

*ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”*

Здобутки клінічної і експериментальної медицини

Науково-практичний журнал

*HSEI “Ternopil State Medical University
by I. Ya. Horbachevsky of MPH of Ukraine”*

Achievements of Clinical and Experimental Medicine

Scientific and Practical journal

1(18)/2013

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

Головний редактор – Бабінець Л. С.
Відповідальний секретар – Андрішин О. П.

Ковальчук Л. Я.
Швед М. І.
Яшан О. І.
Волков К. С.
Бігуняк В. В.
Мисула І. Р.
Гнатюк М. С.
Грубник В. В.

РЕДАКЦІЙНА РАДА:

Андрейчин М. А. (Тернопіль)
Андрейчин С. М. (Тернопіль)
Боднар Я. Я. (Тернопіль)
Вадзюк С. Н. (Тернопіль)
Галайчук І. Й. (Тернопіль)
Геряк С. М. (Тернопіль)
Голяченко О. М. (Тернопіль)
Гонський Я. І. (Тернопіль)
Гощинський В. Б. (Тернопіль)
Грошовий Т. А. (Тернопіль)
Гудима А. А. (Тернопіль)
Дем'яненко В. В. (Тернопіль)
Зербіно Д. Д. (Львів)
Климнюк С. І. (Тернопіль)
Кліщ І. М. (Тернопіль)
Колесник Ю. М. (Запоріжжя)
Кресюн В. Й. (Одеса)
Луцик О. Д. (Львів)
Маланчук Л. М. (Тернопіль)
Пасечко Н. В. (Тернопіль)
Посохова К. А. (Тернопіль)
Середюк Н. М. (Івано-Франківськ)
Сміян С. І. (Тернопіль)
Файфура В. В. (Тернопіль)
Федорців О. Є. (Тернопіль)
Фіра Л. С. (Тернопіль)
Черних В. П. (Харків)
Шкробот С. І. (Тернопіль)

ЗДОБУТКИ КЛІНІЧНО І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО МЕДИЦИНИ

(науково-практичний журнал)

Заснований у 2003 році.
Виходить 2 рази на рік.

Свідоцтво про державну реєстрацію:
серія ПР № 16983-5753 від 29.06.2010 р.

Журнал “Здобутки клінічної і експериментальної медицини” включено до переліку наукових фахових видань ВАК України. Протокол № 1-05/3 від 14.04.2010 р. (медичні науки, біологічні науки, фармацевтичні науки)

Засновник і видавець:
ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”

Адреса редакції:
Журнал
“Здобутки клінічної і експериментальної медицини”

Майдан Волі, 1
м. Тернопіль, 46001
УКРАЇНА

Тел.: (0352) 434956
(0352) 431133
Факс: (0352) 524183
e-mail: zdobutky@tdmu.edu.te.ua

*Рекомендовано до видання вченою радою
Тернопільського державного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського
(протокол № 12 від 26.03.2013 р.)*

Рукописи рецензуються.

*Редколегія залишає за собою право редагування.
За істинність наведених результатів і реклами
відповідальність несуть автори і рекламодавці.*

У разі передруку матеріалів посилання на журнал обов'язкове.

ТДМУ

Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, УКРАЇНА

Відповідальна за випуск	Л. С. Бабінець
Редагування і коректура	Л. П. Капкаєва
Комп'ютерна верстка	І. Т. Петрикович
Оформлення обкладинки	П. С. Кушик

Підписано до друку 27.03.2013. Формат 60×84/8.
Гарнітура Pragmatica.
Друк офсетний. Ум. др. арк. 21,39. Обл.-вид. арк. 21,40.
Наклад 600. Зам. № 113

Надруковано в друкарні видавництва
Тернопільського державного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського
Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, УКРАЇНА

ГІСТОЛОГІЧНА СТРУКТУРА М'ЯЗОВО ТКАНИНИ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА АНГІОГЕНЕЗУ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІ АСПІРАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНО ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ІШЕМІ

©Р. В. Салютін¹, Д. Б. Домбровський², С. С. Паляниця¹, Л. А. Панченко¹,
В. М. Сірман¹, В. А. Шаблій¹

Координаційний центр трансплантації органів тканин і клітин МОЗ України¹

Буковинська обласна клінічна лікарня²

РЕЗЮМЕ. Проведено експериментальне дослідження з метою вивчення перспективності використання клітинних препаратів ембріонального походження для активації процесів ангиогенезу в умовах ішемі.

