

© Салютін Р.В.

УДК 616.013-002-005.4-092.4-089.843:615.387

ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПРОЦЕСИ АНГІОГЕНЕЗУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

Р.В. Салютін

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

Резюме. Проведено експериментальне дослідження з метою вивчення перспективності використання клітинних препаратів ембріонального походження щодо активації процесів ангиогенезу в умовах ішемії. На субмікроскопічному рівні доведено ефективність застосування ембріональних стовбурових клітин з метою стимуляції процесів ангиогенезу de novo при ішемії кінцівки.

Ключові слова: ішемія, непрямая реваскуляризація, електронна мікроскопія.

На облітеруючі ураження артерій кінцівок у світі страждає близько 2-3 % населення, з віком їх частота збільшується до 5-7 % [1, 2]. Неефективність первинних реконструктивних операцій, особливо при ураженні артерій дистального русла, спонукає до пошуків нестандартних методів непрямой реваскуляризації, спрямованих на стимуляцію колатерального кровообігу: артеріалізація вен гомілки і стопи, автотрансплантація сальника, реваскуляризуєча остеотрепанация методом Зусмановича, поперекова симпатектомія [3]. Позитивний ефект цих операцій часто короткочасний, деякі з них травматичні.

Одним із напрямків наукових досліджень є використання клітинних технологій, які включають методи стимуляції хемотаксису ангиогенних клітин у вогнище ураження або введення клітин, які сприяють ангиогенезу за рахунок збільшення виділення ангиогенних цитокінів або за допомогою безпосередньої реконструкції судинного русла. З цією метою використовуються стромальні стовбурові клітини (СК) кісткового мозку [4, 5]. Проте клінічне застосування кісткового мозку як джерела мезенхімальних СК проблематичне, оскільки процедура його отримання достатньо складна. Тому багато дослідників ведуть пошуки альтернативних

джерел СК, одним з яких є кріоконсервовані СК ембріонального походження. Характер впливу даного клітинного матеріалу на ішемічні прояви досі не вивчений.

Мета дослідження. Визначити особливості впливу СК ембріонального походження на процеси ангиогенезу за умов експериментальної ішемії та перспективи їх трансплантації як методу непрямой реваскуляризації.

Матеріал і методи. Експериментальне дослідження проведено на нелінійних білих щурах ($n = 30$), що перебували при кімнатній температурі на звичайному лабораторному раціоні. Середня маса щурів становила $374,23 \pm 7,56$ г, вік – $6 \pm 1,2$ місяці. Оперативні втручання виконували під кетаміновим наркозом в умовах асептики та антисептики. Тварини поділені на 2 групи, по 15 у кожній. Тваринам I групи виконано моделювання ішемії, II групи – на фоні ішемії кінцівки вводили аlogenні СК ембріонального походження. Моделювання ішемії тканини кінцівки у щура проводили за методом Т.А.Князевої (1974): навколо судинної ніжки кінцівки проводили 2 лігатури на відстані 1 см одна від другої і перев'язували артерію разом з веною, рану поширено зашивали. Ішемічні прояви проявлялися на 3-4 добу після моделювання. Трансплантацію СК в

ішемізовані кінцівки виконували на 3-тю добу після моделювання ішемії. Клітинний матеріал вводили підфасціально тонкою смужкою на медіальній поверхні стегна. Тварин виводили з експериментального дослідження методом передозування наркозу.

Дослідний матеріал (м'язи стегна) отримували з медіальної та латеральної поверхонь дослідної кінцівки на 7-му, 14-ту та 25-ту доби після моделювання ішемії. Для електронномікроскопічного дослідження шматочки м'язової тканини фіксували в 2,5 % розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері (рН 7,2-7,4). Матеріал зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, поміщали в аралдит. Морфологічні структури контрастували в процесі зневоднення матеріалу насиченим розчином ураніацетату, а на зрізах – цитратом свинцю. Зрізи завтовшки 40-60 нм, одержані на ультратомі УМТП-3, вивчали в електронному мікроскопі ТЕСЛА БС-500.

