

УДК 616-005.4-092.4:843:615.387

Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, М.Ф. Соколов, В.М. Сірман, Г.С. Лобинцева
Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, м. Київ

ГІСТОЛОГІЧНА СТРУКТУРА М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ Й УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ КАПІЛЯРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

Результати проведеного експериментального дослідження свідчать про негативний вплив ішемічного ураження на стан м'язової тканини та складову частину капілярного русла – ендотеліоцит. Ішемічний стан обумовлює розвиток дегенеративно-дистрофічної перебудови міосимпласта з наступним його фіброзуванням, призводить до руйнації енергетично-пластичних структур ендотеліоцитів капілярів, а в подальшому до їх функціональної неспроможності. Компенсаторна реакція, ознаки якої фіксуються на 25-ту добу експерименту, має теоретичну і практичну значущість, особливо в аспекті її посилення шляхом клітинної стимуляції.

Ключові слова: ішемія, капіляр, ендотеліоцит, м'язова тканина.

Значний відсоток незадовільних результатів реконструктивних втручань при ураженні периферичного артеріального русла зумовлює розробку методів «непрямої» реваскуляризації [1, 2].

Перспективним напрямом науково-клінічних досліджень є активація процесів пригніченого ангиогенезу шляхом застосування клітинних трансплантатів, що потребує проведення первинних досліджень на простих і доступних експериментальних моделях, які б дозволили оцінити складні процеси деструктивних і компенсаторних реакцій, що виникають у відповідь на ішемічне ураження як на рівні морфоструктури м'язової тканини, так і складової частини капіляра – ендотеліоцита, та простежити динаміку їх змін після клітинної трансплантації [3–6].

Мета роботи – дослідити вплив ішемічного стану на ультраструктуру ендотеліоцитів капілярів і морфоструктуру м'язової тканини та оцінити можливість використання експериментальної моделі ішемії кінцівки за Т.А. Князевою [7] для подальшої клітинної трансплантації.

Матеріал і методи. Експериментальне дослідження проведено на базі експериментального відділу Національного інституту

хірургії та трансплантології НАМН України з використанням 40 нелінійних білих щурів, що утримувалися при кімнатній температурі, на звичайному лабораторному раціоні. Середня маса щурів – (370,47±8,31) г, вік – (6±1,2) міс. Усі оперативні втручання, під час яких зберігались умови асептики та антисептики, проводилися під кетаміновим наркозом. Ішемію задньої кінцівки моделювали за методом Т.А. Князевої: навкруги судинної ніжки, що кровопостачає тканини кінцівки, проводили дві лігатури на відстані 1 см одна від одної і перев'язували стегнову артерію (вище відходження глибокої артерії стегна) разом з веною [7]. На етапі забору матеріалу тварин виводили з експерименту шляхом передозування наркозу.

У всіх піддослідних тварин на 1, 2, 3, 7, 14, 22 та 25-ту добу була взята м'язова тканина медіальної і латеральної поверхонь стегна. Електронно-мікроскопічне дослідження проведено за загальноприйнятою методикою на базі відділу патоморфології Національного інституту хірургії та трансплантології НАМН України ім. О.О. Шалімова. Зрізи завтовшки 40–60 нм отримували на ультратомі УМТП-3 (Росія) та вивчали в електронному мікроскопі «ТЕСЛА БС-500»

© Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, М.Ф. Соколов та ін., 2013

(Росія). Гістологічне дослідження виконували на базі лабораторії патоморфології Інституту педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України. Забарвлення гематоксилін-еозином давало загальну уяву про тканинну структуру, дозволяло виявити усі клітинні елементи та деякі неклітинні структури. Забарвлення біоптатів пікрофуксином по ван Гізон дозволило дослідити динаміку змін сполучної тканини.