З використанням гістологічних та імуногістохімічних методів доведена активація процесів неангиогенезу de novo після трансплантації стовбурових клітин фетально печінки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ішемія, гістологія, імуногістохімія, стовбурові клітини.

Вступ. Не зважаючи на досягнення сучасно ангиохірургії, відсоток незадовільних результатів після виконання реконструктивно-відновних втручань у хворих з оклюзійним та облітеруючим ураженням периферійного артеріального русла залишається достатньо високим, а у 40 % хворих виконати оперативне втручання взагалі неможливо, у зв'язку з відсутністю анатомічних передумов [1, 2]. Все частіше сьогодні з'являються дослідження щодо використання методу терапевтичного ангиогенезу у пацієнтів з «нереконструктабельним» ураженням судинного русла, в тому числі за рахунок трансплантації стовбурових клітин кісткового мозку [3, 4].

Однак клінічне використання кісткового мозку в якості джерела мезенхімальних стовбурових клітин проблематичне, оскільки процедура його отримання достатньо складна і в результаті вдається зібрати малу кількість клітин, що поміж тим мають низький потенціал трансдиференціювання дорослих мезенхімальних клітин [5]. Більш високі потенції до стимуляції процесів ангиогенезу мають гемопоетичні стовбурові клітини фетально печінки людини 6–8 тижнів гестації, що експресують CD 34⁺, CD 38⁺, CD 45Ra^{low}, CD 71^{low}, що обумовлюють теоретичне підґрунтя щодо їх застосування з метою стимуляції ангиогенезу за умов ішемі.

Мета дослідження – дослідити за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів особливості процесів ангиогенезу після трансплантації аспірату кісткового мозку та гемопоетичних стовбурових клітин фетально печінки за умов ішемі в експерименті.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження виконано на 90 нелінійних білих щурах, які перебували у стандартних умовах віварію. Середня маса щурів складала (372,0±7,6) г., вік – (6,0±1,2) місяці. Хірургічні втручання проводились

під кетаміновим наркозом з дотриманням всіх умов асептики та антисептики.

Тварини були поділені на 3 групи: I (контрольна) група – тварини, у яких була змодельована ішемія кінцівки. Моделювання ішемі задньої кінцівки у щура проводили за методом Т. А. Князево [6]. II група – тварини, яким на 3 добу експериментально ішемі в м'язи стегна вводили аlogenний аспірат кісткового мозку, одержаний з діафізів стегнових кісток. III група – тварини, яким на фоні ішемі кінцівки (3 доба змодельовано ішемі) були введені підфасціальну смужку по медіальній поверхні стегна ГСКФП людини 6–8 тижнів гестації.

У тварин I групи дослідний матеріал (м'язи стегна з медіальною та латеральною поверхні дослідно кінцівки) отримували на 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 та 25 добу після моделювання ішемі на кінцівці. Біопсію м'язової тканини у щурів II та III груп виконували на 2, 4, 11, 19, 22 після клітинно трансплантації, тобто на 5, 7, 14, 21 та 25 добу після моделювання ішемі.

Надалі отримані біоптати м'язової тканини були досліджені за допомогою імуногістохімічних (визначалась експресія віментину, колагену IV типу та фактора Віллебранда) та гістологічних методів (збарвлення гематоксиліном-еозином та пікрофуксином по Ван-Гізон).

Результати й обговорення. На 1–5 добу змодельовано ішемі у всіх експериментальних тварин спостерігали розлади кровообігу та зміни реологічних властивостей крові, особливо в венозних судинах. На першу, а особливо на другу та третю доби спостереження в венозних судинах фіксували виражене вогнищеве повнокров'я і стаз еритроцитів, що мало місце в 90 % досліджених препаратів (рис. 1).

Фіксували наявність периваскулярного набряку, частина ендотеліальних клітин судин була

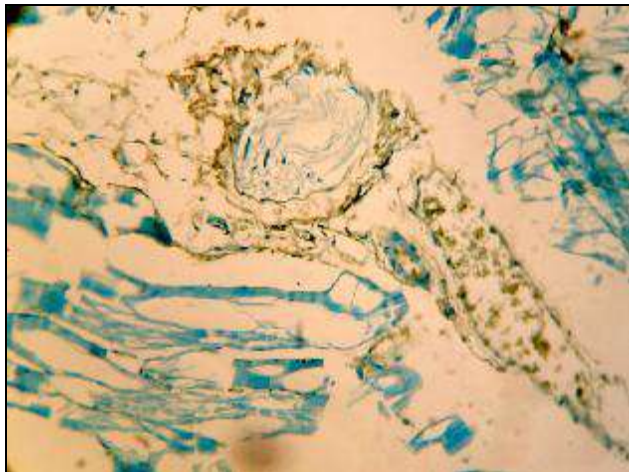


Рис.1. Група I. Сьома доба ішемі. Експресія віментину в перимізі довкола судин. Непрямий стрептовідін-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 20.

