

*Ю.В. МІНІН, А.Ф. КАРАСЬ, Г.А. КАРАСЬ, Т.І. КУЧЕРЕНКО,
Г.В. ЛАТИШЕВСЬКА, Г.Ю. МІНІНА*

МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ВВЕДЕННЯ КОЛАГЕНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

*Лаб. біофізики та відділ запальних захворювань ЛОР-органів
Ін-ту отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України*

Сучасні успіхи пластичної та реконструктивно-відновлювальної хірургії цілком справедливо пов'язуються, перш за все, з біоматеріалом колагеном. Він є найпоширенішим білком в організмі та виконує каркасну і пластичну функції, як при забезпеченні життєдіяльності клітин та тканин, так і при їх регенерації (Э.Г. Улумбеков, Ю.А. Чельшев 1998; Кольман, Рем., 2000; Л.Б. Бондаренко, 2004).

Про успішне використання колагену в оториноларингології свідчать численні дослідження (Р.К. Абоянц, Г.Ю. Дагадин, 1995; Ford et al., 1995; Anderson, Sataloff., 2004).

Разом з тим удосконалення та розробка нових підходів до лікування оториноларингологічних хворих в значній мірі залежить від розуміння морфологічних особливостей реактивних змін тканин при застосуванні колагену. Особливо важливо це при введенні імплантату в функціонально активну тканину, коли неприпустимо погіршення її фізіологічного стану. Саме тому в даній роботі з метою оцінки лікувальних можливостей ін'єкції колагену при пластичних та реконструктивно-відновлювальних операціях було поставлене завдання проведення комплексних експериментальних морфологічних досліджень м'язової тканини після введення аlogenного колагену.

Матеріал та методи

Експериментальні дослідження проведені на 32 білих безпородних щурах обох статей віком 2-3 міс, масою 180-210 г, яким внутрішньом'язово у верхню частину стегон задніх кінцівок ми вводили розчин ко-

лагену або фізрозчин в об'ємі 0,5 мл. Контролем слугувала група з 5 тварин, у яких в аналогічних умовах використовувався фізіологічний розчин.

Колаген для намічених досліджень був отриманий зі шкіри щурів за методикою, запропонованою Орехович та співавторами (1948), з урахуванням модифікацій (Dublet, Rest, 1991) та додатково застосованого нами заморожування. Кінцевий осад висушувався етанолом та ефіром чи розчинявся у невеликій кількості 3% оцтової кислоти при рН 3,0-4,0 і зберігався у холодильнику до застосування. Термін зберігання отриманого розчину колагену складав 2-3 міс. Для внутрішньом'язового введення тваринам відповідного розчину колагену ми доводили його рН до 6,0 при повільному додаванні розчину NaOH або KOH та замірюванні рН. Концентрація колагену у розчині визначалась після гідролізу білка на протязі 24 год за оксипроліном. Зазначений показник після нейтралізації складав 5 мг/мл. Отриманий колаген стерилізували шляхом γ -опромінювання, що досить давно використовується в трансплантології (Akkus et al., 2005; Dziedzic-Goclawska et al., 2005) в дозі 75 Гр.

Тварини утримувалися в стандартних умовах віварію з дотриманням загальних принципів гуманного поводження з ними та виводились з експерименту шляхом евтаназії за допомогою ефірного наркозу через 7 та 14 діб, а також 1, 3 та 6 міс після ін'єкційного введення колагену. Виділявся блок м'язових тканин, що включав зону введення та прилеглі тканини, для проведення морфологічних, електронно-мікроскопічних і люмінесцентних дослі-

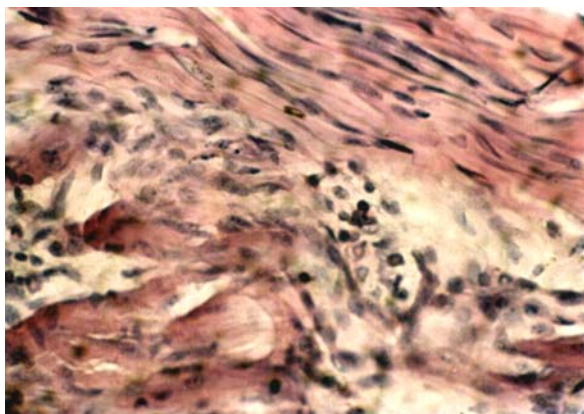
джень. Кожному строку відповідало виведення з експерименту 6-12 щурів.

