

Сміщук Віталій Володимирович - аспірант кафедри хірургії та проктології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика, лікар-хірург; +38 063 262-04-19; smvitaliy@i.ua
Іркін Ігор Васильович - д.мед.н., професор кафедри патологічної та топографічної анатомії Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика; +38 044 483-86-83; patholog-nmapo@ukr.net
Заріцька Валентина Іванівна - к.мед.н., асистент кафедри патологічної та топографічної анатомії Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика; +38 044 483-86-83; patholog-nmapo@ukr.net

© Небесна З.М., Волков К.С.

УДК: 616.131/141-091.8-02:616.17-085.324]-092.9

Небесна З.М., Волков К.С.

Кафедра гістології та ембріології ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України" (вул. Руська, 12, м.Тернопіль, 46001, Україна)

СТРУКТУРНА ТА МОРФОМЕТРИЧНА РЕОРГАНІЗАЦІЯ СУДИН ЛЕГЕНЬ ПІСЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТЕРМІЧНОЇ ТРАВМИ ТА В УМОВАХ ЗАСТОСУВАННЯ СУБСТРАТУ ЛІОФІЛІЗОВАНОЇ КСЕНОШКІРИ

Резюме. В експерименті на статевозрілих білих щурах-самцях проведені гістологічні та морфометричні дослідження судин легень в стадіях ранньої та пізньої токсемії та септикотоксемії після експериментальної термічної травми в умовах проведення ранньої некректомії та застосування подрібненого субстрату ліофілізованої ксеношкіри. Встановлено, що використання даного препарату запобігає розвитку деструктивних змін в стінці судин і компонентах аерогематичного бар'єру легень та позитивно впливає на перебіг в них регенераторних процесів. Це сприяє відносній нормалізації судинного русла та їх морфометричних показників в пізні терміни досліджу.

Ключові слова: судини легень, аерогематичний бар'єр, гістологічні і морфометричні зміни, термічна травма, субстрат ліофілізованої ксеношкіри.

Вступ

Патогенез термічної травми та розробка нових методів її корекції є актуальною проблемою теоретичної і практичної медицини. За останніми даними ВООЗ опіки займають третє місце серед інших видів травм. В останні роки кількість опіків в Україні не зменшилась і складає в середньому 145 тис. випадків на рік [Клименко, Нетюхайло, 2009]. При обширних і глибоких опіках відбуваються значні зміни структурної організації і функції всіх органів і систем опеченого організму, що формують окрему нозологічну одиницю - опікову хворобу, яка призводить до поліорганної недостатності [Нетюхайло, 2007; Galani et al., 2010; Fang et al., 2011]. Проте судинна система легень в динаміці після термічної травми досліджена недостатньо [Norbert et al., 2013].

За останні роки в комбустіології у комплексному лікуванні термічних уражень для тимчасового закриття опікової рани застосовується подрібнений субстрат ліофілізованої ксеношкіри. Цей ефективний препарат має велику поверхню дотику тому адсорбує в значній кількості з ділянки пошкодження шкіри продукти розпаду тканин, токсини, мікроорганізми, зменшуючи поступлення їх у кров. Підвищує репаративну регенерацію та зменшує прояви опікової хвороби [П'ятницький та ін., 2013; Цимбалюк та ін., 2013].

Метою цієї роботи було встановлення гістологічної та морфометричної реорганізації судин легень тварин після термічного ураження при застосуванні подрібненого субстрату ліофілізованої ксеношкіри.

Матеріали та методи

Експеримент проведено на 30 статевозрілих білих

щурах-самцях. Тварин утримували у віварії ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України". Догляд за тваринами і всі маніпуляції проводили у відповідності з положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та з іншою науковою метою", (Страсбург, 1986 р.), а також у відповідності до положень "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.).

