

КОММИТИРОВАННЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ АЛЛОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛА АЛЛОПЛАНТ

Э. Р. Мулдашев, С. А. Муслимов, Л. А. Мусина, Р. Т. Нигматуллин, А. И. Лебедева

Всероссийский центр глазной и пластической хирургии, г. Уфа

Реферат. Использование в хирургии биоматериалов Аллоплант для восстановления поврежденных тканей позволяет достичь полноценной регенерации без формирования рубцовой ткани. С целью выявления стволовых клеток, выяснения природы их происхождения и изучения этапов дифференциации исследовали состав и структуру клеток в зоне введения аллогенного диспергированного биоматериала Аллоплант (ДБМА). ДБМА в виде суспензии 54 крысам (27 крыс предварительно облучали для угнетения функции костного мозга) вводили подкожно. Животных выводили из опыта через 12 часов, 24 часа, 2, 4, 7, 14, 30 суток и исследовали ткани иммуногистохимически и электронномикроскопически. CD-33⁺ и CD-34⁺ кроветворные стволовые клетки не обнаружены. Выявлено, что ДБМА стимулирует миграцию из сосудов коммитированных клеток – моноцитов и стволовых мезенхимных клеток к месту его введения и способствует их полному созреванию и дифференциации. Обнаружены секреторные макрофаги с необычной структурой и признаками повышенного эндо- и экзоцитоза. Выдвинута гипотеза об их ключевом значении в формировании полноценного регенерата при применении ДБМА. Дисбаланс количества и функциональной активности макрофагов и мезенхимных клеток у облученных животных приводит к фиброзу и росту рубцовой ткани в зоне введения ДБМА.

Ключевые слова: стволовые клетки, макрофаги, фибробласты, аллогенный диспергированный биоматериал Аллоплант (ДБМА), регенерация.

Известно, что, кроме стромальных клеток костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (10, 11), дающих начало всем клеткам крови, практически во всех органах взрослых животных и человека существуют регионарные стволовые клетки (1, 2, 4). Они составляют существенный восстановительный резерв в организме и способствуют замещению дефектов, возникающих в силу тех или иных обстоятельств. Чаще всего, заживление поврежденных тканей осуществляется за счет формирования соединительнотканного рубца (8). Использование в хирургии биоматериалов Аллоплант позволяет достичь полноценной регенерации без формирования рубцовой ткани (5, 6, 7). Поэтому представляет большой интерес исследование состава и структуры клеток в зоне введения аллогенного биоматериала с целью выявления стволовых клеток, по возможности выяснения природы их происхождения, и изучения этапов дифференциации.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 54 крысах породы Вистар обоего пола массой от 220-280 г. 27 крыс облучали на аппарате «Рокус АМ» в очаговой дозе 6 грей – 1,25 гр/ч – 328 сек (600 р/ч γ -излучения) с целью угнетения функции костного мозга. В качестве аллогенного биоматериала использовался диспергированный биоматериал Аллоплант (ДБМА), приготовленный соединительной ткани крыс. Биоматериал в виде суспензии на физиологическом растворе вводили подкожно в область спины у основания хвоста в количестве 125 мг (Хасанов Р.А., 1999). Эксперименты проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животных выводили из эксперимента ингаляционной передозировкой паров эфира. На исследование забирали кусочки тканей из места введения биоматериала через 12 часов, 24 часа, 2, 4, 7, 14, 30 суток.

Для гистологического исследования ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145, окрашивали гематоксилином и эозином.

Для выявления CD-33⁺ и CD-34⁺ стволовых кроветворных клеток образцы тканей замораживали в жидком азоте и изотавливали

замороженные срезы на криостате. Виментин (маркер мезенхимных стволовых клеток) выявляли на парафиновых срезах. Использовали моноклональные антитела фирмы Santa Cruz Biotechnology.

