

Н.Н. Ефимова, Е.Ф. Полукошко, Р.И. Гронская, И.Э. Адзерицо, В.Н. Никандров

Влияние низкочастотного ультразвука на культуру эндотелиальных клеток *in vitro*

РНПЦ «Кардиология», Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

Одним из наиболее перспективных методов УЗ-реканализации является метод сочетанного внутрисосудистого (в/с) воздействия низкочастотного ультразвука (УЗ) и тромболитического препарата (УЗ-тромболизис) [1]. В экспериментах на животных, а затем в клинике продемонстрирована высокая эффективность УЗ-тромболизиса. Так, у больных с острым тромбозом периферических артерий через 90 мин после в/с воздействия низкочастотным УЗ в течение 3 мин. совместно со стрептокиназой в дозе 250 тыс. ЕД проходимость пораженных артерий восстанавливалась до 87,9% [1].

Главным результатом экспериментальных исследований последних нескольких лет в области УЗ-реканализации является установление влияния формы головки волновода в достижении значимого УЗ-тромборазрушающего эффекта [2]. С точки зрения эффективности разрушения тромбов предпочтительным является использование волновода со сферической головкой. Волновод с плоской головкой обеспечивает также эффективное восстановление проходимости пораженного сосуда, однако при его применении увеличивается по сравнению с волноводом со сферической головкой частота повреждения сосуда [2]. С целью исключения перфорации сосудистой стенки было предложено продвигать волновод по внутрисосудистому проводнику, который проведен через отверстие в головке волновода [1].

Несмотря на обнадеживающие результаты, в ряде клинических работ продемонстрированы негативные эффекты УЗ [1, 3, 4-6]. При УЗ-тромболизисе появляется опасность развития ретромбоза, несмотря на успешно проведенную реваскуляризацию. Это связано с тем, что УЗ вызывает повреждение тромбоцитов, усиление АДФ-индуцированной агрегации их [3-6].

Известно, что еще одним важным пусковым механизмом тромбообразования является повреждение клеток эндотелиального слоя. Эрозивное повреждение эндотелиальной поверхности способствует формированию тромба [7].

Можно предположить, что тип головки волновода (сферическая, плоская головки с отверстием и без него) будет оказывать влияние на выраженность морфологических изменений клеток эндотелия. Поэтому важность данного исследования несомненна для эффективной и безопасной УЗ-реканализации. Целью исследования явилась оценка структуры и жизнеспособности первичной органотипической и диссоциированной культуры сонной артерии новорожденной крысы *in vitro* под влиянием низкочастотного высокоинтенсивного (НЧ ВИ) УЗ.

Материал и методы

УЗ-воздействие проводили с использованием установки акустоиндуцированного тромбозиса (РНПЦ «Кардиология», технопарк БНТУ «Метолит», Беларусь), состоящей из УЗ-генератора, пьезоэлектрического преобразователя и волновода. Выходная мощность генератора 80 Вт. Волноводы выполнены из стали марки 12Х18Н10 длиной 23,5 см со сферической и плоской формами головки без отверстий (ВСФ и ВПФ) и с отверстиями (ВСФО и ВПФО).

Получение культуры эндотелиальных клеток: сонные артерии новорожденной крысы стерильно извлекали и помещали в буфер, лишенный ионов Ca^{+2} , Mg^{+2} (Sigma, США), затем разрезали на фрагменты не более 2-3 мм³ и диссоциировали ферментативно-механическим способом: использовали комбинацию трипсина и коллагеназы (0,25% и 0,1 % раствор, 10 мин). Суспензию клеток с плотностью $10^4 - 5 \times 10^4$ клеток/см² и кусочки ткани, обработанные энзимами, высевали на пластиковые чашки диаметром 3,5 или 10 см, или на стекла 18x18 мм, покрытые коллагеном. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при температуре 37°C. Спустя 24 ч после посева питательную среду с неприкрепившимися к пластику клетками удаляли, культуры промывали фосфатным буфером, и добавляли свежую ростовую среду DMEM, содержащую эмбриональную телячью и лошадиную сыворотки с убывающими концентрациями (20-10 %). В дальнейшем смена питательной среды проводилась через 48 или 72 ч. Через 2-3 недели после образования плотного монослоя для получения более однородной культуры эндотелиоцитов проводили пересев клеток по стандартной методике [8] с плотностью $5 \times 10^4 - 10^5$ клеток/см².

