

УДК 616-005.4-092.4:611.73:57.083

© Д.Б. ДОМБРОВСЬКИЙ, Р.В. САЛЮТІН, М.Ф. ДРЮК

Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова АМН України, Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

Гістологічна та імуногістохімічна характеристика м'язової тканини за умов експериментальної ішемії

D.B. DOMBROVSKY, R.V. SALUTIN, M.F. DRUK

National Institute of Surgery and Transplantology by O.O. Shalimov of AMS of Ukraine, Coordination Centre Transplantology of Organs, Tissue and Cells MOH Ukraine

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL DESCRIPTION OF MUSCULAR TISSUE IN THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ISCHEMIA

В експерименті на щурах зі змодельованою ішемією кінцівки проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження змін, що відбуваються в м'язовій тканині. Результати проведеного дослідження вказали на патогенетичні процеси, які мають місце за умов ішемії. Наведений у роботі метод моделювання ішемічного процесу призводить до істотної структурно-функціональної руйнації м'язової тканини і є підґрунтям для проведення подальших досліджень із визначення факторів, що впливають на перебіг ішемічного ураження.

In an experiment on rats which had a modeling ischemia of extremity, histological and immunohistochemical research of changes, what be going on in muscular tissue is conducted. The results of the conducted research specified on pathogenic processes which take place in the conditions of ischemia. The method of design of ischemic process resulted in-process results in complete structurally – functional destruction of muscular tissue and is adequate basis on determination of factors which influence on motion of ischemic defeat.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій. Невпинне збільшення кількості хворих на облітеруючі ураження периферичних судин кінцівок, що супроводжуються розвитком ішемічного синдрому, зумовлює пошук нових патогенетично обґрунтованих методів лікування [1, 2]. Проте визначення ефективності того чи іншого методу лікування доцільніше проводити спочатку на експериментальних моделях.

Особливу цікавість викликає при даних нозологічних формах динаміка гістологічної перебудови структури м'язової тканини. Незважаючи на значну кількість наукових робіт, що присвячені вивченню ішемічного стану, комплексного гістологічного та імуногістохімічного дослідження впливу ішемічного ураження на стан ендотеліоцитів капілярів та м'язової тканини загалом не проводили. Знання процесів, які відбуваються в м'язовій тканині за умов ішемії, та динаміки їх змін протягом розвитку патологічного процесу можуть бути суттєвим підґрунтям для вивчення факторів, які впливають на ішемічне ураження, а також дослідження механізмів впливу на ішемію м'язової тканини.

Мета роботи: дослідити за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів процес деструктивних та компенсаторних реакцій, які зумовлені ішемічним станом м'язової тканини.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на базі експериментального відділу Національного інституту хірургії та трансплантології АМН України. Дослід проведено на нелінійних білих щурах (n=40), яких утримували при кімнатній температурі на звичайному лабораторному раціоні. Середня маса щурів складала (370,47±8,31) г, вік – (6±1,2) місяця. Всі оперативні втручання на щурах виконували під кетаміновим наркозом. Проведення експериментальних оперативних втручань та виведення тварин з експерименту виконували відповідно до норм медичної етики щодо проведення дослідів на лабораторних тваринах.

Моделювання ішемії тканини кінцівки у щура виконували за методом Т.А. Князевої [3], згідно з яким навкруги судинної ніжки, що кровопостачає тканини кінцівки, вище відходження поверхневої артерії, яка огинає здухвинну кістку та латеральну

артерію, що огинає стегнову кістку, проводили дві лігатури на відстані 1 см одна від одної і перев'язували артерію разом з веною. Рану пошарово ушивали. На етапі забору матеріалу для дослідження тварин виводили з експериментального дослідження шляхом передозування наркозу. У всіх дослідних тварин по закінченні терміну дослідження – в кожному терміні дослідження було по 5 тварин (на 1-2-3-7-10-15-20 та 25 добу) – взяли м'язову тканину медіальної поверхні стегна на стороні проведення експерименту, після чого були застосовані гістологічні та імуногістохімічні методи дослідження отриманої м'язової тканини.

Гістологічне та імуногістохімічне дослідження виконували на базі Інституту педіатрії, акушерства та гінекології АМН України в морфологічній лабораторії (зав. лабораторії професор Т.Д. Задорожня). Гістологічне дослідження проводили за стандартною схемою – після фіксації у формаліні та спиртах отриманий матеріал обробляли в парафіновій заливці [4]. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином і пікрофуксином за Ван-Гізона.

Нами за допомогою імуногістохімічних методів були досліджені декілька клітинних маркерів, які дозволяють уявити процеси клітинної деструкції та стан компенсаторних механізмів, а саме колаген IV типу [5], фактор Віллебранда [6], білок віментин [7].

Результати досліджень та їх обговорення.

Аналіз даних гістологічного та імуногістохімічного досліджень м'язових волокон і судин дозволив сформувати підгрупи за характером морфологічних змін структури тканин: 1-3-тя доба; 7-15-та доба і 20-25-та доба ішемії.