Для ультраструктурного исследования кусочки тканей фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида на какодилатном буфере (pH 7,2-7,4) с дофиксацией в 1% растворе OsO₄ на том же буфере. Материал заливали в эпон-812 (Б. Уикли, 1975). Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-III 8800 (Швеция). Срезы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу (9) и изучали в трансмиссионном микроскопе Jeol-100XB (Япония) при увеличениях 8000 – 13000.

Результаты и обсуждение. При введении частиц ДБМА необлученным крысам через 12-24 часов, кроме их инфильтрации сегментоядерными нейтрофильными лейкоцитами выявлялись признаки миграции из кровеносных сосудов моноцитов (*Рис. 1*), которые, как известно, являются коммитированными предшественниками макрофагов (16). Через 2 суток нейтрофильная инфильтрация вблизи частиц ДБМА менялась преимущественно на макрофагальную. По ультраструктуре макрофаги можно было дифференцировать на тканевые фагоцитирующие макрофаги, юные макрофаги моноцитоидного типа и зрелые макрофаги.

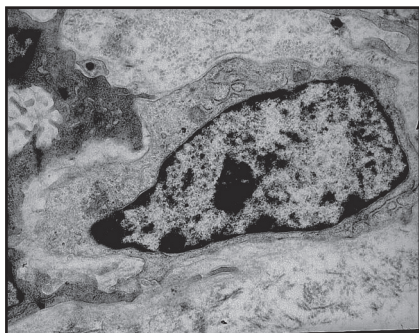


Рис.1. Моноцит вблизи кровеносного сосуда через 12-24 часов в области подкожного введения частиц ДБМА у необлученной крысы. Электронная микрофотография. X7200.

Спустя 4 суток на фоне нарастания общей численности клеток появлялось множество стволовых мезенхимных клеток (предшественников фибробластов). Стволовые мезенхимные клетки иммуногистохимически метились на наличие в цитоплазме белка промежуточных филаментов – виментина, который является маркером клеток мезенхимального происхождения (Рис. 2).

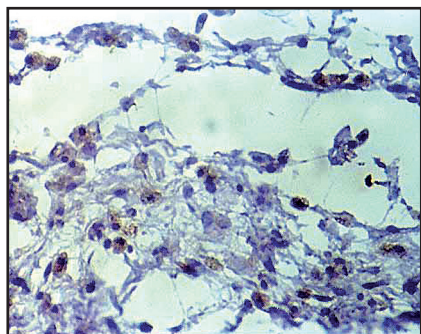


Рис.2. Положительная иммуногистохимическая реакция клеток мезенхимного происхождения на виментин в области подкожного введения ДБМА у необлученной крысы (4 сутки). Докраска гематоксилином и эозином. X250.

На ультраструктурном уровне данные клетки были представлены мелкими звездчатыми формами (7-10 мкм) с несколькими отростками различной длины (Рис. 3). Ядерно-цитоплазматическое соотношение было в пользу ядра. Относительно крупное ядро, богатое гетерохроматином, содержало ядрышко. В тонком ободке цитоплазмы выявлялись редкие мелкие митохондрии, слабовыраженный аппарат Гольджи, немного коротких каналов ГЭР и многочисленные свободные рибосомы.

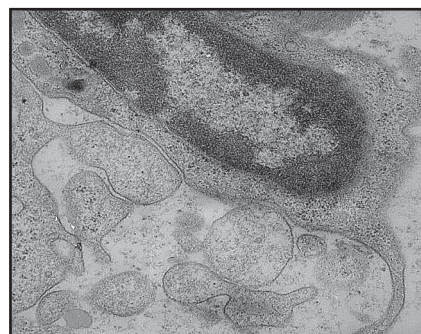


Рис.3. Мезенхимная клетка через 4 суток в области подкожного введения ДБМА у необлученной крысы. Электронная микрофотография. X19000.

Количество юных моноцитоидных макрофагов в этот срок увеличивалось (Рис. 4).

