УДК 616-089.843:611.36+611.013+611.4+57.083

©Р. В. Салютін, С. С. Паляниця, Л. А. Панченко, В. А. Шаблій, Г. С. Лобинцева, Р. М. Борис
Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

ГІСТОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КЛІТИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

ГІСТОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КЛІТИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ – Фетальна печінка є унікальним та недостатньо дослідженим джерелом гемопоетичних стовбурових клітин. Відомо, що стовбурові клітини фетальної печінки здатні до диференціювання в адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямку, однак ці наукові дослідження проводили in vitro та з додаванням до культиваційних середовищ певних чинників, що сприяли процесу диференціації у необхідному напрямку. Дослідження особливостей диференціації ГСКФП in vivo дозволяє спрогнозувати можливі напрямки клітинної диференціації та обґрунтувати практичне застосування методу клітинної трансплантації.

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ – Фетальная печень является уникальным и недостаточно исследованным источником гемопоэтических стволовых клеток. Известно, что стволовые клетки фетальной печени способны к дифференцировке по адипогенному, хондрогенному и остеогенному направлению, однако эти научные исследования проводились in vitro, с добавлением к культивационным средам определенных факторов, которые способствовали процессу дифференциации в требуемом направлении. Исследование особенностей дифференциации ГСКФП in vivo позволяет спрогнозировать возможные направления клеточной дифференцировки и обосновать практическое использование метода клеточной трансплантации.

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PECULIARITIES OF DIFFERENTIATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF FETAL LIVER UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF EXPERIMENTAL CELL TRANSPLANTATION – Fetal liver is a unique and not studied source of hematopoietic stem cells. It is known that fetal liver stem cells are capable of differentiation into adipogenous, hondrogenous and osteogenic direction, but these scientific researches were conducted in vitro and added to the cultural medium some factors that support process of differentiation in the right direction. Studying of the peculiarities of HSCFL differentiation in vivo allows to predict the possible directions of cell differentiation and establish practical using of cell transplantation method.

Ключові слова: ішемія, стовбурові клітини, диференціація.
Ключевые слова: ишемия, стволовые клетки, дифференциация.
Key words: ischemia, stem cell, differentiation.

ВСТУП В останнє десятиліття у клінічну практику лікування хворих з “нереконструктабельним” ураженням периферичних артерій кінцівок увійшли методи клітинної стимуляції ангіогенезу, що ґрунтуються на застосуванні аутологічних стовбурових клітин кісткового мозку [1]. Однак процедура отримання виділеної культури мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку достатньо складна, а в результаті вдається отримати мезенхімальні клітини з низьким потенціалом трансдиференціювання [2].

Окрім того, з кожним роком зменшується здатність аутологічної стовбурової клітини до проліферації, має місце послаблення фенотипічної характеристики, збільшується відсоток дефектних генів, що додатково в декілька разів зменшує її здатність до диференціації і розвитку та зумовлює значний ризик виникнення новоутворень, наприклад саркоми Юінга. Джерелом активних, та що достатньо важливо, плюрипотентних стовбурових клітин є фетальна печінка. Гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки (ГСКФП) мають значний, однак на сьогодні мало досліджений, потенціал клітинної диференціації [3].

Відомо, що ГСКФП здатні диференціюватися в адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямках, однак наукові дослідження зі стовбуровими клітинами проводились in vitro та з додаванням до культиваційних середовищ певних чинників, що сприяли процесу диференціації в необхідному напрямку. Дослідження особливостей диференціації ГСКФП in vivo дозволяє спрогнозувати можливі напрямки клітинної диференціації та обґрутувати практичне застосування методу клітинної трансплантації.

Метою дослідження стало за допомогою імуногістохімічних та гістологічних методів дослідити напрямки диференціації гемопоетичних клітин фетальної печінки при різних умовах експериментальної трансплантації.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Дослідження виконано на 80 нелінійних білих щурах, які знаходились у стандартних умовах віварію. Середня маса щурів складала (375,0±8,0) г, вік – (6,0±1,2) місяця. Операційні втручання проводили під кетаміновим наркозом зі збереженням всіх умов асептики та антисептики.

Тварин було поділено на 3 групи. Перша (контрольна) група – тварини, у яких було змодельовано ішемію кінцівки. Моделювання ішемії задньої кінцівки у щура проводили за методом Т. А. Князевої [4]. Друга група – тварини, яким в інтактні м’язи кінцівки трансплантовано ГСКФП. Третя група – тварини, яким на тлі ішемії кінцівки (3 доба змодельованої ішемії) було введено підфасціально смужкою по медіальній поверхні стегна ГСКФП людини 6–8 тижнів гестації.