Рост и состояние культур контролировали с помощью прижизненной микроскопии в проходящем свете или фазовом контрасте.

Для обработки ультразвуком использовали культуры 2-х видов: а) длительно переживающие культуры (до 1,5 мес), сформировавшие в зоне роста многослойную или плотную однослойную структуру; б) культуру клеток, полученную путем 1-3 пассажей.

Проводили 2 серии экспериментов по изучению влияния УЗ на культуру эндотелиальных клеток: в 1-ой – в зависимости от интенсивности УЗ (n=6); во 2-ой – в зависимости от скважности УЗ (n=6). Параметры УЗ: время (t) – 3 мин; интенсивность (I)–8,1; 16,2; 25,1 Вт/см²; скважность (S) – 10, 30, 45 %.

Оценены прижизненные морфологические изменения и выживаемость культур спустя 5 мин и 1-10 сут от начала воздействия.

В качестве контроля использована культура клеток без УЗ-воздействия.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Достоверность различий средних значений определяли, используя парный t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Действие УЗ на органотипическую культуру сонной артерии новорожденной крысы.

В случае применения ВСФ и ВПФ УЗ-воздействие на монослойную культуру клеток в течение 3 мин со скважностью 10%, интенсивностью 8,1 и 16,2 Вт/см² приводило через 5 мин к нарушению целостности монослоя: увеличению межклеточного пространства и расхождению клеток (рис.1 в). После такого воздействия увеличение межклеточного пространства в культурах сохранялось до двух суток. Через 4-7 сут за счет пролиферации новых клеток целостность монослоя восстанавливалась.

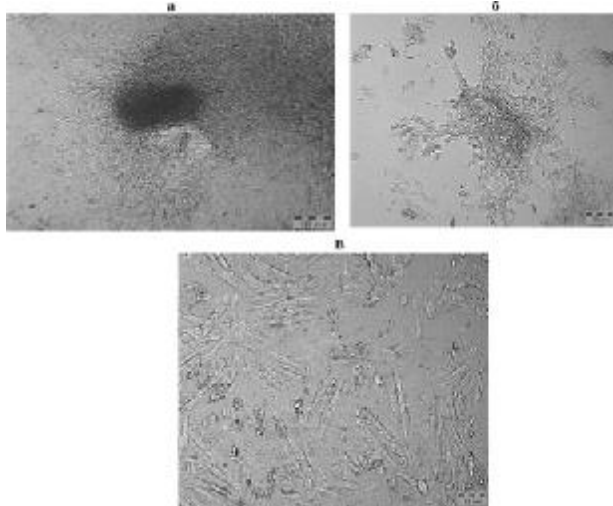


Рис. 1. Влияние УЗ-воздействия на многослойную культуру сонной артерии новорожденной крысы: а – скважность-30 %, интенсивность-16,2 Вт/см²; б – скважность-45 %, интенсивность-16,2 Вт/см², в – скважность-10 %, интенсивность-8,1 Вт/см²

Обработка УЗ с использованием тех же волноводов многослойных участков культуры со скважностью 30 и 45 %, интенсивностью от 8,1 до 25,1 Вт/см² приводила к «прожиганию» слоя клеток и появлению «дыр» в толще эксплантата или к их «сжеживанию», появлению поврежденных клеток, нарушению прикрепляемости к подложке краевых зон эксплантата (рис. 1 а, б). Через 24 ч наблюдалось их обратное прикрепление. На 4 сут после эксперимента отмечено постепенное зарастание «дыр», образованных при «озвучивании» многослойных участков культуры (рис. 2).