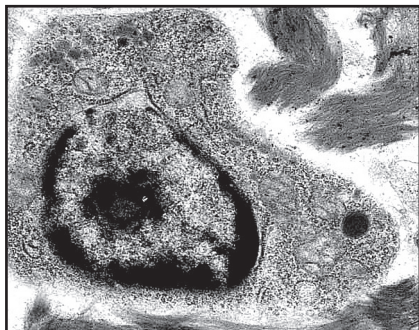


Рис.4. Ультраструктура юного моноцитоидного макрофага через 4 суток в области подкожного введения частиц ДБМА у необлученной крысы. Электронная микрофотография. X10000.

Наряду с продолжающейся их миграцией, проявлялись морфологические признаки усиления синтетической и фагоцитарной активности, свидетельствующие о созревании и дифференциации данной популяции (Рис.5).

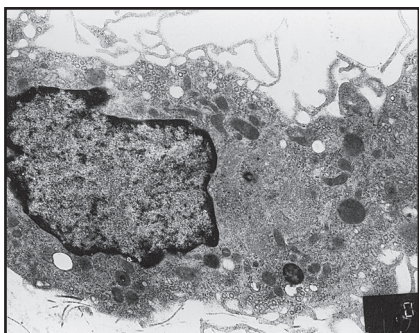
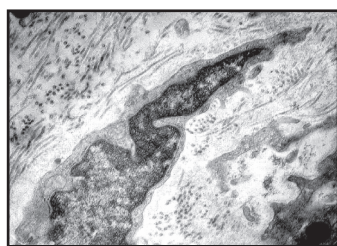


Рис.5. Ультраструктура зрелого фагоцитирующего макрофага через 4 суток в области подкожного введения частиц ДБМА у необлученной крысы. Электронная микрофотография. X6000.

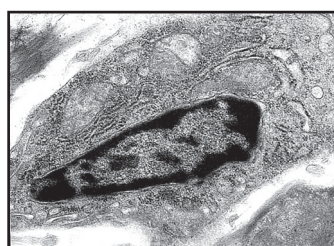
В цитоплазме определялось множество первичных лизосом, фаголизосом, развитая сеть ГЭР, пластинчатый комплекс Гольджи, большое количество свободных и связанных с мембранами рибосом, небольшие округлые митохондрии с затемненным матриксом. Цитоплазматическая мембрана макрофагов образовывала длинные и короткие выросты. Зрелые фагоцитирующие макрофаги с множеством первичных и вторичных лизосом в цитоплазме выявлялись примерно в равном количестве с юными макрофагами.

Клетки с остаточными тельцами в цитоплазме не обнаруживались или были единичными, что свидетельствовало о полноценности процесса фагоцитоза.

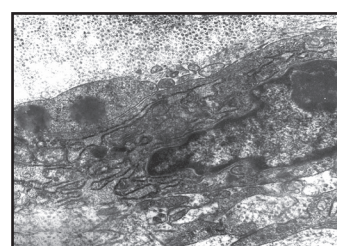
Через 7 суток в инфильтрате вокруг частиц биоматериала определялись различные клетки фибробластического дифферона, начиная от мезенхимной стволовой клетки и малодифференцированных юных фибробластов до зрелых активных форм (Рис. 6а, 6б, 6с). Малодифференцированные фибробласты были двух видов. Одни – относительно небольшие клетки, в которых ядро занимало больше половины объема, их мы отнесли к более юным формам, а другие, более зрелые – овальной формы и с большим объемом цитоплазмы. Ядра их содержали 1-2 ядрышка, цитоплазма богата свободными рибосомами и полисомами и содержала слабо выраженный пластинчатый комплекс Гольджи, немногочисленные узкие или слегка расширенные короткие каналы ГЭР, единичные включения липидов. Юные фибробласты имели веретеновидную отростчатую форму. Ядро – чаще большое светлое, в цитоплазме выявлялись многочисленные рибосомы и полисомы, развитый пластинчатый комплекс Гольджи, ГЭР – в виде узких коротких канальцев. Зрелые активные фибробласты отличались большим количеством расширенных канальцев ГЭР с хлопьевидным содержимым.