На 1-3-тню добу змодельованої ішемії 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, у венозних судинах фіксували виражене вогнище повнокрів'я і стази еритроцитів, що мало місце в 90 % досліджених препаратів (рис. 1).

Фіксували наявність периваскулярного набряку, частина ендотеліальних клітин судин була некротизованою та злушеною. Судинна стінка з нерівномірною інфільтрацією макрофагами та лімфоцитами.

Необхідно відмітити втрату м'язовими волокнами своєї окресленості, втрачається еозинофілія та з'являється базофілія. Відмічається активація гістіоцитів, особливо макрофагів.

На 7-15-ту добу спостереження відмічається прогресивне збільшення деструктивних процесів у м'язових волокнах із наявністю ділянок некрозу,

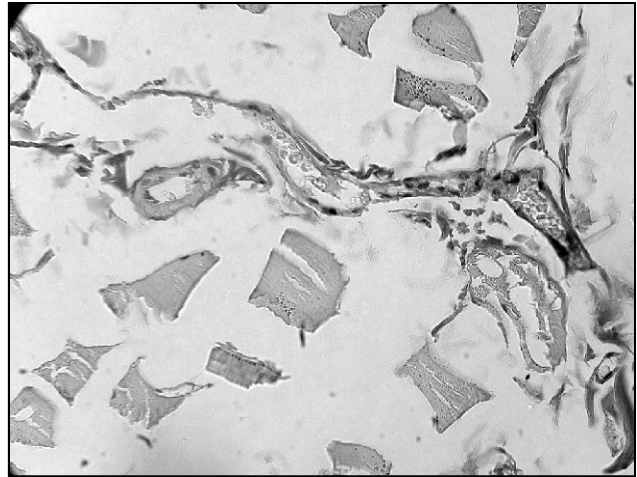


Рис. 1. Друга доба після моделювання ішемії. Вогнище повнокрів'я і стази у венулі, периваскулярний набряк. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофотографія. Об. 10. Ок. 40.

ліпідної дистрофії, вакуолізації та набряку. Спостерігаються прогресуюча десквамація та некроз ендотеліальних клітин із наступною облітерацією просвіту судин. Зустрічаються розшарування і набряк судинної стінки, на тлі набряку міжм'язових ділянок спостерігаються крововиливи.

На 10-ту добу експериментальної ішемії в деяких біоптатах спостерігають ділянки лімфо-макрофагальної гістіоцитарної реакції в 35 % випадків із наступною тенденцією до зменшення.

На 20-25-ту добу експериментальної ішемії розлади кровообігу в судинах м'язової тканини спостерігаються значно менше. В більшості спостережень повнокрів'я та стази були менш вираженими – 20 % випадків.

Однак навіть у цей термін спостереження доволі часто фіксували наявність вогнищ фуксинофілії і периваскулярного склерозу (фіброзу).

Окрім того, на тлі дистрофії і деструкції міопласту (25 % спостережень) були виявлені вогнища фрагментації мезенхімальних структур, які зменшувалися і зникали до 20-25-ї доби після моделювання ішемії.

Окремо слід зазначити, що до 20-25-го дня з'являються фібропластичні зміни стінки судин, спостерігаються потовщення та фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучної тканини. Крім того, в цей термін з'являлися поодинокі функціонуючі капілярні судини без явищ деструкції та стази крові (рис. 2).

Параметри та імуногістохімічні характеристики віментину, колагену IV типу і фактора Віллебранда були виражені нерівномірно та змінювались згідно з динамікою ішемічного процесу.

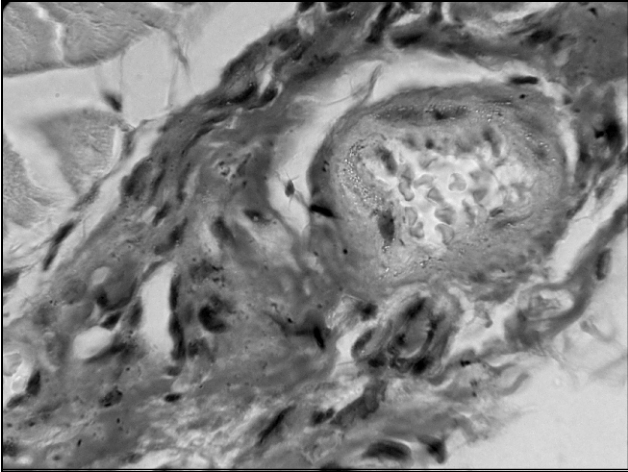


Рис. 2. Двадять п'ята доба ішемії. Фіброз стінки судин. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізона. Мікрофотографія. Ок. 10. Об. 40.

Найбільш виражена експресія віментину в міжм'язових волокнах, які оточують судинні пучки, а також у мембранах стінки судин венозного й артеріального типів спостерігалась на 7-15-ту добу ішемії (рис. 3).

