віварію. Маса щурів –  $379,0 \pm 8,5$  г, вік –  $6,0 \pm 1,3$  міс. Тварин поділено на 3 групи: I група (контроль) – 15 щурів з повною ішемією, яку моделювали за методом Т.А.Князевої [6], коли на 3-4 добу після операції у тварин формується критична ішемія кінцівки; II група (перша дослідна) – 15 щурів, яким на 3-тю добу експериментальної ішемії у м'язи стегна вводили алогенний аспірат кісткового мозку, одержаний з діафізів стегнових кісток; III група (друга дослідна) – 15 щурів, яким на 3-тю добу змодельованої ішемії виконували трансплантацію ксеногенних стовбурових клітин: гемопоетичні клітини фетальної печінки людини 6-8 тиж гестації з фенотипом CD 34<sup>+</sup>, CD 38, CD 45Ra<sup>low</sup>, CD 71<sup>low</sup> (кількість КУО-ГМ  $140,0 \times 10^3$ ). У тварин всіх груп м'язи стегна вирізали з медіальної та латеральної поверхонь дослідної кінцівки на 7-му, 14-ту і 25-ту добу ішемічного стану та після введення клітинних трансплантатів. Для електронікроскопічного дослідження шматочки м'язової тканини фіксували у 2,5 % розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері (рН – 7,2-7,4) і дофіксували в 1 % розчині осмію. Матеріал зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, фіксували, а потім контрастували насиченим розчином ура-

нілацетату та цитратом свинцю. Непівтонкі зрізи отримували на ультратомі УМТП-3 (Росія), вивчали в електронному мікроскопі ТЕСЛА БС-500 (Росія).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Установлено, що на 7-му добу експериментальної ішемії розвиваються глибокі дегенеративно-дистрофічні зміни ендотеліоцитів капілярів. Про це свідчить наявність поодиноких вільних рибосом та елементів дрібновезикулярного пластинчастого комплексу Гольджі. Гранулярна ендоплазматична сітка слабо розвинена, її каналці різко розширені, з нечіткими профілями. Мітохондрії нетипової структури: дрібні, містять нечисленні кристи, з розширеними інтракристними проміжками. Наслідком підвищення проникності судинної стінки є субендотеліальний набряк з відшаруванням ендотеліальних островців, деструкцією фібрилярної структури аморфної речовини субендотеліальної зони, накопичення грубодисперсних білків плазми та продуктів порушеного тканинного метаболізму. Спостерігалось утворення великої кількості ендотеліальних відростків, дисконплектація структур цитоскелета.

Водночас у біоптатах тварин першої дослідної групи (після трансплантації аспірату кісткового мозку) визначали дегенеративно-дистрофічний стан, зумовлений тривалим ішемічним ураженням. У цитоплазмі ендотеліоцитів фіксували поодинокі вільні рибосоми, мультивезикулярні тільця та патологічно змінений комплекс Гольджі, який складався з незначної кількості пухирців та вакуолей різного діаметра. Базальна мембрана ендотеліальних клітин місцями стоншена, з розривами або відсутня. Трапляються клітини, в яких відсутні мікропіноцитозні везикули, а ущільнені ділянки цитоплазми поєднувалися з ділянками низької щільності. Гранулярна ендоплазматична сітка слабо розвинена, з розширеними каналцями та профілями. Мітохондрії містять електронно-щільний матрикс та дезорієнтовані короткі кристи.

При аналізі м'язової тканини тварин другої дослідної групи (після трансплантації гемопоетичних клітин фетальної печінки) вже на 7-му добу спостерігали чіткі ознаки неангіогенезу, про що свідчила наявність молодих ендотеліоцитів з різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел, котрі формували молоді нека-

піляри. Молоді ендотеліоцити мали велике 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 – маркери неангіогенезу (рис. 1). Спостерігається активація пластичних процесів, про що свідчить гіпертрофія та гіперплазія елементів ендоплазматичної сітки, пластинчастого комплексу Гольджі, наявність множинних поліморфних везикул та вакуолей. Структура неокапілярів характеризується мозаїчністю, що свідчить про їхню поліфункціональність. З одного боку, це зумовлено наявністю високодиференційованих ендотеліоцитів з відносно вираженими ознаками зрілості, з другого – збереженням пластичних властивостей, що вказує на участь у процесах формування неомікросудин.