При цьому для вивчення загальної морфологічної картини були використані загальноприйняті методи пофарбування гематоксиліном і еозином парафінових зрізів.

Електронно-мікроскопічне дослідження проводилося за загальноприйнятим методом з фіксацією шматочків у 2% розчині глутаральдегіду та заливкою в епоноаралдит (В.Я. Карупу, 1984). Проглядання і фотографування зрізів виконувалося в електронному мікроскопі ЕМВ 100-АК при прискореній напрузі 75 кВ та збільшенні в діапазоні 7-30 тисяч разів.

Результати досліджень та їх обговорення

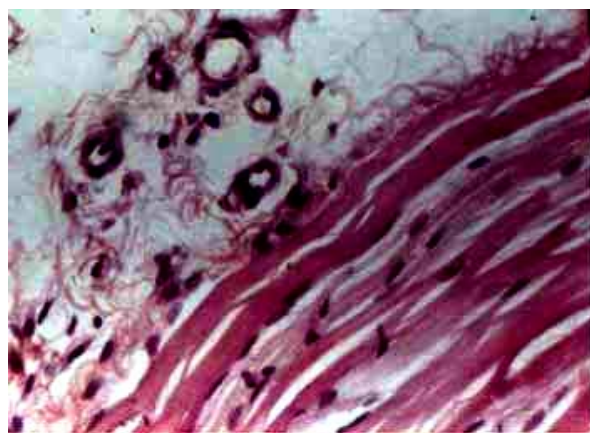
При вивченні препаратів, пофарбованих гематоксиліном і еозином, через 1 тиждень після введення колагену в тканинах стегна щурів спостерігалися явища розривлення структур м'язової тканини по периферії ділянок введення колагену та дисконкомплексації м'язових волокон, наявність ділянок з відносно гомогенною субстанцією та її клітинною інфільтрацією, розвиток макрофагальної реакції, а також порушення цілісності стінки кровоносних судин, вивоннення їх форменними елементами крові, набухання та округлення ендотеліоцитів (мікрофото 1).



Мікрофото 1. Явища дисконкомплексації м'язової тканини, інфільтрації, розвиток макрофагальної реакції, порушення цілісності стінки кровоносних судин, вивоннення їх форменними елементами крові, набухання та округлення ендотеліоцитів через 7 діб після внутрішньом'язового введення колагену. Фарбування гематоксиліном та еозином. Об. 25, ок.10

Привертало до себе увагу в цей час виявлення значної кількості тканинних базофілів (мастоцитів) та фібробластів. Така морфологічна характеристика, очевидно, свідчить про порушення мікроциркуляції та активний розвиток резорбтивних і репаративних процесів після введення колагену.

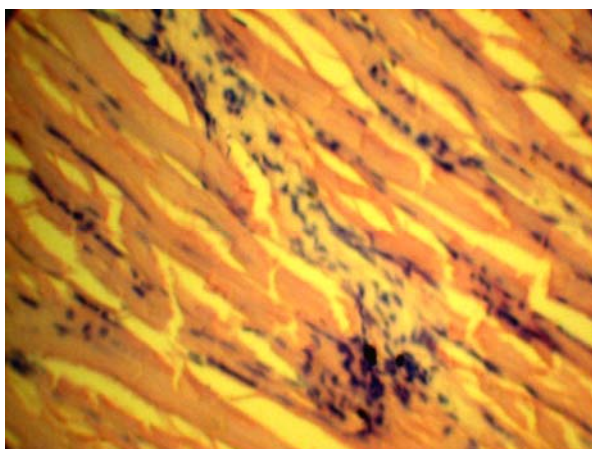
Через 14 діб після ін'єкції колагену спостерігається деяке зниження макрофагальної реакції та активація мастоцитів і фібробластів, біля яких зустрічаються волокнисті структури. Характерною при цьому є активація ендотеліоцитів судин, про що свідчить поява ознак їх розмноження, збільшення округлості та базофілії ядер, а також розміщення біля них мастоцитів. В цей період в зоні введення колагену визначається підвищена кількість кровоносних судин, що, відповідно, свідчить про зростання рівня васкуляризації м'язової тканини. В ділянках межування м'язових волокон з волокнистими структурами та численними судинами відмічаються також явища активації, що виражається, перш за все, збільшенням базофілії їх ядер, периферично розміщених м'язових клітин (мікрофото 2).