Результати. Гістологічне дослідження біоптатів м'язової тканини на 1-шу, а особливо на 3-тю–4-ту добу експерименту свідчить про наявність у венозних судинах вираженого вогнищевого повнокров'я і стазу еритроцитів. Крім того, зафіксований вогнищевий і нерівномірний периваскулярний набряк, при цьому частина ендотеліальних клітин судин була некротизованою і злушеною (рис. 1).

Судинна стінка була нерівномірно інфільтрована макрофагами й лімфоцитами. Дистро-

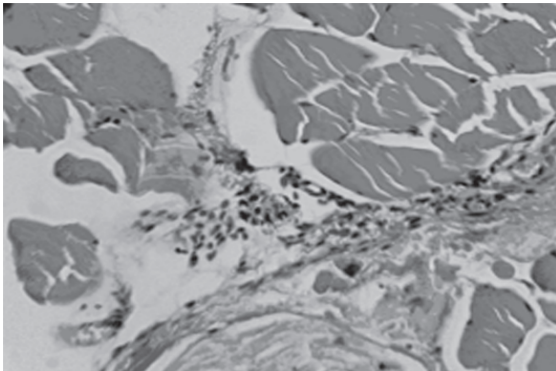


Рис. 1. Мікроструктура м'язових волокон у вогнищі дистрофії та вакуолізації на 2-гу добу змодельованої ішемії. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об. 10, ок. 40

фія й вакуолізація м'язових волокон характеризувалася вогнищевістю і нерівномірністю. М'язові волокна втрачали посмугованість, виявлялася втрата еозинофілії та поява базофілії. Відмічалася активація гістіоцитів, особливо макрофагів. На 7-му–15-ту добу експерименту деструктивні зміни морфоструктури м'язової тканини поглиблювалися.

Фіксували прогресивне (в порівнянні з 1-ю–3-ю добою експерименту) наростання деструктивних процесів у м'язових волокнах з наявністю вогнищ некрозу, ліпідної дистрофії, вакуолізації та набряку. Спостерігалися десквамація і некроз ендотеліальних клітин з наступною облітерацією просвіту капілярів.

Відбувалися розволокнення і набряк судинної стінки, та на тлі набряку міжм'язових ділянок мали місце вогнища крововиливів. У деяких біоптатах спостерігалися вогнища лімфомакрофагальної гістіоцитарної реакції (рис. 2).

Обговорення результатів. Аналіз результатів гістологічного дослідження біоптатів м'язової тканини, вилученої у тварин

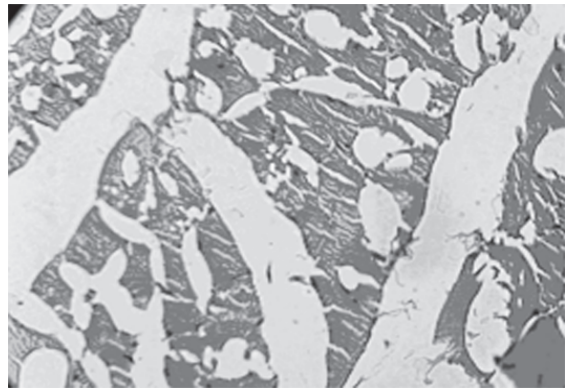


Рис. 2. Мікроструктура в ділянці вогнища лімфомакрофагальної інфільтрації в перимізії, набряк на 10-ту добу змодельованої ішемії. Забарвлення пікрофуксином по ван Гізон. Об. 10, ок. 20

на 2-гу–25-ту добу експерименту, свідчив про поступове зменшення розладів кровообігу в судинах м'язової тканини. В більшості спостережень (72,4 %) повнокров'я судин і стаз крові були менш вираженими, ніж у зразках попереднього терміну дослідження (7-ма–15-та доба). Однак доволі часто фіксували вогнища фуксинофілії, фібропластичні зміни стінки судин, потовщення та фіброз стінки артеріол і сполучної тканини (рис. 3).