Опік III ступеня наносили під ефірним наркозом мідними пластинами нагрітими у кип'яченій воді до температури 97-100°C. Розміри ділянки ураження складали 18-20% епільованої поверхні тіла щурів. Ранню некректомію пошкоджених ділянок шкіри проводили через 1 добу після нанесення опіку. Закриття рани, яка утворилась, здійснювали подрібненим субстратом ліофілізованої ксеношкіри, виготовленим підприємством "Комбустіолог" (м.Тернопіль), який дозволений до клінічного застосування МОЗ України. Оскільки тварини з опіками після ранньої некректомії гинули, провести дослідження без закриття рани було неможливим. Піддослідних тварин декапітували на 7, 14 та 21 доби, що відповідає стадіям ранньої і пізньої токсемії та септикотоксемії опікової хвороби.

Збір матеріалу для мікроскопічних досліджень проводили згідно загальноприйнятої методики [Горальський та ін., 2011]. Шматочки легень фіксували в 10% нейтральному розчині формаліну, проводили дегідратацію в спиртах зростаючої концентрації, заливали у парафінові блоки. Виготовлені зрізи, товщиною 5-6

мкм, забарвлювали гематоксилином-еозином та трьохкольоровим методом MSB (ОКГ) [Горальський та ін., 2011].

Морфологічні та морфометричні дослідження здійснювали, використовуючи систему візуального аналізу гістологічних препаратів. Зображення виводили на монітор комп'ютера з мікроскопу MICROmed SEO SCAN за допомогою відеокамери Vision CCD Camera. Морфометричні вимірювання проводили за допомогою програм ВидеоТест-5.0, КАРА ImageBase та Microsoft Excel на персональному комп'ютері. Дослідження здійснювали у визначені терміни експерименту в препаратах забарвлених гематоксилином і еозином та трьохкольоровим методом MSB (ОКГ). Морфометрично досліджували артерії середнього та малого калібру. Вимірювали величини зовнішнього (d) і внутрішнього (d1) діаметрів. Товщину стінки (ТСт) розраховували за формулою:

$$ТСт = (d-d_1)/2$$

Функціональний стан судин проводили шляхом вивчення ІВ - індекса Вогенворта, тобто відношення площі стінки артерій до площі їх просвіту:

$$ІВ = (SCt / SPr) 100 \%,$$

де SCt - площа стінки, а SPr - площа просвіту судини.

Статистичну обробку отриманих кількісних даних проводили за допомогою методів варіаційної статистики з визначенням середньої арифметичної величини та її похибки ($m \pm m$), критерію Стюдента (t) та показника достовірності (p). Достовірними вважаються відмінності при $p \leq 0,05$ (95,0%) [Автанділов, 2002; Гумецький та ін., 2004].

Результати. Обговорення

Проведені гістологічні і морфометричні дослідження на 7 добу показали, що вже в цей термін менше виражені деструктивні зміни та прояви судинної проникності стінок судин, особливо мікроциркуляторного русла (рис. 1). Морфометрично встановлено достовірне збільшення зовнішнього діаметру та звуження внут-

рішнього в артеріях середнього калібру, тому індекс Вогенворта менше в 1,33 рази показника групи тварин, яким корекцію термічної травми не здійснювали. Аналогічно змінюються морфометричні дані артерій малого калібру (табл. 1).

Субмікроскопічно в цей термін досліді встановлені менш виразні зміни гемокапілярів стінок альвеол легень, ніж у судин органу тварин яким корекцію термічної травми субстратом ліофілізованої ксеноскіри не проводили. Вони не так значно розширені та кровонаповнені. Для базальної мембрани характерний набряк на більшому протязі, наявні ділянки на яких вона не чітко контурована. В ендотеліоцитах виявляються округло-овальні ядра, з неглибокими інвагінаціями каріолеми, в їх каріоплазмі переважає еухроматин та наявне незначне маргінальне скупчення грудок гетерохроматину. Перинуклеарний простір в окремих ділянках розширений. Цитоплазма ендотеліальних клітин помірно набрякла, в ній каналці ендотеліальних клітин та цистерни комплексу Гольджі помірно розширені. В невеликих мітохондріях частково пошкоджені кристи та просвітлений матрикс. В периферичних цитоплазматичних ділянках ендотеліоцитів спостерігається збільшення кількості піноцитозних пухирців та кавеол.