Результати дослідження та їх обговорення. У тварин I групи на 7-му добу після моделювання ішемії у цитоплазмі ендотеліоцитів траплялися одиничні вільні рибосоми, пластинчастий комплекс мав вигляд плоских цистерн і дрібних везикул, часто розташованих компактно поблизу ядра. Навколоядерна зона містила різко просвітлений матрикс. У деяких клітинах вільний край цитоплазми мав незначну кількість широких і коротких цитоплазматичних відростків, в яких відсутні мікропіноцитозні везикули. На люменальній поверхні ендотеліоцитів виявляється невелика кількість мікроворсинок і брунькоподібних виростів, що збільшують робочу поверхню капілярів. У межах однієї ендотеліальної клітини ущільнені ділянки цитоплазми чергувалися з ділянками низької щільності. Гранулярна ендоплазматична сітка майже у всіх клітинах слабо розвинена та розширена, її профілі заокруглені. Гранули глікогену в цитоплазмі не виявлялися. Мітохондрії таких клітин мали нетипову структуру, виглядали дрібними, містили нечисленні кристи, ін-

ракристні проміжки розширені.

Наслідком неконтрольованого підвищення проникності стінки судини були субендотеліальний набряк з відшаруванням збережених ендотеліальних острівців, деструкція фібрилярної структури аморфної речовини субендотеліальної зони, накопичення грубодисперсних білків плазми та продуктів порушеного тканинного метаболізму. Це сприяло неспецифічній у відповідь реакції, а також утворенню великого числа ендотеліальних відростків, дисконплектації структур цитоскелета. Зрідка в цитоплазмі ендотеліоцитів виявлялися різних розмірів включення жиру у вигляді осміофільних утворень округлої форми (рис. 1). Контакти між клітинами в основному були простими. Ядро мало просвітлену нуклеоплазму, грубозернистий хроматин, зібраний у глибки і розташований ексцентрично біля внутрішньої ядерної мембрани. Часто траплялися ендотеліоцити, ядра яких мали ексцентрично розташований хроматин і зигзагоподібні контури. Ендоплазматична сітка таких клітин представлена короткими нечисленими трубочками. Вільна клітинна оболонка молодих ендотеліальних клітин була слабо інвагінована, утворювала одиничні мікроворсинки на поверхні.

У тварин II групи в цей же термін спостереження ендотеліоцити характеризуються різним ступенем вираженості цитоплазматичних органел. Нові ендотеліальні клітини мали збільшене ядро, чітко виражені структури цитоплазматичного матриксу, вільні рибосоми та поодинокі піноцитозні везикули. В цитоплазмі ендотеліоцитів спостерігали мітохондрії з нормальною щільністю, профілі зернистої ендоплазматичної сітки, мікротрубочки, множинні рибосоми та тільця Вейбеля-Палладе (рис. 2). Фіксували поодинокі розриви плазматичної мембрани. В деяких клітинах зазначено незначну активацію пластичних процесів, про що свідчила гіпертрофія та гіперплазія елементів ендоплазматичної сітки, пластинчастого комплексу, наявність множинних



Рис. 1. Множинні мікрворсинки, набряк цитоплазми, великі жирові включення та інвагінації ядерної оболонки активно функціонуючого ендотеліоцита. Вверху – жирова вакуоль. Зб. 20000^x.