На 1-шу–2-гу добу експерименту фіксували перші прояви змін ультраструктурних характеристик ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини. В 68,2 % біоптатів було відмічено зниження активності трансендотеліального мікропіноцитозу та зменшення кількості мікроворсинок. Комплекс Гольджі фактично був відсутній, цілісність плазматичної мембрани була порушена. Мітохондрії виглядали набряклими, з просвітленим матриксом і деструкцією крист. Ендотеліоцити капіляра були деформованими, набряклими та вакуолізованими, що свідчило про різке порушення водно-електролітного балансу клітин і функції їх цитоске-

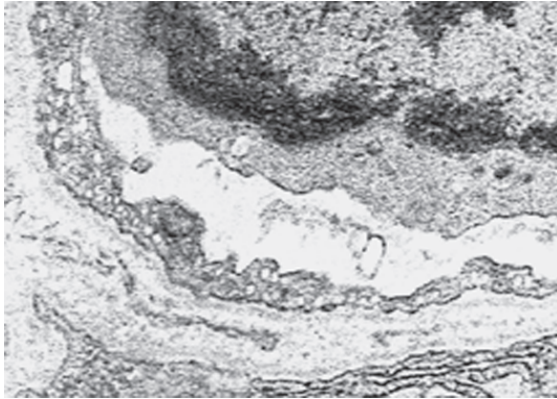


Рис. 3. Міопласт з ділянками периваскулярного фіброзу сполучної тканини на 25-ту добу змодельованої ішемії. Забарвлення пікрофуксином по ван Гізон. Об. 10, ок. 10.

лету та приводило до нездатності забезпечити повноцінний ендоекзоцитоз (рис. 4).

До 3-ї доби змодельованої ішемії спостерігалася тенденція до поглиблення деструктивних змін. Базальні мембрани представлені гомогенізованими структурами з явищами

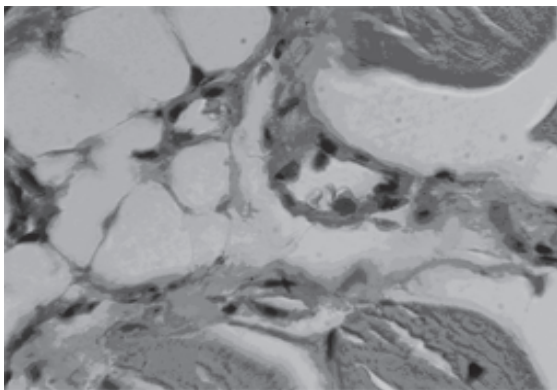


Рис. 4. Дрібновакуолярна деструкція ендотеліальних клітин. Праворуч лейкоцит у порожнині капіляра, х 18 000

розпушення та фрагментації. Зустрічалися капіляри з закритим просвітом і вмістом вільно розташованих мембран та їх комплексів або розширених і таких, що поспалилися, мієлоподібних структур.

Тим часом аналіз електроннограм на 7-му–15-ту добу спостереження свідчив про подальшу руйнацію клітинного апарату ендотеліоцита капіляра. Фіксували наявність значного субендотеліального набряку з розшаруванням збережених ендотеліальних острівців, деструкцію фібрилярної структури

аморфної речовини субендотеліальної зони та накопичення продуктів порушеного тканинного метаболізму.

В збережених ендотеліоцитах цитоплазматичний матрикс був різко просвітленим, що свідчило про втрату внутрішньоклітинного калію та інших іонів. Базальна мембрана ендотелію мала значно виражений набряк, а в деяких клітинах відмічалася посилена піноцитозна активність. Крім того, мали місце виражені зміни мітохондріальної системи, а саме дисконекція і розправлення кіст, дислокація їх мембран. Ядра електронно-світлових клітин набухли, хроматин розташований рихло. Вперше фіксували капіляри з пустим розширеним просвітом.