6а



6б



6с

Рис.6. Ультраструктура клеток фибробластического дифферона через 7 суток в очаге введения ДБМА у необлученной крысы: а) юный малодифференцированный фибробласт. X8000; б) дифференцирующийся фибробласт. X8000; с) активный фибробласт. X14000. Электронная микрофотография.

На 4-7 сутки среди макрофагов разной степени зрелости выделялись крупные клетки (15-20мкм) эллипсоидной или слегка вытянутой формы с овальным небольшим ядром (Рис. 7).

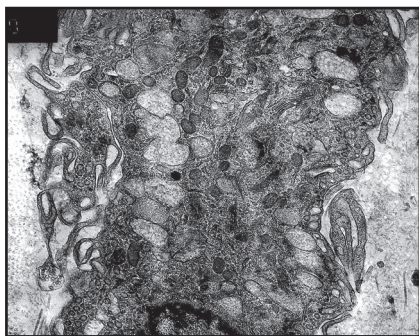


Рис. 7. Секреторный макрофаг через 4 суток в очаге введения ДБМА у необлученной крысы. Электронная микрофотография. X8000.

Клетки обладали признаками высокой интенсивности протекающих в них метаболических процессов. Выявлялось несколько комплексов Гольджи с развитыми каналами, от которых отшнуровывались многочисленные везикулы. В цитоплазме обнаруживалось большое количество пиноцитозных пузырьков, локализованных как по периферии плазмолеммы, так и в самой толще цитоплазмы. Кроме того, в экзоплазме располагался ряд крупных вакуолей, окаймленных однослойной мембраной со светлым хлопьевидным содержимым. Определялись короткие цистерны ГЭР, округлые или удлиненные некрупные митохондрии с параллельно ориентированными кристами и плотным матриксом. В клеточном цитозоле были рассеяны многочисленные свободные рибосомы и полисомы, мелкие светлые лизосомы. Клеточная поверхность образовывала длинные тонкие выросты, которые часто контактировали с фибробластами. Некоторые выросты заканчивались ампулообразными расширениями, в которых обнаруживались группы мелких везикул, окаймленных одиночной мембраной. Иммуногистохимически описанные макрофаги метились на наличие виментина в цитоплазме, что служило свидетельством их мезенхимального происхождения. По данному признаку и ультраструктуре эти клетки были аналогичны плацентарным макрофагам

(клетки Гофбауэра), которые, как предполагают некоторые исследователи, участвуют в переработке стромы ворсинок хориона в соответствии с их ростом и ветвлением (12, 13, 14). Поэтому, предположительно, описанные нами макрофаги мы назвали «матриксформирующими». Не исключено, что именно они играют ключевую роль в регуляции клеточных взаимоотношений при репарации в процессе замещения аллогенных биоматериалов Аллоплант.

По истечении 14 суток эксперимента клеточный состав в зоне введения частиц ДБМА был представлен в основном зрелыми макрофагами и умеренным количеством фибробластов всего дифференциального ряда с типичной для них ультраструктурой.

Через 30 суток частицы ДБМА на гистологических препаратах не обнаруживались. Строение кожи животных соответствовало норме.

Облучение крыс способствовало угнетению миграции моноцитов из кровяного русла к месту имплантации биоматериалов. Клеточный состав и ультраструктура клеток в зоне введения ДБМА в основном были аналогичны таковым у необлученных крыс, но общее количество их было гораздо меньше. Из-за ослабления процесса миграции моноцитов фагоцитоз частиц биоматериала происходил за счет макрофагов окружающих тканей и гораздо медленнее, чем в первой группе животных. Дисбаланс количества стволовых мезенхимных клеток и снижение функциональной активности макрофагов у облученных животных при введении биоматериала к концу эксперимента приводил к фиброзирующим процессам и формированию рубца. Известно, что ионизирующая радиация индуцирует избыточный синтез облученными макрофагами как трансформирующего фактора роста, так и фактора роста фибробластов, играющих непосредственную роль в реализации рост-стимулирующих эффектов макрофагов в отношении фибробластов (3, 15).