Гістологічно на 14 добу цього досліді спостерігається, що кровеносні судини легень помірно кровонаповнені. Морфометрично встановлено зниження зовнішнього діаметру артерій середнього калібру в 1,08 рази та зростання внутрішнього в 1,07 рази порівняно із показниками у групі тварин без корекції опіку. Значення товщини стінки судин відповідно в 1,22 рази менше від аналогічного показника у контрольній групі тварин. Тому індекс Вогенворта таких артерій менше в 1,43 рази, відносно показника групи тварин без корекції (див. табл. 1). Подібні морфометричні показники виявлені в артеріях малого калібру.

В цей термін досліді частина вен та венул мають розширені і кровонаповнені просвіти та незначну перивазальну лейкоцитарну інфільтрацію (рис. 2). Судини

Таблиця. 1. Морфометричні параметри артерій легень та індекс Вогенворта в різні терміни після термічної травми та в умовах застосування субстрату ліофілізованої ксеноскіри ($M \pm m$).

Тривалість спостереження	Калібр судин, мкм								
	Середні				Малі				
	Дз	Дв	ТСт	ІВ	Дз	Дв	ТСт	ІВ	
Інтактні	107,01±4,12	65,40±2,27	20,81±0,73	167,8±5,3	56,20±1,93	35,16±0,95	10,52±0,37	155,5±4,7	
Опік	1 доба	113,45±3,97	57,11±2,01	28,12±0,94	293,3±8,1	59,73±2,17	32,40±1,06	13,66±0,42	239,9±8,4
	7 доба	117,14±4,08	52,14±1,95	32,50±1,09	404,7±12,9	63,41±2,34	28,07±0,91	17,67±0,51	410,3±13,5
	14 доба	118,07±4,15	53,47±1,87	32,30±1,17	387,6±11,5	64,12±2,40	27,34±0,84	18,39±0,65	450,0±14,1
	21 доба	115,61±3,50	54,08±1,72	30,77±0,95	357,0±10,2	60,81±1,98	29,25±1,08	15,78±0,63	332,2±9,8
Опік + корекція	7 доба	112,8±3,74	56,12±1,98	28,34±0,83	304,0±9,7	60,71±2,65	29,12±0,96	15,80±0,54	334,6±10,2
	14 доба	110,3±4,10*	57,25±2,01	26,53±0,79	271,2±9,3	59,01±2,07*	32,40±1,17*	13,31±0,45	231,7±8,6
	21 доба	109,1±3,71*	62,40±2,36*	23,35±0,62	205,7±7,8	57,62±2,31*	33,72±1,25*	11,95±0,37*	192,0±7,3

Примітки: * ($p > 0,05$), у всіх інших випадках ($p \leq 0,05$) у порівнянні з показниками тварин інтактної групи.

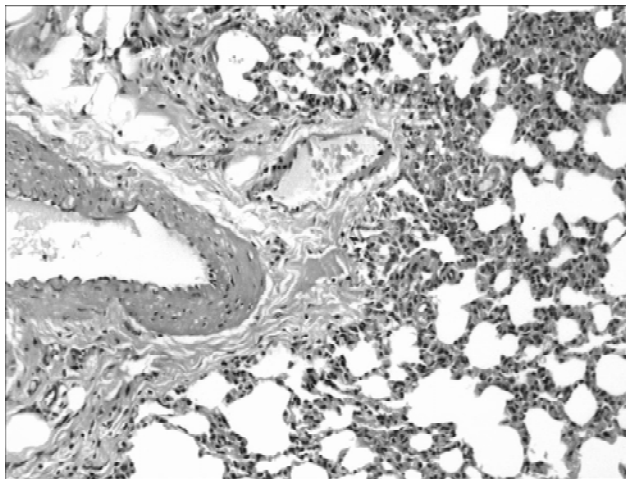


Рис. 1. Гістологічний стан легені тварини на 7 добу після термічної травми та в умовах застосування субстрату ліофілізованої ксеношкіри. Фрагмент стінки артерії та кровонаповнена вена, помірна лейкоцитарна інфільтрація стромі органу. Гематоксилін-еозин. $\times 100$.