Результати електронно-мікроскопічного дослідження біопатів на 20-ту добу експериментальної ішемії свідчили про появу капілярів, просвіт яких був заповнений вільно розташованими цитоплазматичними структурами, що свідчило про розриви цитоплазматичних мембран ендотеліальних клітин. В матриксі знижувалася кількість рибосом і з'являлися фібрилярні структури з короткими гілчастими філаментами, що було зумовлено порушенням білкового обміну. Реєстрували деструкцію структурних елементів пластинчастого комплексу.

На 25-ту добу спостерігали збільшення кількості капілярів, просвіт яких був різко звуженим і з ознаками сладж-синдрому, що було пов'язане зі стазом крові та набуханням цитоплазми ендотеліоцитів. Просвіт деяких капілярів був повністю заповнений цитоплазматичним детритом, який утворювали елементи зруйнованих клітин (рис. 5).

Крім того, збільшувалась кількість капілярів, просвіт яких не візуалізувався у зв'язку з повним здавленням сполучною тканиною. В 84,9 % біопатів м'язової тканини цитоплазма ендотеліоцитів була просвітленою, містила поодинокі мітохондрії, в органелах спостерігали фрагментацію та деструкцію крист, а комплекс Гольджі був незадовільно розвиненим.

Однак на фоні деструктивних змін в 26,4 % спостережень фіксували наявність низькодиференційованих електроннощільних ендотеліоцитів, які мали вирости та інвагінації, збільшене гомогенізоване ядро, значну кількість рибосом і полісом. Поява

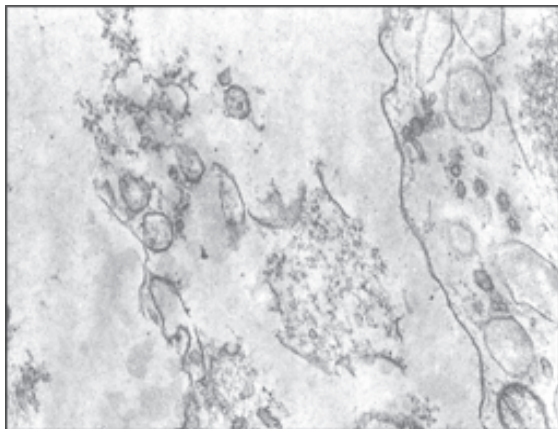


Рис. 5. Десквамація фрагментів цитоплазми ендотеліоцитів у просвіт капіляра, х 28 000

незрілих і молодих ендотеліоцитів була ознакою процесу первинного компенсаторного ангіогенезу.

Отже, результати дослідження свідчать про деструктивний вплив ішемічного стану на морфологічну структуру м'язової тканини та ультраструктуру ендотеліоцита капіляра. Ішемічне ураження вже на 1-шу – 3-тю добу спостереження призводить до деструкції структури м'язових волокон, формування вогнищ некрозів, ліпідної дистрофії та набряку. Однак з 20-ї – 25-ї доби експериментальної ішемії деструктивні процеси поступаються фібропластичним змінам: спостерігаються потовщення і фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучної тканини, що підтверджується результатами електронно-мікроскопічного дослідження. Просвіт капілярів заповнювався клітинним

детритом, який утворюється внаслідок руйнації основної складової частини капіляра – ендотеліоцита.

Аналіз електронограм біоптатів м'язової тканини свідчив про те, що ішемічне ураження на 1-шу–2-гу добу в 68,2 % спостережень спричинює руйнацію внутрішньоклітинних органел, що відповідають за енергетично-пластичну функцію ендотеліоцита, а на 25-ту добу 84,9 % ендотеліоцитів капілярів були функціонально непридатними. Первинні ознаки компенсаторного ангіогенезу вперше фіксувалися на 25-ту добу експерименту.

Висновки

1. Застосована експериментальна модель ішемії кінцівки є простою, доступною для виконання, дозволяє оцінити вплив ішемічного ураження як на морфологічну будову м'язової тканини, так і на ультраструктуру ендотеліоцита капіляра та придатна для подальшого дослідження з моделювання клітинної трансплантації.