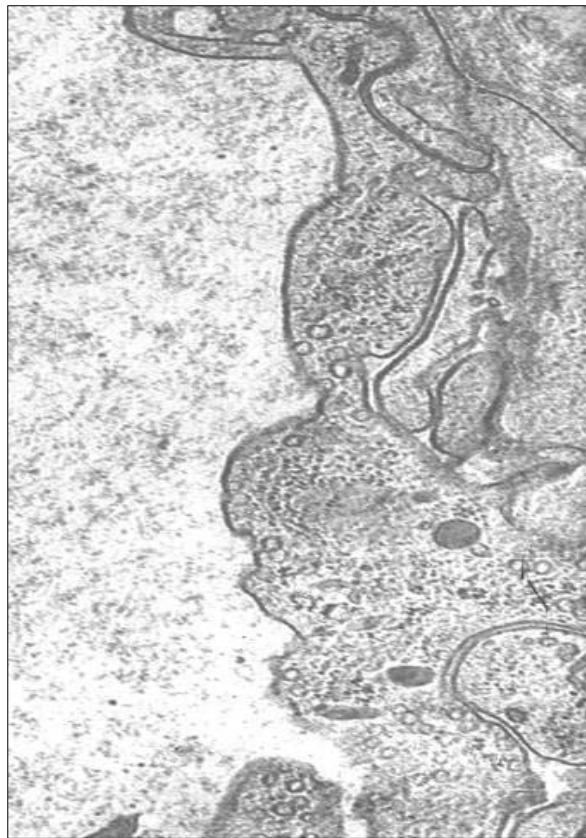


Рис. 2. Ендотелій неоканіляра з піноцитозними везикулами та наявністю гранул Вейбеля-Палладе. Зб. 20000^x.

поліморфних везикул та вакуолей. Структура капілярів характеризується мозаїчністю, яка відображала їх поліфункціональність. З одного боку, це зумовлено наявністю високо диференційованих ендотеліоцитів з відносно вираженими ознаками зрілості, з другого – збереженням пластичних властивостей, що вказує на участь у процесах формування неомікросудин. Це свідчить про поліморфізм мікроциркуляторного русла, яке формується внаслідок стимуляції ангиогенезу ембріональними СК. Спостерігалась гіперплазія цитоплазматичних виростів та ворсинок, які виступали в просвіт, та наявність гранул Вейбеля-Палладе (рис. 3).

На 14-ту добу у тварин I групи звертає на себе увагу значне скупчення у сплюсненій цитоплазмі ендотеліоцитів вільних рибосом, полісом, ліпідних включень та мікропіноцитозних везикул. Деякі набряклі мітохондрії мали розгалужені кристи та ущіль-

нений матрикс. Частині мітохондрій властиві поліморфні зміни. Ендоплазматична сітка представлена короткими нечисленними трубочками. Вільний край цитоплазми представлений широкими і короткими цитоплазматичними відростками, в яких іноді траплялися скупчення мікропіноцитозних везикул. Ущільнені ділянки цитоплазми чергувалися з ділянками низької щільності. Спостерігалась дисконплектація і розширення цистерн ендоплазматичної сітки, її профілі округлялися. Виявлялися різкі зміни мітохондріальної системи, зокрема, дисконплектація і розпрямлення крист, дисоціація їх мембран. Краї ядер нерівні, хроматин розпушений. Край цитоплазми клітин, спрямований до базальної мембрани, нерівний, цитоплазматичні відростки не глибоко вдавалися в його бік. Пластинчастий комплекс мав дуже великі везикули і розширені цистерни, розташовані в різних ділянках цитоплазми.

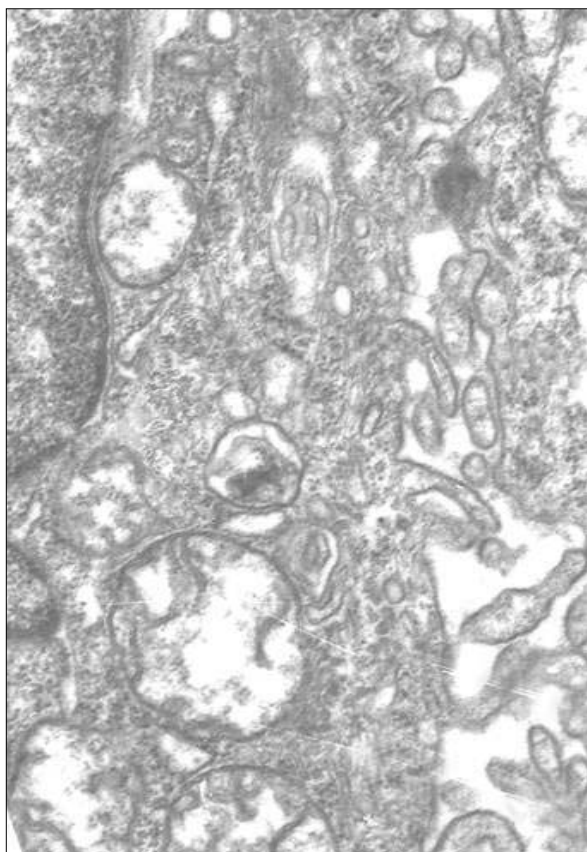


Рис. 3. Множинні мікрворсинки, просвітлені мітохондрії та гранули Вейбеля-Палладе в неендотеліоцитах. Зб. 22000^х.