До 14-ї доби у щурів контрольної групи поглиблювалися ознаки дегенеративних процесів, що виражалось різкими змінами енергетичного апарату клітин: дисконплектація та розпрямлення крист мітохондрій, дисоціація зовнішніх та внутрішніх мембран. Звертала на себе увагу деструкція комплексу Гольджі, який мав надмірно великі везикули і розширені цистер-



Рис. 1. Ендотелій неокапіляра з піноцитозними бульбашками та гранулами Вейбеля-Палладе. Зб. 20000 $\times$ .

ни, спостерігалася дисконплектація і розширення каналців ендоплазматичної сітки. Цитоплазматичні відростки злегка випинали у проміжки базальної мембрани. У біоптатах тварин першої групи візуалізується незначна кількість молодих незрілих ендотеліоцитів, які мали збільшену кількість видовжених та переплечених між собою або паралельно розташованих цитоплазматичних відростків. Їх плазмолема мала звивисту структуру, суміжні відростки формували вузькі щілиноподібні порожнини, котрі з'єднувалися десмосомоподібними контактами. Ядра таких клітин мали округлу або овальну форму, електроннощільний хроматин у вигляді грудочок та значну кількість інвагінацій нуклеолеми. Наявність ендотеліоцитів зі зміненою формою ядра та конфігурацією перинуклеарного простору, інвагінацій ядерної оболонки на компенсаторну гіперфункцію клітини, власне, й підтверджувало триваючу гіпоксію клітин. У цитоплазмі клітин реєстрували помірну кількість округлих мітохондрій з напівзруйнованими кристами та світлим матриксом. Пластинчастий комплекс Гольджі слабо розвинутий, у цитоплазмі виявлялися хаотично розташовані міофібрили та поодинокі лізосоми. Як правило, на поверхні ендотеліоцитів, спрямованих у просвіт капіляра, мали місце деструктивно змінені мікроворсинки. Часто в ділянках

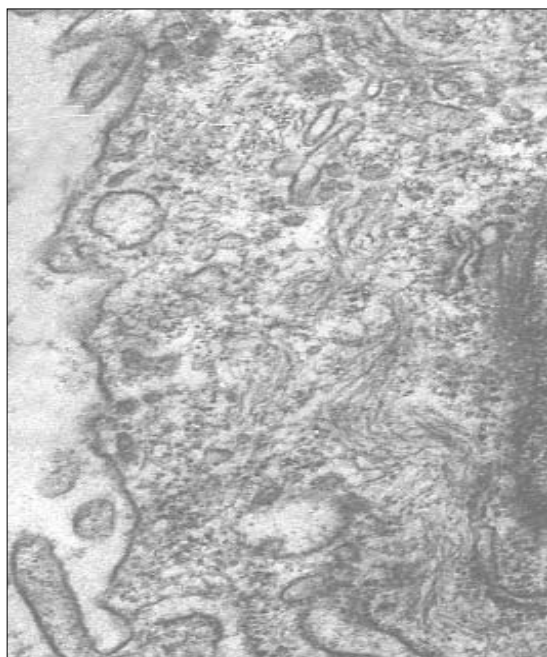


Рис. 2. Ендотеліоцит з вираженими ознаками диференціювання та функціональної активності.  $\times 22000$ .

розташування вищеописаних клітин фіксували порушення міжклітинних взаємовідношень – міжклітинні проміжки значно розширені, а в утворених порожнинах виявляли фрагменти деструктивно змінених міжклітинних контактів та мембранних елементів.

У біоптатах м'язової тканини тварин другої дослідної групи на 14-ту добу значна кількість молодих ендотеліоцитів мала ущільнений матрикс з достатньою кількістю везикул, мультивезикулярних тілець, вільних рибосом та полісом, потовщених мікроворсинок, мікрофіламентів, мікротрубочок та цистерн, що свідчить про мітотичну та функціональну активність клітин (рис. 2). Чітко виявлялися неокапіляри, які склалися зі світлих, набряклих ендотеліоцитів. Водночас інші кровоносні судини розширені та переповнені еритроцитами. Цитоплазма більшості ендотеліоцитів просвітлена, містить мітохондрії малих розмірів, кристи яких з ознаками набряку. Прекапілярний простір розширений, містить матеріал низької електронної щільності, колагенові волокна, а також незрілі клітини – молоді ендотеліоцити.