Результаты иммуногистохимического выявления CD-33⁺ и CD-34⁺ кроветворных стволовых клеток в тканях как у облученных, так и необлученных крыс в зоне подкожного введения ДБМА во все сроки эксперимента были отрицательными.

Результаты нашего исследования позволяют предполагать, что продукты полной резорбции частиц ДБМА макрофагами, кроме хемоаттракции коммитированных предшественников макрофагов - моноцитов, создают также среду для их дальнейшего полноценного созревания и дифференциации, в том числе и описанной «матриксформирующей» субпопуляции. Можно предположить, что именно выявленная нами субпопуляция макрофагов выполняет регуляторную функцию в межклеточных взаимодействиях и тканевом росте при применении биоматериала Аллоплант. Это реализуется в виде привлечения адекватного количества стволовых мезенхимных клеток, постепенно через все стадии созревания дифференцирующихся в активные фибробласты. Прямая корреляция количества описанных нами макрофагов со структурными характеристиками новообразованной ткани в зоне имплантации биоматериала свидетельствует в пользу выдвинутой гипотезы. Вполне вероятно, что именно вся совокупность перечисленных выше факторов при применении биоматериалов Аллоплант способствует репарации поврежденных тканей без фазы рубцевания.

Таким образом, подкожное введение ДБМА крысам стимулирует миграцию коммитированных клеток – моноцитов (предшественников макрофагов) и стволовых мезенхимных клеток (предшественников фибробластов) в область его введения.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.Викторов И.В. Стволовые клетки мозга млекопитающих: биология стволовых клеток in vivo и in vitro. Изв. АН, сер. Биол. - 2001. N 6. С. 645-655.
- 2.Викторов И.В., Сухих Г.В. / Медико-биологические аспекты применения стволовых клеток. / Вестник РАМН. - 2002. N 4. С. 24-31.
- 3.Зубова С.Г., Данилова А.О., Окулов В.Б. и др. Синтез и экспрессия трансформирующего фактора роста бета-активированными макрофагами. Вопр.онкол. – 1996. – Т.42. – С.80-85.
- 4.Лосева Е.В. Успехи Физиол. Наук.- 2001. Т. 12, N 1. С. 19-37.
- 5.Muldashev ER, Muslimov SA, Nigmatullin RT et al. (1999) Basic research conducted on alloplant biomaterials. Eur J Opht, Vol 9 (1): 8-13.
- 6.Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. – Уфа, 2000. – 166 с.
- 7.Нигматуллин Р. Т., Мулдашев Э. Р., Габбасов А. Г., Муслимов С. А. Аллотрансплантация как экспериментальная модель для изучения регенерации тканей // Гистогенез и регенерация тканей. - Санкт-Петербург, 1995. - С. 94.
- 8.Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань.- М.: Медицина, 1981.- 312с.
- 9.Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. Москва, 1975. – 324с.
- 10.Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М., Медицина. 1980. 216 с.
- 11.Чертков И. Л., Дерюгина Е. И., Абрахам Н. Г., Левир Р. Д. Стволовая кроветворная клетка: дифференцировочный и пролиферативный потенциал //Успехи соврем. биол. 1991. Т. 111, № 6. С. 905-922.
- 12.Hall B.K. Evolutionary development Biology. London, Chapman a.Hall, 1992.
- 13.Martinoli C, Castellucci M, Zaccheo D, Kaufmann P. Scanning electron microscopy of stromal cells of human placental villi throughout pregnancy. Cell Tissue Res 1984; 235(3):647-55
- 14.Nakamura Y, Ohta Y. Immunohistochemical study of human placental

stromal cells. Hum Pathol 1990 Sep; 21(9):936-40

15.Tornton S.C., Walsh B.J., Bennett S. et al. Both in vitro and in vivo irradiation is associated with induction of macrophage-derived fibroblast growth factors // Clin.Exp. Immunol.-1996.-Vol.103.-P.67-73.

16.Van Furth R.Cells of the mononuclear phagocyte system: nomenclature in terms sites and condition // Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects / End. By R. Van Furth. – Boston, 1980. – P. 1-30.