Рис. 4. Ендотеліоцит з вираженими ознаками диференціювання та функціональної активності. Зб. 22000^х.

У тварин II групи у значної частини ендотеліоцитів з ущільненим матриксом фіксували достатню кількість везикул, мультивезикулярних тілець, вільних рибосом та полісом, потовщених мікрворсинок, мікрофіламентів, мікотрубочок та цистерн ендоплазматичної сітки. Останні на деяких ділянках цитоплазми перетворювались у вакуолі (рис. 4). В деяких ендотеліоцитах зберігалася гіпоплазія структурних елементів пластинчастого комплексу та ознаки набряку клітин. Фіксували наявність капілярів зі світлими, набряклими ендотеліальними клітинами, інші судини розширені та переповнені еритроцитами. Цитоплазма більшості ендотеліоцитів просвітлена, з наявністю малих розмірів мітохондрій, кристи яких мали ознаки набряку. Прекапілярний простір розширений, містив матеріал низької електронної щільності та колагенові волокна, а також незрілі молоді ендотеліоци-

ти. Останні мали збільшене ядро, незначну кількість цитоплазми, яка містила піноцитозні везикули і тісно примикала до базальної мембрани.

Наприкінці експерименту у тварин I групи просвіт капілярів звужений або трохі розширений, заповнений еритроцитами. Звуження виникало за рахунок набухання цитоплазми ендотеліоцитів. Внутрішня плазмолема останніх утворювала виступи різної форми і величини. Цитоплазма ендотеліальних клітин в основному просвітлена, мітохондрії малих розмірів, неправильної форми, в них спостерігалася фрагментація і деструкція крист. Пластинчастий комплекс в основному локалізувався біля ядра, каналці ендоплазматичної сітки розширені. У цитоплазмі спостерігалися дрібні міхурці та мікровезикули. Просвіт деяких капілярів цілком заповнений цитоплазматичним детритом десквамованих клітин. Ядра ендоте-

ліоцитів неправильної форми, їх нуклеоплазма утворювала різної глибини інвагінації. Перинуклеарний простір нерівномірно розширений, хроматин у ядрах сконцентрований в основному по периферії. У деяких капілярах виявлялося набухання цитоплазми ендотеліоцитів, що призводило до звуження судин. Ядра вказаних клітин просвітлені, хроматин локалізувався в основному по периферії нуклеоплазми. Перинуклеарний простір виглядав розширеним. Пластинчастий комплекс був у вигляді цистерн із гладкоконтурних мембранних профілів. Траплялися також капіляри, наповнені еритроцитами та з ознаками сладж-феномену. Кристи мітохондрій розширені, часто деструктивно змінені. Кількість вільних рибосом була зменшеною. Люменальна поверхня ендотеліоцитів практично не містила мікрворсинок. У везикулярному компоненті пластинчастого комплексу траплялися міхурці переважно дрібних розмірів. При цьому окремі ендотеліоцити містили одиничні ліпосоми. У прекапілярних просторах, які часто були розширеними і просвітленими, локалізувалися колагенові волокна. Спостерігалися також капіляри, стиснуті сполучною тканиною, в деяких з них просвіт не визначався.

Дані електронної мікроскопії у тварин II групи на 25-ту добу дослідження характеризувалися тим, що на люменальній поверхні ендотеліоцитів мала місце значна кількість відростків, що збільшувало протяжність та площу структур, які забезпечували трансендотеліальний транспорт. Позаклітинний матеріал складався з незмінених або розщеплених колагенових фібрил, фрагментів еластичних волокон, деякої кількості зернистої речовини. Гранулярна та агранулярна ендоплазматична сітки добре розвинуті та представлені внутрішньо-

клітинними канальцями та цистернами. Цитоплазматичний матрикс зниженої електронної щільності, містив вільні рибосоми. Вздовж внутрішньої поверхні клітинної оболонки розміщувалися множинні мікрворсинки. Численні піноцитозні міхурці розташовувалися переважно поблизу внутрішньої поверхні цитоплазматичної мембрани. Траплялася також значна кількість піноцитозних міхурців, мікрофібрил та мікрофіламентів у цитоплазмі клітин ендотелію. Частина таких міхурців збільшувалася в розмірах та перетворювалася на великі вакуолі.