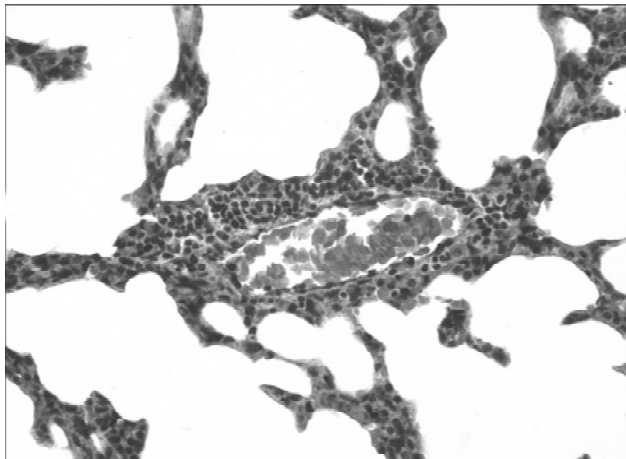


Рис. 3. Гістологічний стан легені тварини на 14 добу після термічної травми та в умовах застосування субстрату ліофілізованої ксеношкіри. Кровнаповнена венула, перивазальна, лейкоцитарна інфільтрація. Забарвлення методом MSB (ОКГ). $\times 200$.

мікроциркуляторного русла, менше кровонаповнені, незначно набряклі їх стінки, в адвентиційній оболонці спостерігається помірна інфільтрація лейкоцитами, макрофагами (рис. 3).

Субмікроскопічно в цей термін досліду в ендотеліоцитах капілярів стінки альвеол спостерігаються менш пошкоджені компоненти ядер та цитоплазми. Базальна мембрана збережена, чітко контурована проте має локально потовщені ділянки порівняно із попереднім терміном спостереження. В гіалоплазмі ендотеліальних клітин наявний незначний набряк. В периферичних їх ділянках збільшується число кавеол та мікропухирців (рис. 4).

Мікроскопічно за умов застосування субстрату ліофілізованої ксеношкіри на 21 добу експерименту струк-

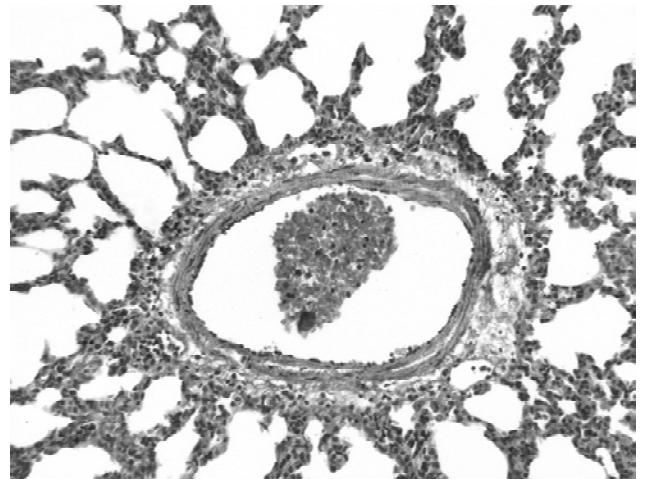


Рис. 2. Мікроскопічний стан легені тварини на 14 добу після термічної травми та в умовах застосування субстрату ліофілізованої ксеношкіри. Помірно кровонаповнений просвіт вени середнього калібру та незначний набряк адвентиційної оболонки. Забарвлення методом MSB (ОКГ). $\times 10$.

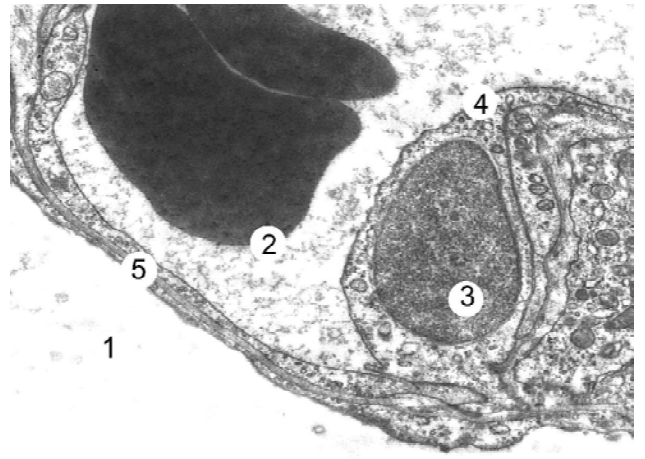


Рис. 4. Субмікроскопічна організація стінки альвеоли респіраторного відділу легені на 14 добу після експериментальної термічної травми та в умовах застосування субстрату ліофілізованої ксеношкіри. Просвіт альвеоли (1), просвіт капіляра з еритроцитами (2), ядро (3), цитоплазма ендотеліоцита (4), аерогематичний бар'єр (5). $\times 9000$.