На 25-ту добу експерименту у тварин контрольної групи просвіт капілярів звужений внаслідок набряку ендотеліоцитів або розширений, заповнений еритроцитами, що свідчить про виражені застійні явища на рівні мікросудин. Спостерігалися капіляри, просвіт яких заповнений клітинним детритом або стиснутий прилеглою сполучною тканиною, при цьому перикапілярний простір був заповнений колагеновими волокнами. Просвіт деяких капілярів облітерований цитоплазматичним детритом десквамованих клітин. Просвітлена цитоплазма ендотеліоцитів заповнена незначною кількістю мітохондрій малих розмірів та неправильної форми, в яких визначалися фрагментація та деструкція крист. Спостерігали також розширення каналців ендоплазматичної сітки та зруйнований комплекс Гольджі. Кількість вільних рибосом зменшена. Люменальна поверхня ендотеліоцитів практично без мікроворсинок.

На 25-ту добу після трансплантації аспірату кісткового мозку ендотелій представлений сплосненими клітинами, які містили мікропіноцитозні везикули, розташовані як по вільному краю, так і ближче до базальної мембрани. Траплялися різко стоншені ендотеліоцити з незначним вмістом просвітленої цитоплазми та

зменшеною кількістю мікропіноцитозних везикул. Гетерохроматин у ядрах молодих ендотеліоцитів збирався грудками, особливо на периферії. Спостерігалися помірні зміни мітохондрій – дисконплектація та розплавлення крист, дисоціація їх мембран та деструкція структурних елементів. У молодих ендотеліоцитах спостерігали поживлення обмінних процесів, про що свідчать розширені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, гіперосмосований матрикс мітохондрій, наявність піноцитозних везикул та тілець Вейбеля-Палладе, а також поява значної кількості полісом та окремих фібрилярних структур у цитоплазмі клітин. Проте часто спостерігали наявність деструктивно змінених ендотеліоцитів, фрагменти яких виявлялися в просвіті капілярів. Водночас у тварин дослідної групи на 25-ту добу спостерігалися інтенсивні процеси ангіогенезу з активним формуванням молодих ендотеліоцитів та неокапілярної сітки (рис. 3). Люменальна поверхня ендотеліальних клітин мала значну кількість відростків, що збільшувало площу структур, які забезпечують трансендотеліальний транспорт. Цитоплазматичний матрикс містив вільні рибосоми, а вздовж внутрішньої поверхні клітинної мембрани розташовувалися множинні мікроросинки та піноцитозні бульбашки, які утворювали великі вакуолі. Позаклітинний матеріал складався з незмінених або частково розщепле-

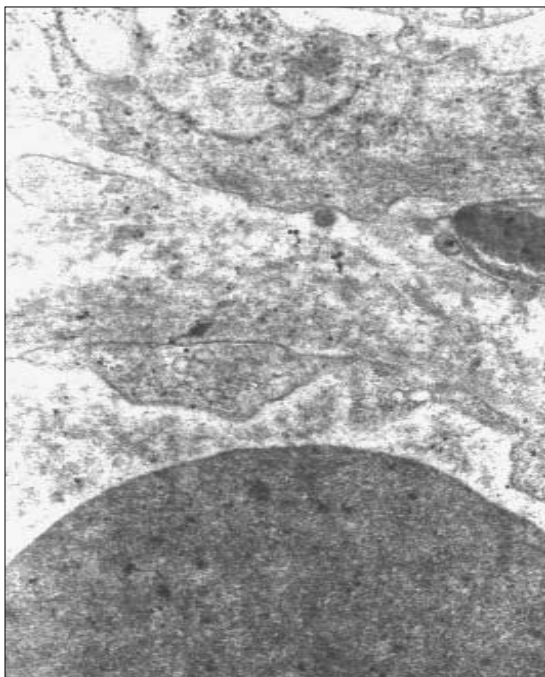


Рис. 3. Новоутворений капіляр з еритроцитом у просвіті. Зб. 20000 $\times$ .

них колагенових волокон, які розташовувалися в аморфній речовині. Виявлялася значна кількість мікрофібрил і мікрофіламентів у цитоплазмі.