У тварин першої та третьої груп дослідний матеріал (м’язи стегна з медіальної та латеральної поверхні дослідної кінцівки) отримували на 3, 5, 7, 14, 21 та 25 доби після моделювання ішемії на кінцівці. Біопсію м’язової тканини у щурів другої групи виконували на 7–12–22 доби після клітинної трансплантації.

Надалі отримані біоптати м’язової тканини було досліджено за допомогою імуногістохімічних (визначали експресію віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда) та гістологічних методів (забарвлення гематоксиліном і еозином та пікрофуксином за Ван-Гізон).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Імуногістохімічні характеристики віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда у щурів конт-

рольної групи були нерівномірно виражені й змінювалися відносно динаміки ішемічного ураження.

Результати гістологічного дослідження біоптатів м'язової тканини на першу, а особливо на 3-4 добу експерименту свідчили про наявність у венозних судинах вираженого вогнищевого повнокров'я і стазу еритроцитів. Фіксували наявність вогнищевого та нерівномірного периваскулярного набряку, при цьому частина ендотеліальних клітин судин була некротизованою та злущеною. Судинна стінка була нерівномірно інфільтрована макрофагами та лімфоцитами. Відмічено активацію гістіоцитів, особливо макрофагів.

На 3 та 7 добу експериментальної ішемії у повнокровних судинах ендомізію та перимізію особливо була виражена імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, та мала чітку тенденцію до зменшення на інші терміни дослідження.

На 7–14 добу експерименту деструктивні зміни морфоструктури м'язової тканини поглиблювались. Фіксували прогресивне (порівняно з 1–3-добою експерименту) наростання деструктивних процесів у м'язових волокнах з наявністю вогнищ некрозу, ліпідної дистрофії, вакуолізації та набряку. Спостерігали десквамацію та некроз ендотеліальних клітин з наступною облітерацією просвіту капілярів.

У цей проміжок часу зафіксовано найбільше вираження експресії колагену IV типу в стінці повнокровних артеріальних судин та вогнищево у розволокненній стінці венул, пов'язане з руйнуванням ендотеліоцитів, повнокров'ям судин та викидом досліджуваних маркерів із зруйнованих ендотеліоцитів.

Експресія віментину також була найбільш вираженою на 7–14 добу від початку моделювання ішемії, у міжм'язових волокнах, що оточують судинні пучки, а також в мембранах стінок вен та артеріол (рис.1).

Аналіз результатів гістологічного дослідження біоптатів м'язової тканини щурів контрольної групи свідчив про поступове зменшення розладів кровообігу в судинах м'язової тканини до 20–25 доби експерименту. Однак доволі часто фіксували наявність вогнищ фуксинофілії, фібропластичних змін стінки судин, спостерігалось потовщення та фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучної тканини (рис. 2).

Результати імуногістохімічних дослідженнь біоптатів м'язової тканини тварин другої групи (трансплантація клітин фетальної печінки в інтактну м'язову тканину) свідчили про незмінність експресії досліджуваних чинників на всіх термінах експерименту. Експресія моноклональних антитіл до віментину, колагену IV типу, а також до фактора Віллебранда не відрізнялась від експресії в інтактній м'язовій тканини. Тільки на 12 та 22 добу після клітинної трансплантації на поодиноких досліджуваних зразках було відмічено вогнища перемізіального набряку, переваскулярну активацію макрофагів та гістоцитів (рис. 3), що найімовірніше пов'язано з реакцією тканинного імунітету інтактної м'язової тканини на клітинну трансплантацію.

У щурів третьої групи, починаючи з 7 доби експериментальної ішемії (4 доба після трансплантації ГСКФП), спостерігали за формуванням судинних структур, які фіксують на імуногістохімічному рівні за допомогою реакції на віментин (рис. 4).

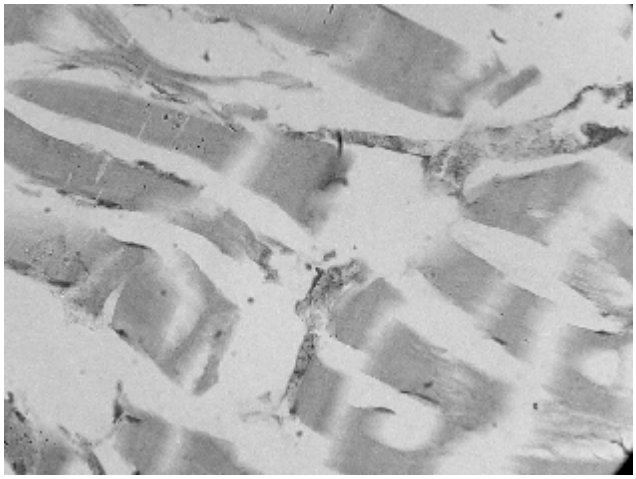

Рис. 1. Перша група. Сьома доба ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 20.