турна організація судин легень значно покращується порівняно із попередніми термінами. Морфометрично це зміни підтверджуються достовірним зниженням значення індексу Вогенворта артерій середнього калібру в 1,74 рази та малого - в 1,73 рази порівняно із значеннями у групі тварин без корекції опіку та наблизенням їх до інтактних показників (див. табл. 1). Зменшується кровонаповнення судин, набряк їх стінки, в адвентиції знижена гістолейкоцитарна інфільтрація (рис. 5).

На ультраструктурному рівні в цей термін досліду в більшості гемокапілярів стінок альвеол легень виявляється менший ступінь пошкодження його складових компонентів. В помірних їх просвітах наявні формені елементи крові, переважно еритроцити. Еліпсоподібної форми ядра мають чіткі контури та незначні інва-

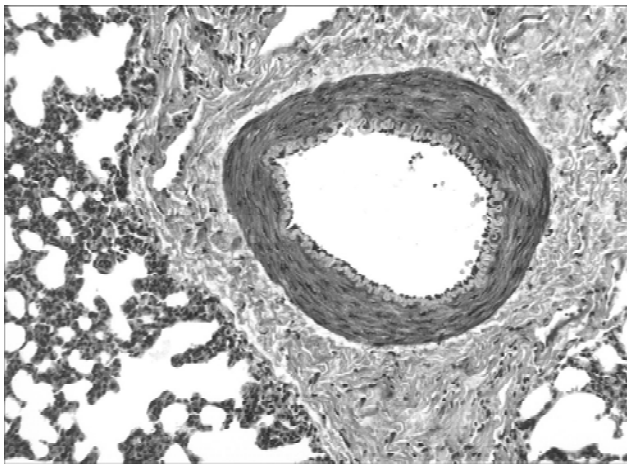


Рис. 5. Мікроскопічний стан легені тварини на 21 добу після термічної травми та в умовах застосування субстрату ліофілізованої ксеноскірки. Артерія середнього калібру, потовщена м'язова оболонка, помірний набряк та адвентиції, альвеоли респіраторного відділу. Забарвлення методом MSB (ОКГ). x100.

інації мембран каріолеми. Цитоплазма ендотеліальних клітин помірної електронної щільності, в її навколядній зоні виявляється гіпертрофований комплекс Гольджі, вогнищево розширені каналці ендоплазматичної сітки, вільні рибосоми та полісоми. Для мітохондрій характерні чіткі кристи і помірної електронної щільності матрикс. Тонкі периферичні ділянки ендотеліальних клітин містять чисельні піноцитозні пухирці та кавеоли. В цей термін експерименту збережена цілісність базальної мембрани в складі аерогематичного бар'єру (рис. 6).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Отримані результати гістологічних та морфометричних досліджень легень свідчать, що закриття опікової рани подрібненим субстратом ліофілізованих ксенодермотрансплантатів після проведення ранньої