Мікрофото 2. Наявність багаточисельних кровоносних судин з округлими і базофільними ядрами серед волокнистих структур в зоні введення колагену через 14 діб після початку експерименту. Фарбування гематоксиліном і еозином. Об. 25, ок. 10.

Через 1 міс після внутрішньом'язового введення колагену між м'язовими волокнами виявляються ділянки розростання сполучної тканини та зберіга-

ються явища подразнення периферично розміщених ядер м'язових волокон (мікрофото 3).



Мікрофото 3. Ділянки розростання сполучної тканини та явища подразнення периферично розміщених ядер м'язових волокон через 1 місяць після введення колагену. Фарбування гематоксилином і еозином. Об. 25, ок. 10.

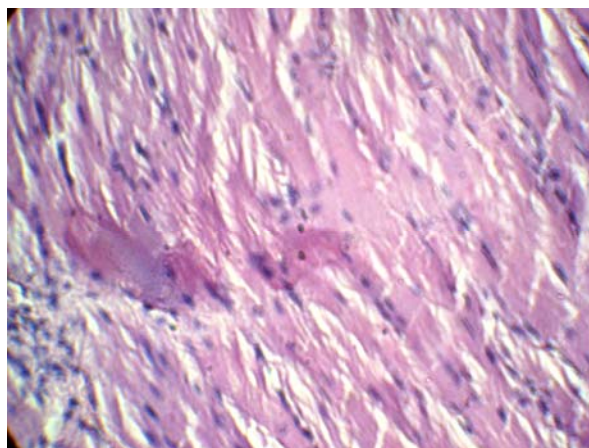
При дослідженні препаратів тканин стегна у щурів через 3 місяці після введення колагену має місце наявність невеликих залишків гомогенних ущільнених утворень та ділянок розростання сполучної тканини між м'язовими волокнами (мікрофото 4).

Описана морфологічна картина залишків гомогенних утворень та сполучнотканинних розростань може свідчити про локальне збільшення об'єму тканин після введення колагену. Подібне твердження узгоджується з даними літератури (Ford et al., 1995; Hoffman et al., 2002) про те, що ін'єкції колагену здатні збільшувати об'єм тканин та сприяти поліпшенню функції голосових складок.

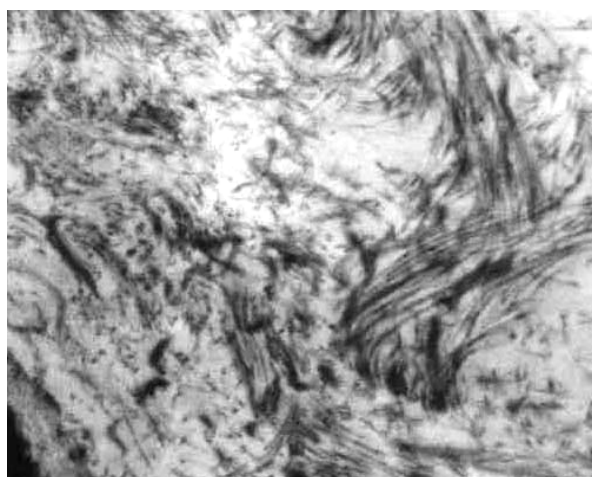
Окремо слід підкреслити, що вивчення препаратів м'язової тканини у щурів не виявило ознак підвищеної реактивності на введення біоімплантату, появи гранулом чи утворення капсул навкруги колагенових мас, що свідчить про його сумісність з навколишніми тканинами та узгоджується з даними інших дослідників.

При електронно-мікроскопічному дослідженні було встановлено, що через 7 діб після експериментального введення колагену

у м'язи щура виявляються пучки тонких колагенових мікрофібрил, окремих обривків та пікнотичних фібробластів. Особливо привертала увагу наявність своєрідних електроннотемних десмосомоподібних утворень, які розміщувалися, головним чином, паралельно ходу мікрофібрил (мікрофото 5).