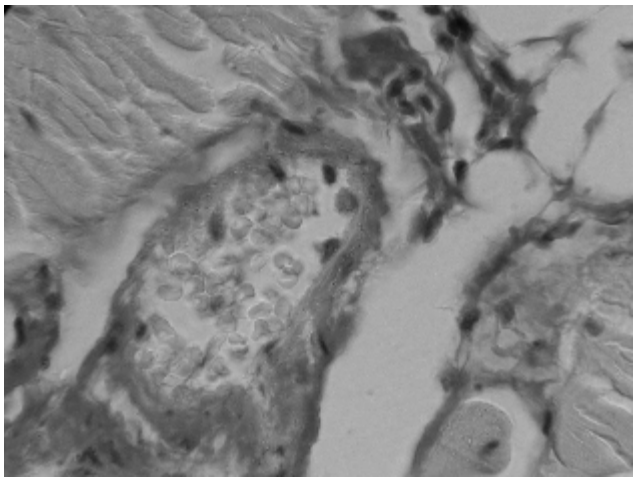

Рис. 2. Перша група. Двадцять п'ята доба змодельованої ішемії. Міопласт з ділянками периваскулярного фіброзу. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізон. Мікрофотографія. Об.10, ок. 10.

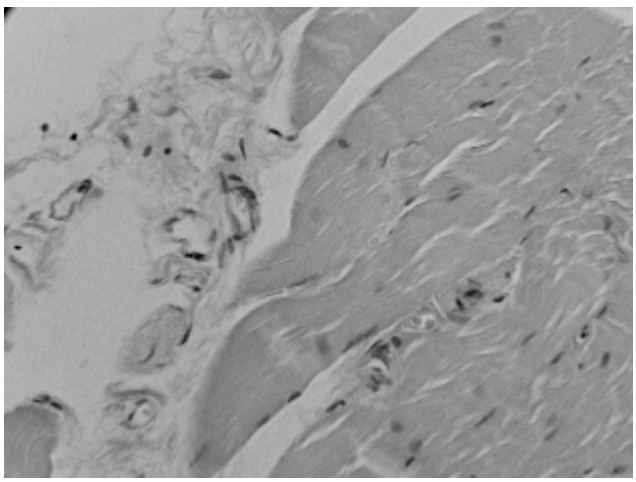

Рис. 3. Друга група. Двадцять друга доба після клітинної трансплантації. Міосимпласт, вогнища макрофагів, гістоцитів у перемізії. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Мікрофотографія. Об.10, ок. 20.

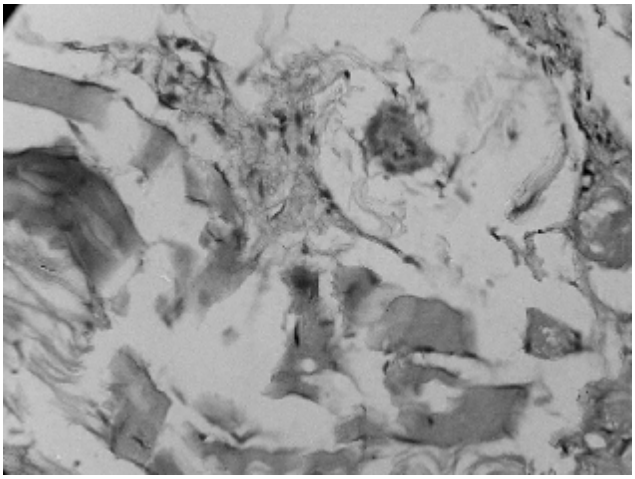

Рис. 4. Третя група. Експресія мезенхімального чинника віментин в судинних структурах, що формуються. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 40.

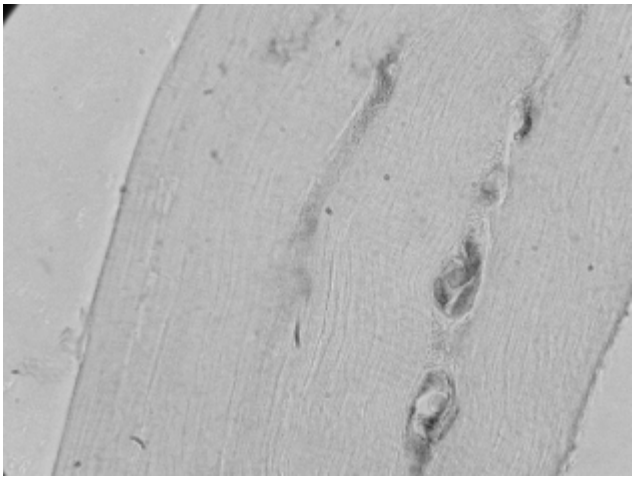

Рис. 5. Третя група. Двадцять друга доба після клітинної трансплантації. Експресія фактора Віллебранда в новоутворених судинах, що розташовуються в ендомізії. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, об. 40.