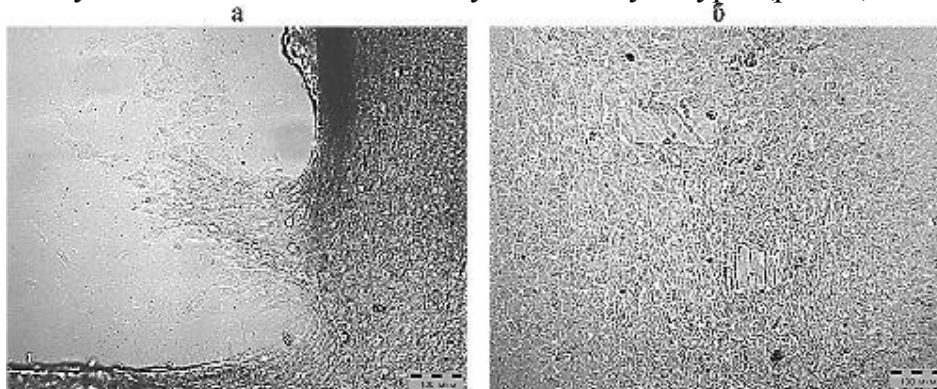


Рис. 2. Восстановление культуры сонной артерии после воздействия УЗ: а – 24 сут, скважность-30%, интенсивность-16,1 Вт/см²; б – 4 сут, скважность-30%, интенсивность-8,2 Вт/см²; проходящий свет

Применение ВПФО и ВСФО, начиная со скважности 10 % и интенсивности 8,1 Вт/см², вызывало такие же изменения культуры эндотелиальных клеток, как при использовании ВПФ и ВСФ при S = 30 и 45 %.

Поражение участков многослойной органотипической культуры сонной артерии новорожденной крысы носило локальный характер, ограничивающийся небольшой зоной влияния волновода.

Действие УЗ на диссоциированную культуру сонной артерии новорожденной крысы.

Диссоциированная культура клеток сосудов получена путем трипсинизации первичной культуры и последующего рассева суспензии на пластиковые культуральные чашки.

Поскольку, использование ВПФО и ВСФО начиная со S=10 % и I=8,1 Вт/см² вызывало значительную гибель клеток, то дальнейшие исследования были проведены ВПФ и ВСФ.

При действии УЗ на отдельные, не связанные между собой клетки наблюдалась частичная их гибель, которая возрастала с увеличением параметров УЗ-воздействия. Достоверных различий между ВПФ и ВСФ получено не было.

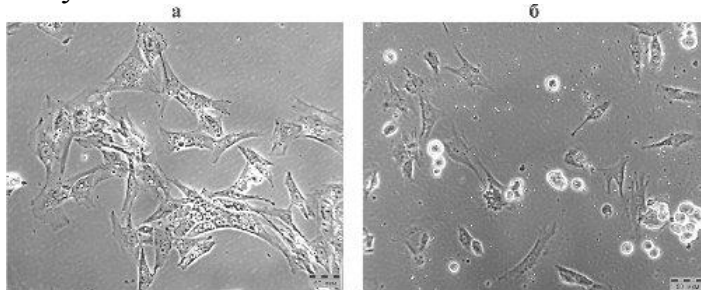


Рис. 3. Влияние воздействия УЗ (скважность-10%, интенсивность-8,2 Вт/см², время – 3 мин) на диссоциированную культуру сонной артерии новорожденной крысы: а – контроль, 2 пассаж, 6 сут in vitro; б – опыт; фазовый контраст

Наблюдалось округление и последующая гибель значительной части клеток (рис. 3). Наибольшая выживаемость культивируемых клеток отмечено при УЗ-воздействии со скважностью 10%, интенсивностью 8,2 Вт/см²: количество погибших клеток составило 48,85 %. УЗ-воздействие со скважностью 10 %, интенсивностью 16,1 Вт/см² приводило к тому, что количество погибших клеток увеличивалось до 58,57 %, а при озвучивании со скважностью 30 % оно возрастало до 77,1 %. Наименьшая выживаемость регистрировалась при УЗ обработке эндотелиальных клеток со скважностью 10 % и интенсивностью 25,2 Вт/см² – 94,12 % клеток погибли (рис. 4).