Мікрофото 4. Залишкові сполучнотканинні та гомогенні утворення в м'язовій тканині через 3 місяці після початку експерименту. Фарбування гематоксилином і еозином. Об. 25, ок. 10.



Мікрофото 5. Пучки тонких мікрофібрил, окремих обривків та електроннотемні десмосомоподібні утворення, розміщені, головним чином, паралельно ходу мікрофібрил, через 7 діб після внутрішньом'язового введення колагену. Електроннограма, x 13000.

За даними літератури (Э.Г. Улумбеков, Ю.А. Чельшев, 1998), такі десмосомоподібні структури відображають високий рівень транспортних комунікацій та, зокрема, процесів стабілізації цитоскелету.

В цей же час, поряд з цитоплазмою клітини типу макрофага часто виявлялися зони розрихлення, просвітління та гомогенізації колагенових утворень, очевидно, пов'язані з явищами лізису (мікрофото 6).



Мікрофото 6. Наявність зони розрихлення, просвітління та гомогенізації колагенових утворень поряд з цитоплазмою клітини типу макрофага через 7 діб після введення колагену в м'язи щура. Електроннограма, х 13000.

Подібна ультраструктурна характеристика своєрідних електронотемних десмосомоподібних утворень, розміщених, головним чином, по ходу фібрилярних пучків паралельно з ділянками розрихлення, просвітління та гомогенізації колагенових утворень, явно свідчить про високий рівень метаболізму, що відбувається різними шляхами, а саме: розвиток процесів взаємообміну між структурними елементами введеного колагену і клітинами хазяїна (так звані процеси іморталізації, безпосереднього використання первинних колагенових утворень); активація резорбтивних процесів, які звичайно характерні для метаболізму колагену при різних фізіологічних та патологічних станах (З.К. Мацкевичус, 1987; М.М. Калашникова, 2000).

В цей період виявляються поодинокі нейтрофільні лейкоцити і макрофаги. Крім того, зважаючи на те, що ці клітини секретують фактори росту фіброblastів і синтезу колагену та індукторів проліферації, хемотаксису, можна говорити про активний розвиток після ін'єкції, окрім колагеногенезу, реактивних процесів та позитивний вплив введеного колагену на формотворення, а також про підвищену функціональну активність тканин в зоні наявності біоімплантату.

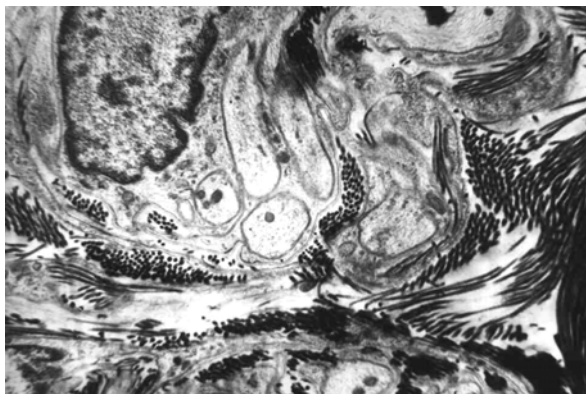
Через 1 міс після експериментального введення колагену в стегно щура виявляються у великій кількості малодиференційовані та юні фіброblastи з ознаками активного колагеноутворення. Для таких фіброblastів характерною рисою є наявність невеликого об'єму цитоплазми, в якій визначаються елементи гранулярної ендоплазматичної сітки, рибосомальні розетки і рибосоми. В ядрі знаходиться, як правило, одне ядро і переважає еухроматин. Особливо характерною є наявність багаточисельних вакуолей і пухирців різної величини та електронної густини в цитоплазмі з явищами активної інвагінації плазмолемми, а також велика кількість тонких та товстих фібрил, які буквально виходять з фіброblastа.

Приймаючи до уваги дані літератури (С.Л. Кузнєцов, Н.Н. Мушкамбаров, 2005) про те, що колагенові волокна формуються за участю первинних мікрофібрил, протеогліканів та глікопротеїдів, а також наявність виявлених при електронній мікроскопії численних електронно-світлих та темних вакуолей, що звичайно і виконують функції збереження та транспорту речовин для внутріклітинного синтезу колагену, ми маємо безумовні підстави говорити в даному випадку про активний колагеногенез в зоні ін'єкції.