некротизованою та злуценою. Судинна стінка нерівномірно інфільтрована макрофагами та лімфоцитами. Втрачалася окресленість м'язових волокон, еозинofilія та з'являлася базофілія. Відмічалася активація гістіоцитів, особливо макрофагів.

На 7–14 доби спостереження відмічали прогресивне збільшення деструктивних процесів в м'язових волокнах з наявністю ділянок некрозу, ліпідно дистрофі, вакуолізації та набряку. Спостерігали прогресуючу десквамацію та некроз ендотеліальних клітин з наступною облітерацією просвіту судин. Зустрічалось розшарування і набряк судинної стінки, на тлі набряку міжм'язових ділянок спостерігали крововиливи. На 14 добу експериментально ішемі в деяких біоптатах спостерігали ділянки лімфо-макрофагально гістіоцитарно реакції в 35 % випадків з наступною тенденцією до зменшення.

На 21–25 доби експериментально ішемі в більшості спостережень повнокров'я та стази були менш вираженими – 20 % випадків. Однак з'являлися фібропластичні зміни стінки судин, спостерігалися потовщення та фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучно тканини. Параметри та імуногістохімічні характеристики віментину, колагену IV типу і фактора Віллебранда були виражені нерівномірно та змінювались згідно з динамікою ішемічного процесу.

Імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, була особливо виражена на 2 і 7 доби експериментально ішемі в повнокровних судинах ендомізію та перимізію.

Найбільш виражену експресію віментину в міжм'язових волокнах, які оточують судинні пучки, а також в мембранах стінки судин венозного і ар-

теріального типів спостерігали на 7–14 добу ішемі. У цей термін в стінці повнокровних артеріальних судин та ділянках розшаровано стінки венул була найбільш вираженою експресія колагену IV типу (рис. 2).

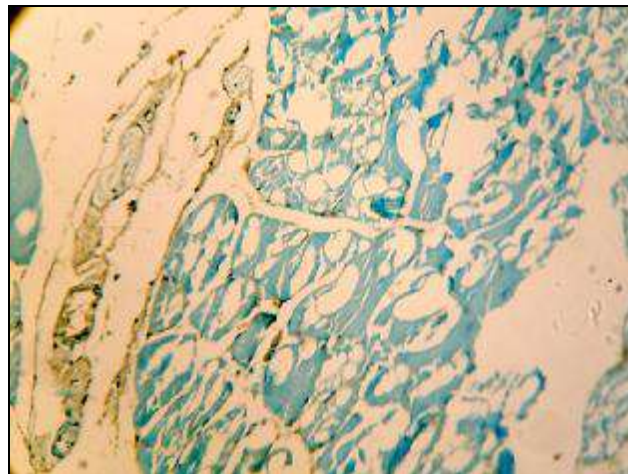


Рис. 2. Група I. Двадцять п'ята доба. Експресія віментину в перимізі довкола судин. Непрямий стрептовідін-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 20.

Таким чином, з 2 до 14 доби ішемічного ураження в м'язовій тканині фіксуються значні патологічні зміни, а саме – розлад кровообігу в судинах, особливо венозного типу, деструкція та дистрофічне перетворення м'язових волокон. Прояв дегенеративно-дистрофічних змін в м'язовій тканині та капілярній мережі на 20–25 доби експерименту дещо зменшувався, проте з'являлося виражене фіброзування і склероз стінки судин в перимізі.

Дещо збільшена експресія віментину, фактора Віллебранда та колагену IV типу може свідчити як про незначну короткотривалу регенераторно-компенсаторну реакцію ендотелію на ішемічне ураження, так і про викид досліджуваних маркерів з зруйнованих ендотеліоцитів.

В біоптатах тварин II групи на 2–4 і 11–19 добу після трансплантації аспірату кісткового мозку, в тканинах м'язового симпласту та судинах, які розташовані в проміжній тканині, у всіх спостереженнях переважали деструктивно-дистрофічні процеси. Патологічні зміни характеризуються нерівномірністю, мають вогнищеву або дифузну структуру. Крім того, дистрофія м'язових волокон супроводжується зникненням поперечно пошарованості та локальною гомогенізацією.