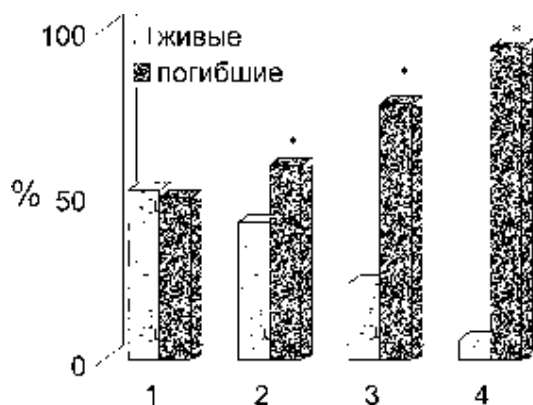


Рис.4. Выживаемость клеток диссоциированной культуры сонной артерии после 3 мин УЗ воздействия: 1 – скважность 10%, интенсивность 8,2 Вт/см²; 2 – скважность 10%, интенсивность 16,1 Вт/см²; 3 – скважность 30%, интенсивность 16,1 Вт/см²; 4 – скважность 10%, интенсивность 25,2 Вт/см². *-достоверность различий (p<0,05) по сравнению с контролем.

Кроме того, под влиянием УЗ на отдельные клетки изменялась площадь клеток по сравнению с контролем (рис. 4).

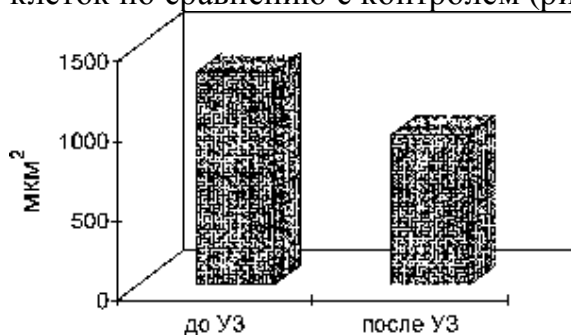


Рис. 5. Изменение площади клеток диссоциированной культуры сонной артерии до и после УЗ воздействия (скважность-10 %, интенсивность-8,2 Вт/см², время – 3 мин). *-достоверность различий (p<0,05) по сравнению с контролем

Ранее предпринимались исследования влияния различных параметров высокочастотного (ВЧ) УЗ на эндотелиальные клетки [9, 10]. В тоже время в литературе отсутствуют сведения о влиянии параметров низкочастотного высокоинтенсивного УЗ на сосудистый эндотелий.

В наших экспериментах установлено, что под влиянием НЧ ВС УЗ происходят морфологические изменения эндотелиальных клеток.

Ранее показано, что с увеличением параметров ВЧ УЗ-воздействия наблюдается эрозирование поверхности, а также смещение клеток эндотелиального монослоя к периферии [9, 10]. Авторы продемонстрировали корреляционную зависимость между выраженностью изменений и кавитацией УЗ-воздействия [10].

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что сходные изменения возникают и при использовании НЧ ВИ УЗ, выраженность которых также зависит от параметров УЗ-воздействия и типа головки волновода. Так, если при использовании ВСФ и ВПФ УЗ-воздействие со скважностью 10 % и интенсивностью 8,2; 16,1 Вт/см² приводило лишь к

увеличению межклеточного пространства и расхождению клеток, то уже при скважности 30 и 45 % УЗ-воздействие вызывало «прожигание» слоя клеток и появление «дыр» в толще эксплантата, поврежденных клеток, нарушалась прикрепляемость к подложке краевых зон эксплантата. А использование ВСФО и ВПФО, начиная со $S=10\%$ и $I=8,1\text{Вт/см}^2$ уже вызывало выраженные изменения эндотелиального слоя.

Можно предположить, что в основе повреждающего действия УЗ лежит эффект кавитации [11]. При этом возникает механическое повреждение слоя эндотелиальных клеток. В работах Ц. Тун с соавт. установлено, что тип головки волновода определяет форму и направление кавитационной струи, а также ее размер, что лежит в основе различного по силе тромборазрушающего эффекта. Отверстие же в дистальной части волновода может способствовать формированию большего количества кавитационных пузырьков, а также увеличивать размер и направление кавитационной струи [2]. Поскольку в работе J.H. Hwang с соавт. было продемонстрировано, что выраженность повреждений эндотелия коррелирует с силой кавитации, поэтому волноводы с отверстием и вызывают более выраженное повреждение эндотелиального слоя клеток [10].