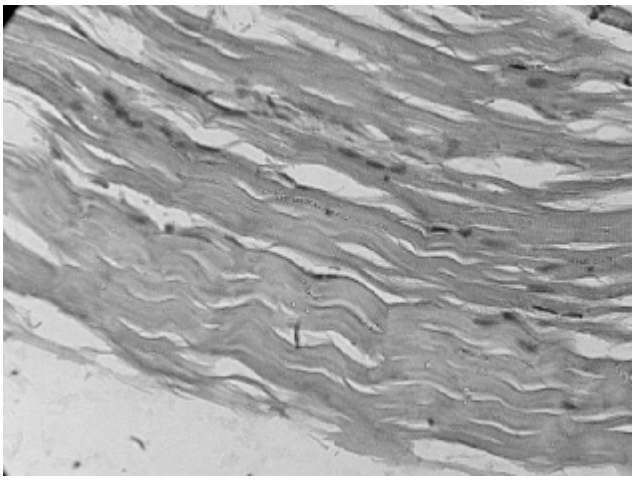

Рис. 6. Третя група. Четверта доба після клітинної трансплантації. Структура міосімпласту без змін. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Мікрофотографія. Об.10, ок. 20.

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

Починаючи з 11 доби, після трансплантації ГСКФП, спостерігали ознаки появи молодих ендотеліоцитів, а на 22 добу після клітинної трансплантації, виражену експресію фактора Віллебранда було виявлено в новоутворених судинах, що розташовувались в ендомізії та вогнищах міопласту, а також в міжм'язових волокнах у вигляді первинних судин (рис. 5).

Дані проведеного гістологічного дослідження свідчили, що на 2–4 добу після трансплантації ГСКФП в міопласті мали місце мозаїчні зміни, – переважала кількість незмінених структур, які відповідали тканинним характеристикам непошкодженої м'язової тканини (рис. 6). На 14 добу змодельованої ішемії (11 доба після клітинної трансплантації) спостерігали наявність невеликих вогнищ проліферуючих молодих клітинних форм фібробластів та макрофагальну реакцію.

ВИСНОВКИ Результати проведеного експериментального дослідження свідчили про патологічний вплив ішемічного стану, що призводить до істотної структурно-функціональної руйнації як самої м'язової тканини, так і капілярного русла трансплантації ГСКФП на тлі експериментальної ішемії. А також до активної стимуляції регенераторних процесів і ангіогенезу, на що наказує поступове (вже з 4 доби після трансплантації ГСКФП) збільшення експресії віментину та фактора Віллебранда, який локалізується в стінці новоутворених артеріальних судин. Окрім того, у щурів третьої групи протягом всього терміну дослідження відмічено значне зменшення фіброзування м'язової тканини, що підтверджується динамікою змін експресії колагену IV типу та мезенхімального чинника віментину.

Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин в інтактну м'язову тканину експериментальних щурів не приводила до жодних змін в імуногістохімічних реакціях, тобто ключовим моментом, що направляє процес диференціації стовбурових клітин, є характер середовища, де трансплантовані клітини спричиняють їх зміни в необхідному напрямку та у межах потенціалу диференціації.

Перспективи подальших досліджень Трансплантація стовбурових клітин фетальної печінки сприяє відновленню зруйнованої мікроциркуляторної мережі м'язової тканини як за рахунок стимуляції власних регенераторно-компенсаторних механізмів, так і за рахунок диференціації стовбурових клітин у первинні ендотеліоцити, з яких і формується неокапіляр, що має бути використано у клінічних дослідженнях в ході лікування хронічних ішемічних станів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Киримов В. И. Новые возможности реваскуляризации конечности при хронической ишемии: индукция ангиогенеза путем аутотрансплантации аспирата костного мозга у больних с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей / В. И. Киримов // Клінічна хірургія. – 2009. – № 5. С. 27–30.

2. 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. – Vol. 5, № 4. – P. 278–299.

3. Кухарчук А. Л. Стволовые клетки: експеримент, теория, клиника. Эмбрональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки/ А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман. – Черновцы : Золоті литаври, 2004. – 505 с.

4. Князева Т. А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т. А. Князева // Вестн. акад. мед. наук СССР. – 1974. – № 12. – С. 3–8.

Отримано 30.11.12