Особливо привертало до себе увагу при електронно-мікроскопічному дослідженні виявлення поєднання значної кількості фібрилярних колагенових структур з явищами активації ендотеліальних клітин, їх активного розмноження в процесі судиноутворення (мікрофото 7).

Подібна ультраструктурна характеристика цілком узгоджується з даними літератури (Grimes et al., 2005) про важливе значення екстрацелюлярного матрикса, до якого і відноситься колаген, та його важливу

роль в базальних мембранах. Автори підкреслюють, що тримірний екстрацелюлярний матричний матеріал з колагену I типу може швидко поглинатися та забезпечити ранній і потужний неоваскулярогенез. Саме таке активне судиноутворення і демонструється наочно цією електронною грамою.



Мікрофото 7. Наявність активованих ендотеліальних клітин, поділ клітин та численних колагенових мікрофібрил через 7 днів після введення колагену в м'язи щура. Електроннограма, x 11 000.

Проведені електронно-мікроскопічні дослідження дозволили виявити також активний розвиток міофібробластів, які розміщувалися в периферичних ділянках м'язових волокон та в зонах наявності введеного колагену. Цитоплазма таких клітин мала численні вакуолі і пухирці різної електронної густини, а плазмолема виявляла виражені інвагінації, а також велику кількість тонких та товстих фібрил (мікрофото 8).

Знаходження поряд з міофібробластом окремих фрагментів колагену та ділянок сформованих колагенових пучків у цей строк, очевидно, свідчить про активне колагеноутворення.

Через 3 міс після введення колагену в цій зоні виявлялася значна кількість активних фібробластів з наявністю численних фібрил в цитоплазмі та колагенових пучків за цитоплазматичною оболонкою. Для них характерна розвинута гранулярна ендоплазматична сітка, інвагінації ядерної мембрани та рівномірне розміщення еу- і гетерохроматину, що свідчить про високу функціональну активність таких клітин. В цей період спостерігалась також наявність фібро-

цитів. Відомо, що фіброцити слабо синтезують колаген і відповідають, в основному, за регуляцію метаболізму і механічну стабільність сполучної тканини.



Мікрофото 8. Активний міофібробласт з численними вакуолями і пухирцями різної електронної густини в цитоплазмі, явищами активної інвагінації плазмолемми, а також з великою кількістю тонких та товстих фібрил через 1 міс після введення колагену в стегно щура. Електроннограма, x 14 000.

В результаті проведених експериментальних досліджень показано, що ін'єкційне введення біополімеру колагену у м'язову тканину викликає активний розвиток процесів утилізації біоімплантату та колагеноутворення, підвищення рівня функціональної характеристики волокнистих структур та стимуляцію судиноутворення, а також збільшення тканинної маси (розростання сполучної тканини).

Дані, отримані при ультраструктурних дослідженнях в експерименті на щурах, свідчать про те, що введення в тканини колагену супроводжується утилізацією імплантатного матеріалу фібробластами – клітинами, які є ефекторами репарації, активацією колагеногенезу, міжклітинних комунікацій та стабілізацією цитоскелету, а також укріпленням та збільшенням тканинної маси.

Таким чином, отримані результатами експериментальних, проведених з використанням світлової та електронної мікроскопії досліджень, свідчать про те, що ін'єкція алоколагену в м'язи стегна викликає в зоні введення активний розвиток клітинних реакцій, пов'язаних з утилізацією імплантат-

ного матеріалу і активацією колагеногенезу без проявів гіперреактивності. Такі клітинні реакції також відображають високий рівень реактивних процесів в тканинах в зоні

ін'єкції. Це, в свою чергу, і зумовлює збільшення та зміцнення сполучнотканинних структур, необхідних для отримання результату в клінічній практиці.