Как известно, на первом этапе в образовании тромба участвуют только тромбоциты и сосудистая стенка. На этом этапе основную роль играет эндотелий сосуда. В сосудистом эндотелии вырабатывается ряд веществ участвующих в работе свертывающей и противосвертывающей системах крови. Клетки эндотелия синтезируют тканевой тромбопластин; фактор Виллебранда (кофактор агрегации и адгезии тромбоцитов), кофактор плазминогена, коллагена, волокна 3-4 типа [7]. Известно, что при повреждении эндотелиальной выстилки кровеносных сосудов обнажается расположенный под эндотелием коллаген, на который быстро налипают циркулирующие в крови тромбоциты, кроме того, меняются свойства сосудистого эндотелия и создаются условия для нарушения гемостаза и образования первичного тромба. [7]. И, если первичный стимул к агрегации дает коллаген, то АДФ, катехоламины и серотонин, выделяющиеся из сосудистой стенки и первично адгезировавшиеся тромбоциты в еще большей степени будут усиливать данный процесс. Учитывая, что при УЗ-тромболизисе также происходит активация тромбоцитов, то это в еще большей степени будет способствовать формированию тромба.

Таким образом, данные изменения будут играть пусковую роль в формировании тромба, что необходимо учитывать при проведении УЗ-тромболизиса.

Выводы

1. УЗ вызывает нарушение целостности и жизнеспособности многослойной органотипической и диссоциированной культуры эндотелиальных клеток.
2. Степень выраженности данных изменений зависит от типа волновода, скважности и интенсивности УЗ-воздействия.
3. УЗ-воздействие вызывает изменение размеров эндотелиальных клеток: уменьшение площади клеток.

4. Выявленные отрицательные эффекты УЗ необходимо учитывать при проведении УЗ-тромболизиса.

Литература

1. Адзериho, И.Э. Ультразвуковой тромболизис в лечении артериального тромбоза: дис. ...д-ра мед. наук: 14.00.06/И.Э.Адзериho. – Минск, 2004. – 322 л.
2. Тун, Цзяи. Эффективность восстановления проходимости пораженных атеросклерозом артерий ультразвуковыми волноводами различных модификаций *in vitro*: автореф. ... дис. канд. мед. наук: 14.00.06/ Цзяи Тун; БелМАПО. – Минск, 2006. – 21 с.
3. Рачок, С.М. Ультразвуковое разрушение тромбов в присутствии стрептокиназы: эффективность и влияние на гемокоагуляционный и сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (экспериментальное исследование): автореф. ... дис. канд. мед. наук: 14.00.06/ С.М.Рачок; БелМАПО. – Минск, 2005. – 19 с.
4. Release of b-thromboglobulin from human platelets by therapeutic intensities of ultrasound / A. Williams [et al] // *British. J. Haematol.* – 1978. – Vol. 40, №1.- P.133-142.
5. Platelet activation in increased in peripheral arterial disease / K.Cassar [et al] // *J. Vasc. Surg.* – 2003.-Vol.11, №5.-P.53-59.
6. Activation, aggregation and adhesion of platelets exposed to high-intensity focused ultrasound / S.L. Poliachik [et al] // *Ultrasound Med. Biol.* – 2001.-Vol.27, №11. – P.1567-1576.
7. Воробьев, А.И. Патология гемостаза / А.И.Воробьев, З.С.Баркаган; под ред. А.И.Воробьева.-Москва: Ньюдиамед, 2005.-416 с.
8. Р.Адамс Методы культуры клеток для биохимиков, М., «Мир», 1983, с.56
9. Erosion of artificial endothelia *in vitro* by pulsed ultrasound: acoustic pressure, frequency, membrane orientation and microbubble contrast agent dependence / A.A.Brayman [et al] // *Ultrasound Med Biol.* – 1999.-Vol.25, №8. P.1305-1320.
10. Correlation between inertial cavitation dose and endothelial cell damage *in vivo* / J.H. Hwang [et al] // *Ultrasound Med Biol.* – 2006.-Vol. 32, №10. P.1611-1619.
11. Основы физики и техники ультразвука / Б.А. Агрант [и др.]; под общ. ред. Б.А. Агрант.-Минск: Высш. шк., 1987.-352 с.