В 20 % спостережень фіксували наявність в перимізі поодиноких ділянок лімфо-макрофагально інфільтрації на тлі ліпідно дистрофі м'язових волокон (рис. 3).

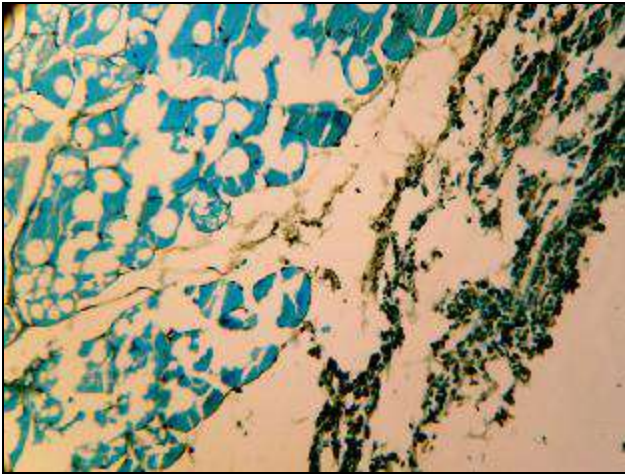


Рис. 3. II група. Позитивна експресія колагену IV типу в ніжноволокнистих структурах у вогнищі лімфомакрофагально інфільтрації. Непрямий стрептовідін-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 10.

На 11–22 добу після введення аспірату кісткового мозку в досліджуваних біоптатах фіксували наявність нерівномірного повнокров'я судин та вираженого вогнищового периваскулярного набряку (рис. 4).

Поряд з патологічними змінами спостерігали ознаки регенераторних процесів та поступове зменшення дистрофічних проявів в м'язових симпластах. На 19 добу після трансплантації на гістохімічному рівні фіксували наявність компенсаторно реакції. Особливо це спостерігалось при вивченні фактора Віллебранда, який проявлявся у вигляді позитивної реакції в мезенхімальних структурах перимізію

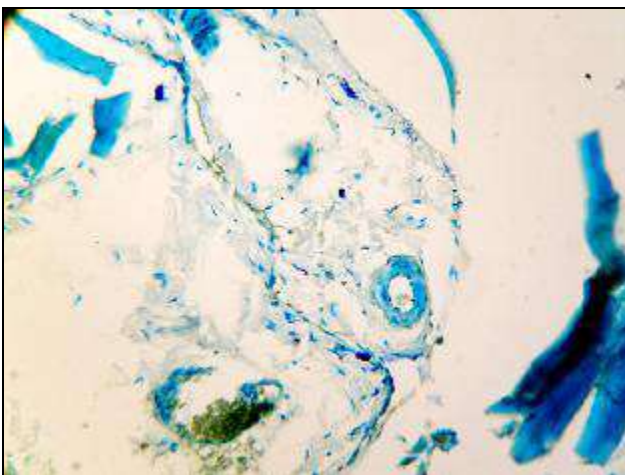


Рис. 4. II група. Виразений периваскулярний набряк та вогнища слабо експресії віментину на 17 добу експерименту. Непрямий стрептовідін-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 10.

та зрідка ендомізію та у незрілих клітинних утвореннях, які розташовувались поодинокими групами, формуючи "нове" судинне русло (рис. 5). При дослідженні біоптатів м'язової тканини, на 22 добу експерименту були виявлені розташовані інтраперимізіально дрібні венулярні судини.

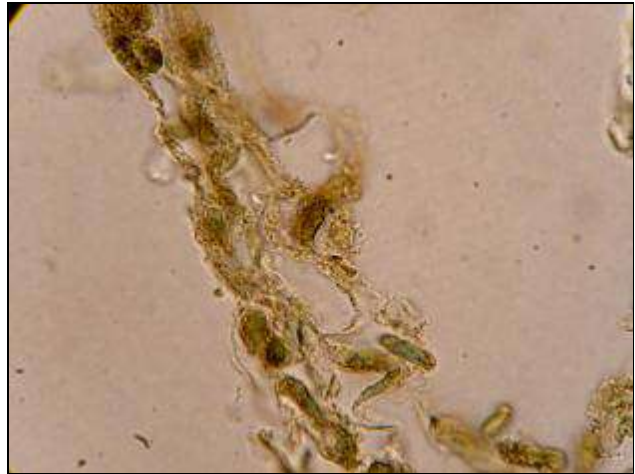


Рис. 5. II група. Експресія фактора Віллебранда на 19 добу після трансплантації в клітинних структурах перимізію, формування судинного русла. Непрямий стрептовідін-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10, Об. 40.