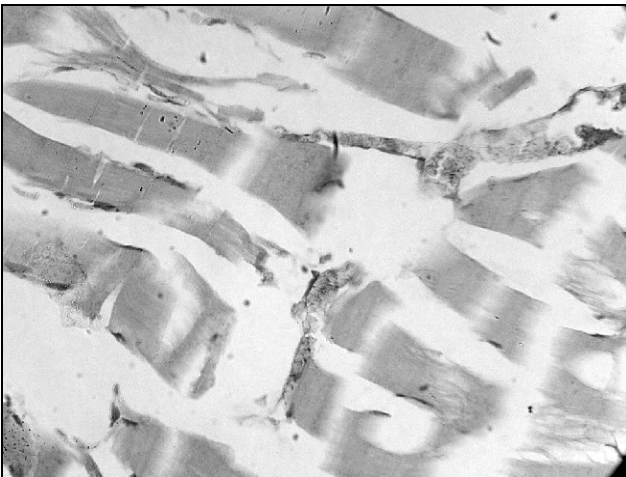


Рис. 3. Сьома доба ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії віментину з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10. Об. 20.

Експресія колагену IV типу на 7-10-ту добу ішемії була найбільш вираженою в стінці повнокровних артеріальних судин та ділянках розшарованої стінки венул (рис. 4).

Імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, особливо була виражена на 2-гу і 7-му доби експериментальної ішемії в повнокровних судинах ендомізії та перимізії (рис. 5).



Рис. 4. Десята доба ішемії. Експресія колагену IV типу в стінці венозної судини, в якій спостерігаються повнокрів'я і стаз еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії колагену IV типу з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10. Об. 40.

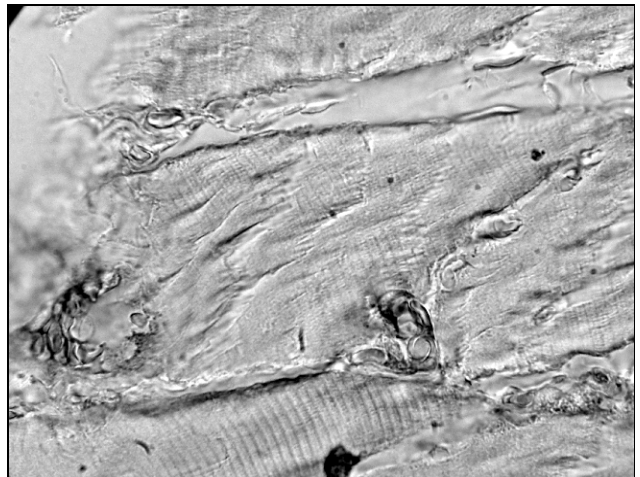


Рис. 5. Друга доба ішемії. Експресія фактора Віллебранда на тлі повнокрів'я капілярів і судин венозного типу, стази еритроцитів. Непрямий стрептовідин-пероксидазний метод виявлення експресії фактора Віллебранда з дофарбовуванням метиленовим зеленим. Мікрофотографія. Ок. 10. Об. 40.

Таким чином, з 2-ї до 10-ї 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.

Однак на 7-10 добу експериментальної ішемії спостерігається дещо збільшена експресія фактора Віллебранда та колагену IV типу, що свідчить про незначну регенераторно-компенсаторну реакцію ендотелію на ішемічне ураження, але вона має короткотривалий та нестійкий характер.

Необхідно відмітити, що прояв дегенеративно-дистрофічних змін у м'язовій тканині та капілярній мережі на 20-25-ту добу експерименту дещо зменшується, проте з'являється виражене фіброзування і склероз стінки судин у перимізії.

Висновки. Застосована модель ішемічного ураження, за даними гістологічного та імуногістохімічного дослідження, дозволяє об'єктивно оцінити характер деструктивних та компенсаторних

реакцій. Результати проведеного експериментального дослідження засвідчили патологічний вплив ішемічного стану, який призводить до істотної структурно-функціональної руйнації як самої м'язової тканини, так і капілярного русла. Наявність ознак первинного ангиогенезу в пізніх стадіях розвитку процесу свідчить про компенсаторну відповідь тканинних факторів на патологічний процес, але вони мають нестійкий та короткотривалий характер.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dormandy J.A., Nahir M., and Ascady G. Fate of the patient with chronic leg ischaemia. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. – 1999. – № 30. – P. 50-57.
2. Pell J.P., Fowkes F.G.R. Epidemiology of critical limb ischaemia // *Am J. Physiol Heart Circ Physiol*. – 2005. – № 2. – P. 23-29.
3. Князева Т.А. Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани // *Вестн. Акад. мед. наук СССР*. – 1974. – № 12. – С. 3-8.
4. Гистология / Под редакцией Ю.И. Афанасьевой, Н.А. Юриной. – М.: Медицина, 1999. – 543 с.
5. McDermott M.B., Swanson P.E., Wick M.R. Immunostains for collagen type IV discriminate between C-cell hyperplasia and microscopic medullary carcinoma in multiple endocrine neoplasia type 2a // *Hum. Pathol.* – 1995. – V. 26. – P. 1308-1312.
6. Senestol M., Lou-Jensen K. Factor VIII-related antigen as an endothelial cell marker in benign and malignant diseases // *Pathol. Arch.* – 1981. – V. 391. – P. 217-225.
7. Петров С.В., Райхлин И.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике тканей человека. – Казань, 2004. – 451 с.

Отримано 28.12.09