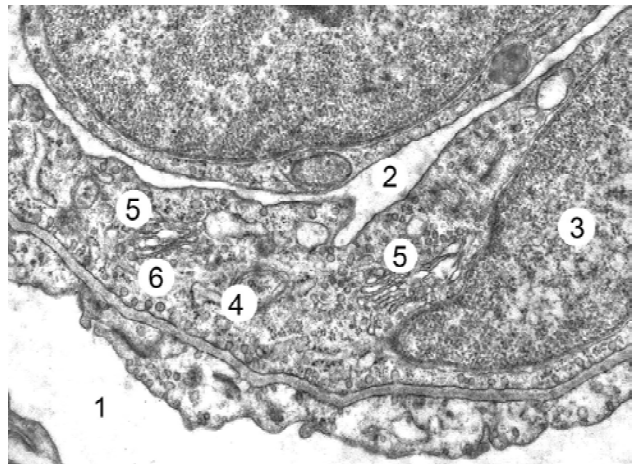


Рис. 6. Субмікроскопічна організація альвеолярної стінки респіраторного відділу легені на 21 добу після експериментальної термічної травми та в умовах застосування субстрату ліофілізованої ксеноскірки. Просвіт альвеоли (1), просвіт капіляра (2), ядро (3), цитоплазма ендотеліоцита (4), диктіосоми комплексу Гольджі (5), мікропухирці та кавеоли (6). x15000.

некректомії уражених ділянок шкіри запобігає дії патогенного фактора на судинну систему органу, зменшує ступінь їх пошкодження.

2. Застосований препарат створює умови для активного протікання регенераторних процесів в судинах легень, що забезпечує поступове покращення їх мікроскопічної та субмікроскопічної будови. Тому, в кінці досліду відбувається відносна нормалізація структурної організації та їх морфометричних показників. Достовірно зменшується зовнішній і внутрішній діаметри та товщини стінки артерій середнього та малого калібру, індексу Вогенворта порівняно із показниками групи тварин, яким корекцію термічної травми не проводили.

У подальших дослідженнях планується вивчити перебіг морфологічних та морфометричних змін судин легень при термічній травмї в умовах застосування інших коригуючих чинників.

Список літератури

- Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: учеб. пособие для слушателей системы последиплом. образования /Г.Г.Автандилов.- М.: Медицина, 2002.- 238с.
- Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології /Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І.- Житомир: Полісся, 2011.- 288с.
- Гумецький Р.Я. Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести /Р.Я.Гумецький, Б.М.Паляниця, М.Є.Чабан.- Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2004.- 122с.
- Клименко М.О. Опікова хвороба (патогенез і лікування) /М.О.Клименко, Л.Г.Нетюхайло.- Полтава, 2009.- 118с.
- Нетюхайло Л.Г. Механізми опікової хвороби та обґрунтування застосування препарату "Кріофор" для її лікування: автореф. дис. ... д. мед. наук: спец. 14.03.04 "Патологічна фізіологія" /Л.Г.Нетюхайло.- Харків, 2007.- 34с.
- П'ятницький О.Ю. Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей субстрату кріоконсервованої шкіри свині /Ю.С.П'ятницький, Л.В.Яковлева, О.Ю.Кошова // Клін. фармація.- 2013.- Т.17, №1.- С.56-62.
- Цимбалюк А.В. Використання подрібненого субстрату ліофілізованого ксенодермоімплантата для місцевого лікування опікових хворих з інфікованими ранами III-IV ступенів /А.В.Цимбалюк, Н.В.Гуда, О.О.Кирик /Шпитальна хірургія.- 2013.- №1.- С.81-84.
- Norbert F.Voelkel The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective /Norbert F.Voelkel, Shiro Mizuno, Harm J.Bogaard //American J. of Physiology.- Lung Cellular and Molecular Physiology.- 2013.- Vol.304, №7.- P.L457-L465.
- The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review /V.Galani, E.Tatsaki, M.Bai [et al.] //Pathology, research and practice.-

2010. - Vol.206. - P.145-150.
Ulinastatin improves pulmonary function in

severe burn-induced acute lung injury
by attenuating inflammatory response

/Y.Fang, P.Xu, C.Gu [et al.] //The J. of
trauma. - 2011. - Vol.71. - P.1297-1304.

Небесна З. М., Волков К.С.

СТРУКТУРНАЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ СОСУДОВ ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ И В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ СУБСТРАТА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ КСЕНОКОЖИ

Резюме. В эксперименте на половозрелых белых крысах-самцах проведены гистологические и морфометрические исследования сосудов легких в стадиях ранней и поздней токсемии и септикотоксемии после экспериментальной термической травмы в условиях проведения ранней некрэктомии и применении измельченного субстрата лиофилизированной ксенокожи. Установлено, что использование указанного препарата предотвращает развитие деструктивных изменений в стенке сосудов и компонентах аэрогематического барьера легких и положительно влияет на течение в них регенераторных процессов. Это способствует относительной нормализации сосудистого русла и их морфометрических показателей в поздние сроки эксперимента.