2. Змодельований ішемічний стан кінцівки вже на 2-гу–3-тю добу експерименту обумовлює деструкцію структури м'язової тканини з наступним її фіброзуванням і призводить до руйнації енергетично-пластичних структур ендотеліоцитів капілярів, а в подальшому до їх функціональної неспроможності.

3. Ознаки первинного ангіогенезу, які фіксуються на 25-ту добу експерименту, свідчать про компенсаторну відповідь тканинних факторів на ішемічне ураження.

Список літератури

1. Pell J. P. Epidemiology of critical limb ischaemia / J. P. Pell, F. G. R. Fowkes // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 6, № 2. – P. 23–29.
2. Лукьянова Л. Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптация организма // *Фізіол. журн.* – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 17–35.
3. Рахмани С. А. Динамика некоторых биохимических показателей сыворотки крови при острой экспериментальной ишемии конечностей / С. А. Рахмани, А. Н. Мехтиева, С. М. Абдинова // *Патологическая физиология и экстренная терапия.* – 1998. – № 1. – С. 67–68.
4. Мишалов В. Г. Изучение патогенеза и моделирование хронической критической ишемии нижних конечностей в эксперименте / В. Г. Мишалов, В. А. Черняк, И. М. Дабабсех // *Сердце та судини.* – 2005. – № 2. – С. 102–108.
5. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes / C. Badorff, R. P. Brandes, R. Popp [et al.] // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107. – P. 1024–1031.

6. *Lachmann N.* Therapeutic angiogenesis for peripheral artery disease: stem cell therapy / N. Lachmann, S. Nikol // *Vasa*. – 2007. – Vol. 36, № 4. – P. 241–251.

7. *Князева Т. А.* Первичный механизм повреждения клеток в ишемизированной ткани / Т.А. Князева // *Вестник АМН СССР*. – 1974. – № 12. – С. 3–8.

Р.В. Салютин, С.С. Паляница, Н.Ф. Соколов, В.М. Сирман, Г.С. Лобынцева
**ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ И УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КАПИЛЛЯРОВ В УСЛОВИЯХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ**

Результаты проведённого экспериментального исследования свидетельствуют о негативном влиянии ишемического поражения на состояние мышечной ткани и составную часть капиллярного русла – эндотелиоцит. Ишемическое состояние определяет развитие дегенеративно-дистрофической перестройки миосимпласта с последующим его фиброзированием, приводит к разрушению энергетически-пластичных структур эндотелиоцитов капилляров, а в последующем к их функциональной несостоятельности. Компенсаторная реакция, признаки которой фиксируются на 25-е сутки эксперимента, имеет теоретическую и практическую значимость, особенно в аспекте её усиления путём клеточной стимуляции.

Ключевые слова: ишемия, капилляр, эндотелиоцит, мышечная ткань.

R.V. Salyutin, S.S. Palianytsia, M.F. Sokolov, V.M. Sirman, G.S. Lobynceva
**HISTOLOGICAL STRUCTURE OF MUSCULAR TISSUE AND ULTRASTRUCTURAL DESCRIPTION
OF ENDOTHELIOCYTES CAPILLARIES BY EXPERIMENTAL ISCHEMIA**

The results of the conducted experimental research testify of negative influence on the state of ischemic defeat of muscle tissue and component part of capillary river-bed endotheliocyte. The ischemic condition determines development of degenerative-dystrophic myosymplasts alteration with the following fibrosis him and destructions power-plastic structures of capillaries endotheliocytes, stipulating their functional insolvency. Compensatory reaction the signs of which are fixed on a 25 day of experiment has theoretical and practical meaningfulness, especially in the aspect of its strengthening by cellular stimulation.

Key words: ischemia, capillary, endotheliocyte, muscle tissue.

Поступила 03.12.12