Дані проведеного гістологічного дослідження свідчать що, на 2–4 добу після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки в міопласті мали місце мозаїчні зміни – переважала кількість незмінених структур, які відповідали тканинним характеристикам інтактно м'язової тканини. На 11–19 добу спостерігали наявність невеликих вогнищ проліферуючих молодих клітинних форм фіброblastів та макрофагальну реакцію.

Починаючи з 2 доби після трансплантації ГСКФП в ендотеліальних клітинах спостерігалась помірна експресія фактора Віллебранда, яка поступово збільшувалась, та на 19–22 доби після клітинної трансплантації спостерігалась виражена експресія фактора Віллебранда в новоутворених судинах, які розташовувались в ендомізії та вогнищах міопласту, а також в міжм'язових волокнах у вигляді первинно капілярно мережі.

З 4–11 доби експерименту фіксували активне прогресування процесів ангиогенезу, мало місце формування неокapіляра що підтверджувалось позитивною експресією віментину в судинних структурах (рис. 6).

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

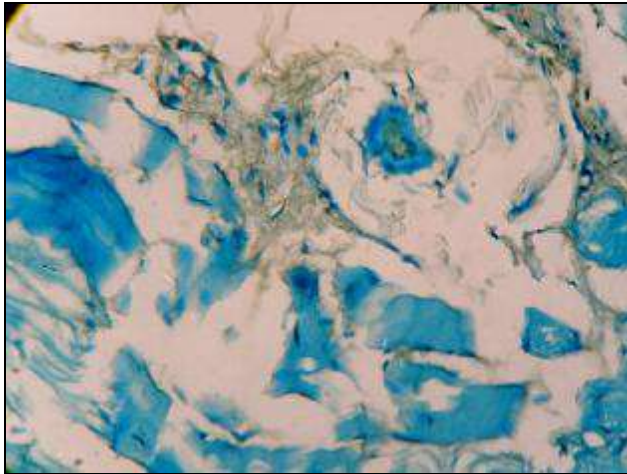


Рис. 6. III група. Експресія віментину в судинних структурах що формуються. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія x 400.

Висновки. 1. Ішемічний стан призводить до істотно структурно-функціонально руйнації як само м'язової тканини, так і капілярного русла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клеточная терапия хронической ишемии нижних конечностей / А. Б. Смолянинов, О. Г. Хурцилава, Е. В. Жаров [и др.] // АГ-инфо. – 2007. – № 3. – С. 10–15.
2. Лазаренко В. А. Лечение критической ишемии нижних конечностей с использованием серотонина / В. А. Лазаренко, А. П. Симоненко, Е. В. Лазарев // Ангиология и сос. хирургия. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 130–136.
3. Taylor S. M. Current status of heroic limb salvage for critical limb ischemia / S. M. Taylor // Am. Surg. – 2008. – Vol. 74, №4. – P. 275–284.
4. Alvarez-Dolado M. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes / M. Alvarez-Dolado // Nature. – 2003. – Vol. 425. – P. 968–973.
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.
6. Князева Т. А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т. А. Князева // Вестн. Акад. Мед. наук СССР. – 1974. – № 12. – С. 3–8.

HISTOLOGICAL STRUCTURE OF THE MUSCULAR TISSUE AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ANGIOGENESIS AFTER TRANSPLANTATION OF BONE MARROW ASPIRATE AND HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF FETAL LIVER UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ISCHEMIA

©R. V. Saliutin¹, D. B. Dombrovskiy², S. S. Palianytsia¹, L. A. Panchenko¹, V. M. Sirman¹, V.A. Shabliy¹

¹Coordinating Center of Transplantation for Organs, Tissue and Cells of MPH of Ukraine

²Bukovynian Regional Clinical Hospital

SUMMARY. Experimental examination was made with the purpose to learn the perspective of using the clinical preparations of embryonic origin concerning the activation of processes of angiogenesis in ischemic conditions. Using histological and immunohistochemical methods proved the activation process of angiogenesis de novo after transplantation of fetal liver stem cells.

KEY WORDS: ischemia, histology, immunohistochemistry, embryonic stem cells.