Отже, застосування кріоконсервованих СК ембріонального походження сприяє активній клітинній перебудові, відновленню ендотеліоцитів та формуванню неокапілярів. Не виключено, що поряд зі звичайною проліферацією материнського ендотелію відбувається трансформація та ендотеліальне диференціювання трансплантованих СК. Крім того, понижений рівень процесів деструкції клітин у тварин II групи пов'язаний з тим, що дія клітин відбувається на тлі вже активованих ішемією збережених ендотеліоцитів. Клітини ендотелію виявляють особливу стійкість до пошкодження та високу активність внутрішньоклітинних репаративних процесів.

Висновок та перспективи подальших досліджень. При експериментальній ішемії кінцівок застосування стовбурових клітин ембріонального походження сприяє активації процесів ангіогенезу за рахунок стимуляції репаративних процесів та їх безпосередньої трансформації. Перспективним є клінічне застосування трансплантації ембріональних стовбурових клітин у комплексному лікуванні хворих на "нереконструктабельні" ураження дистального артеріального русла.

Література

1. Dormandy J.A. Fate of the patient with chronic leg ischaemia / J.A.Dormandy, M.Nahir, G.Ascady // *J. Cardiovasc. Surg.* – 1999. – Vol. 30. – P. 50-57.
2. Pell J.P. Epidemiology of critical limb ischaemia / J.P.Pell, F.G.R.Fowkes // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2005. – № 2. – P. 23-29.
3. Дрюк Н.Ф. Непрямые методы реваскуляризации при хронической критической ишемии как альтернатива ампутации / Н.Ф.Дрюк, А.В.Самсонов // *XX з'їзд хірургів України: матер.* – Тернопіль, 2002. – С. 591-593.
4. Caplan A.I. Mesenchemal

stem cells: building blocks for medicine in the 21st century / A.I.Caplan, S.P.Bruder // Trends in Molecular Medicine. – 2001. – Vol. 7. – P. 259-264. 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.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОЦЕССЫ АНГИОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Резюме. Исследование проведено с целью изучения перспективности использования клеточных препаратов эмбрионального происхождения для активации процессов ангиогенеза в условиях ишемии. На субмикроскопическом уровне доказана эффективность применения эмбриональных стволовых клеток с целью стимуляции процессов ангиогенеза de novo при ишемии конечности.

Ключевые слова: ишемия, непрямая ревазуляризация, электронная микроскопия.

THE INFLUENCE OF TRANSPLANTING THE STEM CELLS ON THE PROCESSES OF ANGIOGENESIS UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ISCHEMIA

Abstract. An experimental study has been carried out with the purpose of investigating prospects of using cellular preparations of the embryonic origin in order to activate the processes of angiogenesis under conditions of ischemia. The efficacy of applying embryonal stem cells for the purpose of stimulating the processes of angiogenesis de novo in case of the submicroscopic level.

Key words: ischemia, indirect revascularization, electron microscopy.

O.O.Shalimov National Institute of surgery and taransplantology of Ukraine SAMS (Kyiv)

Надійшла 25.03.2009 р.

Рецензент – д. мед. н. Ф.В.Гринчук (Чернівці)

© Салютін Р.В.

**Науково-практична конференція
з міжнародною участю**

**"Актуальні питання
торакоабдомінальної хірургії",
присвячена 50-річчю кафедри
торакоабдомінальної хірургії,
заснованої акад. О.О.Шалімовим**

**8-9 жовтня 2009 року
м. Харків**

Адреса оргкомітету:

Харківська медична академія післядипломної освіти
вул. Корчагінців, 58
м. Харків, 61176
Тел. (057)343-07-55