Ключевые слова: сосуды легких, аэрогематический барьер, гистологические и морфометрические изменения, термическая травма, субстрат лиофилизированной ксенокожи.

Nebesna Z.M., Volkov K.S.

STRUCTURAL AND MORPHOMETRIC REORGANIZATION OF THE LUNG VESSELS AFTER EXPERIMENTAL THERMAL TRAUMA AND APPLICATION OF LYOPHILIZED XENOGRAFT SUBSTRATE

Summary. In the experiment on mature white male rats histological and morphometric study of vessels of the lungs was performed in early and late stages of toxemia and septicotoxemia after experimental thermal trauma in terms of early necrectomy and lyophilized xenograft substrate application. It was established that the use of this method prevents the development of destructive changes in the vascular wall components and aero-hematic barrier of the lungs and positive impact on the course they regenerative processes. This contributes to the relative normalization of the microcirculatory bed and their morphometric parameters in the later stages of the experiment.

Key words: vessels of the lungs, aero-hematic barrier, histologic and morphometric changes, thermal trauma, lyophilized xenograft substrate.

Рецензент: д.мед.н., професор Герасимюк І.Є.

Стаття надійшла до редакції 1.06.2015 р.

Небесна Зоя Михайлівна - к.біол.н., доцент кафедри гістології та ембріології ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України"; Zoyadacenko@gmail.com

Волков Константин Степанович - д.біол.н., професор, завідувач кафедри гістології та ембріології ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України"; +38 0322 25-17-80

© Любич Л.Д., Семенова В.М., Стайно Л.П.

УДК: 576.8.083.1:591.3:591.81:616-006.484-092.9

Любич Л.Д., Семенова В.М., Стайно Л.П.

ДУ "Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України" (вул.Платона Майбороди, 32, Київ, 04050, Україна)

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ КУЛЬТИВУВАННЯ ДЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ОЦІНКИ ВПЛИВУ СУПЕРНАТАНТУ ФЕТАЛЬНИХ НЕЙРОГЕННИХ КЛІТИН НА КЛІТИНИ ГЛІОМИ С6

Резюме. Мета роботи полягала в оцінці впливу супернатанту фетальних нейрогенних клітин (СНК) щура на культивовані клітини гліоми щура С6. СНК, отримані з суспензій нейрогенних клітин мозку щура на 9 (Е9) та 14 (Е14) добу гестації (0,01, 0, 10 мг/мл) додавали до суспензії клітин гліоми щура С6; через 24 год інкубації в суспензіях визначали кількість життєздатних клітин та вираховували цитотоксичний індекс. СНК (0,01, 0, 10 мг/мл) додавали до первинних культур гліоми щура С6, через 24 і 48 год інкубації аналізували цитологічні препарати та визначали мітотичний індекс. СНК фетального мозку щура різних строків гестації виявили цитотоксичний та антимітотичний ефект на культивовані клітини гліоми С6, який посилювався зі збільшенням терміну гестації мозку щура, подовженням тривалості інкубації та був дозозалежним. Первинні культури гліом головного мозку щура є адекватною експериментальною моделлю для оцінки протипухлинної дії фетальних нейрогенних клітин щура.

Ключові слова: прогеніторні нейрогенні клітини щура, супернатант, гліома С6 щура, цитотоксичний індекс, мітотичний індекс.

Вступ

Успішна розробка фундаментальних проблем сучасної нейробіології та нейроонкології значною мірою обумовлена застосуванням методу культивування нервової тканини, перевагою якого є можливість протягом тривалого часу прижиттєво спостерігати культивовані нейроклітини в різних експериментальних умовах

та проводити електрофізіологічні, біохімічні, молекулярно-генетичні та інші дослідження для з'ясування механізмів функціонування живих нейронів та гліоцитів [Пинаев и др., 2008; 2011]. У культурі нервової тканини продовжується диференціювання нейроцитів та гліальних клітин, відбувається реалізація запрограмованих в