Отже, до 25-ї доби експериментальної ішемії у щурів контрольної групи дегенеративно-дистрофічні зміни ендотеліоцитів набувають максимальних проявів на субмікроскопічному рівні, що призводить до руйнування мікроциркуляторного русла ішемізованої кінцівки. Трансплантація аспірату кісткового мозку сприяє частковій та помірній активації процесів ангіогенезу, що відбувається за рахунок активації компенсаторних сил ендотеліоцитів та, ймовірно, через трансдиференціювання стовбурових мезенхімальних клітин у молоді ендотеліоцити. Проте вони з'являються лише на 14-ту добу після трансплантації, містять дезорганізовані органели та мікрофіламенти, тобто такі клітини функціонально не повноцінні. Лише на 25-ту добу після трансплантації спостерігаються зрілі, активно функціонуючі ендотеліоцити.

Окрім цього, дослідження показало, що в першій дослідній групі тварин протягом майже всього періоду спостереження мали місце виражені деструктивні зміни у внутрішньоклітинних органелах, що зумовлено тривалою ішемією. Водночас у тварин другої групи вже на 7-му добу після трансплантації гемопоетичних клітин фетальної печінки в ішемізовану м'язову тканину активувалися процеси ангіогенезу. На 14-ту добу виявляються активно функціонуючі ендотеліоцити, які беруть участь у формуванні неокапіляра, а вже на 25-ту добу в біоптатах м'язової тканини фіксували наявність розвинутої та функціонуючої неокапілярної сітки.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** 1. Тотальна ішемія кінцівки характеризується прогресивною динамікою деструктивних змін ендотеліоцитів, зокрема руйнуванням органел синтетичного та енергетичного апарату клітини. 2. Трансплантація аспірату кісткового мозку та гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки призводить до активації процесів неоангіогенезу, що на субмікроскопічному рівні виражається появою молодих ендотеліоцитів з різним ступенем зрілості цитоплазматичних органел та тілець Вейбеля-Палладе. 3. Динаміка процесів неоангіогенезу більше виражена у тварин після введення гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки – вже на 7-му добу з'являються молоді енто-

теліоцити, які до 25-ї доби формують активно діючу неокапілярну сітку. 4. Швидкі темпи процесів неоангіогенезу, які після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної

печінки спостерігаються навіть при повній ішемії, свідчать про перспективу застосування даного методу лікування у хворих з критичною ішемією кінцівок.

### Література

1. *Vascular Society of Great Britain and Ireland // B. J. Surg.* – 2007. – № 94: issue 2. – P. 1-13.
2. Baumgartner I. *Management of peripheral vascular disease / I. Baumgartner, R. Schainfeld, L. Graziani // Ann. Rev. Med.* – 2005. – Vol. 56. – P. 249-272.
3. Казьмин З.В. *Комплексное хирургическое и консервативное лечение хронической критической ишемии при отсутствии условий прямой реваскуляризации нижних конечностей: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. мед. наук / З.В. Казьмин.* – М., 2006. – 35 с.
4. Дрюк Н.Ф., Самсонов А.В. *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 / Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М.* – Черновцы: Золоті литаври, 2004. – 505 с.
6. Князева Т.А. *Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т.А. Князева // Вестн. АМН СССР.* – 1974. – Т. 2, № 12. – С. 3-8.

### ХАРАКТЕРИСТИКА АНГИОГЕНЕЗА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С РАЗНЫМ ФЕНОТИПОМ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ

**Резюме.** В эксперименте доказана эффективность применения клеток фетальной печени в качестве индуктора неоангиогенеза в условиях тотальной ишемии конечности.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, клетки фетальной печени, ишемия.

### CHARACTERISTIC OF ANGIOGENESIS FOLLOWING TRANSPLANTING STEM CELLS WITH A DIVERSE PHENOTYPE UNDER THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ISCHEMIA OF AN EXTREMITY

**Abstract.** The efficacy of using the cells of the fetal liver as an inductor of neoangiogenesis in case of total ischemia of an extremity has been corroborated.

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

A.A. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology of Ukraine's AMS (Kyiv)

Надійшла 21.12.2009 р.

Рецензент – д. мед. н. Л.Я. Федонюк (Чернівці)