1. Абоянц Р. К., Дагадин Г. Ю. Применение коллагена в оториноларингологии // Вестн. оториноларингологии. – 1995. – №2. – С. 47-49.
2. Бондаренко Л. Б. Преобразование коллагенов в организме: современное состояние проблемы // Укр. бюхім. журн. – 2004. – Т. 76, №5. – С. 5-15.
3. Калашникова М.М. Ультраструктурная характеристика процесса резорбции коллагена в цирротически измененной печени // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000. – Т. 129, №1. – С. 3-11.
4. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. – Киев: Вища школа, 1984. – 210 с.
5. Клименко Н.А. Татарко С.В. Морфологические критерии интенсивности дегрануляции свободных и фиксированных тканевых базофилов в зависимости от ее типа // Морфология. – 1997. – Т.111, №1. – С. 100.
6. Кольман Я., Рем К. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
7. Кузнецов С. Л., Мушкамбаров Н. Н. Гистология, цитология и эмбриология: Учебник для медицинских вузов. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство». – 2005. – 600 с.
8. Мацкевичус З.К. Механизмы и роль биодegradации коллагена в патологии // Арх. патол. – 1987. – №1. – С. 3-10.
9. Минин Ю.В., Карась А.Ф., Кучеренко Т.И. Хирургическое лечение стойких органических дисфоний // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2006. – №3с. – С. 141-142.
10. Минин Ю.В., Карась Г.А., Карась А.Ф., Кучеренко Т.М., Чайка С.П., Печонова Т.В., Мініна А.Ю. Экспериментальне дослідження можливостей ін'єкційного застосування аутоколагену для лікування хворих при порушеннях голосотворюючої функції гортані // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2004. – №3-с. – С. 238-239.
11. Орехович В.Н., Густановский А.А., Орехович К.Д., Плотникова Н.Е. // Биохимия. – 1948. – Т.3, №1. – С. 55-62.
12. Улумбеков Э. Г., Чельшев Ю. А. Гистология. – М.: Гэотар, Медицина, 1998. – С. 950.
13. Anderson T.D., Sataloff R.T. Complications of collagen injection of the vocal fold: report of several unusual cases and review of the literature // J. Voice. – 2004. – V.18, 3:392-397.
14. Dublet B. Rest M. Type XIV collagen. A new homotrimeric molecule extracted from Fetal Bovin Skin and tendon, with a Triple helical disulfide – bonded domain homologous to type IX and type XII collagens // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266, N11. – P. 6833-6858.
15. Ford Ch. N., Staskowski P.A., Diane M., Bless M. Autologous collagen vocal cffold Injection: A Preliminary Clinical Study // Laryngoscope. – 1995. – V. 105, №9. – P. 944-948.
16. Grimes M., Pembroke J.T., McGloughlin T. The effect of choice of sterilisation method on the biocompatibility and biodegradability of SIS (small intestinal submucosa) // Biomed. Mater. Eng. – 2005. – V.15, №1-2. – P. 65-71.

Надійшла до редакції 30.05.07.

© Ю.В. Мінін, А.Ф. Карась, Г.А. Карась, Т.І. Кучеренко, Г.В. Латишевська, Г.Ю. Мініна, 2007

**МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОННО-
МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИОН-
НОГО ВВЕДЕНИЯ КОЛЛАГЕНА В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*Минин Ю.В., Карась А.Ф., Карась Г.А.,
Кучеренко Т.И., Латышевская Г.В.,
Минина Г.Ю. (Киев)*

Резюме

Изучались морфологические и ультраструктурные изменения мышечной ткани после введения коллагена в эксперименте на крысах. В динамике на протяжении 3 мес исследовались параллельно протекающие процессы резорбции коллагена, неокollaгeнeзa, активации микроциркуляторного русла и прорастание сосудов в новообразованную соединительную ткань. Сделан вывод о целесообразности использования коллагена с целью локального увеличения объема тканей и повышения их функциональной активности.

**MORPHOLOGICAL AND ELECTRO-
MICROSCOPIC RESEARCH OF
A MUSCULAR TISSUE AFTER COLLAGEN
INJECTION IN EXPERIMENT**

*Minin Y.V., Karas A.F., Karas G.A.,
Kucherenko T.I., Latyshevskaya G.B.,
Minina G.Y. (Kiev)*

Summary

Morphological and ultrastructural changes of a muscular tissue after collagen injection in experiment on rats were studied. In dynamics throughout 3 months in parallel proceeding processes collagen resorption, neocollagenase, microcircular channels activation and germination of vessels in a neogenic connecting tissue were investigated. The conclusion is drawn on expediency of use of collagen for the purpose of local increase in volume of tissues and increase of their functional activity.