

*А.Ф. КАРАСЬ, Г.А. КАРАСЬ, Г.В. ЛАТИШЕВСЬКА, Г.Ю.МІНІНА*

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ІННЕРВАЦІЇ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ВВЕДЕННЯ КОЛАГЕНУ**

*Лаб. біофізики та від. запальних хвороб ЛОР-органів Держ. установи  
«Ін-т отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України»  
(дир. - чл.-кор. АМНУ, проф. Д.І. Заболотний)*

Стійкі розлади фонації, які об'єднуються під загальною назвою "органічні дисфонії", здебільшого є наслідком дегенеративних та атрофічних уражень нервово-м'язового апарату гортані і зумовлюють недостатню аддукцію голосових складок під час фонації (Ford et al., 1995; Chhetri, 2003).

Певні можливості функціональної реабілітації хворих з даною патологією, на думку ряду дослідників (Accordi et al., 1988; Remacle et al., 1990; Hoffman et al., 2002; Anderson, Sataloff, 2004; Sewall et al., 2006), відкриває застосування методів ін'єкційної хордопластики з використанням колагену. Однак, незважаючи на проявлену зацікавленість до впровадження введення колагену при пластичних та реконструктивних операціях в оториноларингології, багато питань залишаються відкритими. Особливо важливим для лікування пацієнтів з цією патологією є не лише збільшення об'єму голосової складки, але й підтримування на відповідному рівні її функціональної активності. Це визначається біологічними властивостями імплантата та реакцією на нього навколишніх тканин. Саме тому в даній роботі з метою оцінки можливостей колагенопластики при наявності нервово-м'язової патології структур гортані було поставлено завдання провести експериментальне морфологічне дослідження стану іннервації м'язової тканини після ін'єкційного введення колагену.

### ***Матеріал та методи***

Експериментальні дослідження проведені на 35 білих безпородних щурах обох

статей віком 2-3 міс, масою тіла 180-210 г, яким внутрішньом'язово у верхню частину стегон задніх кінцівок вводився розчин колагену в об'ємі 0,5 мл. Контролем служила група з 5 тварин, яким в аналогічних умовах вводився фізіологічний розчин. Утримування тварин і проведення експериментів здійснювалися з дотриманням загальноприйнятих принципів гуманного поводження з тваринами.

Колаген для намічених цілей ми отримували зі шкіри щурів методом кислотного гідролізу. Для внутрішньом'язового введення тваринам рН отриманого розчину колагену у 3% оцтовій кислоті доводилась до 6,0 шляхом повільного доливання розчину NaOH або KOH. Концентрація колагену у розчині визначалася після гідролізу білка на протязі 24 год при температурі 105°C 6N HCl за оксипроліном. Зазначений показник після нейтралізації трохи зменшується до 5 мг/мл відносно базового рівня, що складає 6 мг/мл. Крім того, перед введенням з метою обеззараження колаген піддається гамма-опроміненню.

Тварини виводилися з експерименту шляхом евтаназії з використанням ефірного наркозу через 1 та 2 тижні, а також 1, 3 та 6 міс після ін'єкційного введення колагену, після чого забиралися шматочки тканин для проведення досліджень. Кожному строку відповідало виведення з експерименту 5-7 щурів.

Вивчення стану нервових структур в м'язовій тканині здійснювалося за допомогою світлооптичного мікроскопа після ім-

прегнації солями срібла за методикою Більшовського у модифікації В.В. Коротченка (1969). З метою ідентифікації морфологічних змін паралельно проводилося фарбування зрізів гематоксиліном та еозином. Крім того, додатково препарати фарбувалися розчином флуоресцентного барвника – акридинового оранжевого (1:30000) під водною імерсією та досліджувався рівень інтенсивності флуоресценції за методом В.Н. Карнаухова (1978). Збудження люмінесценції викликалося смугою опромінення ртутною дуговою лампою ДРШ-250 при довжині хвиль 436 нм. Інтенсивність флуоресценції клітин в області 330 та 450 нм реєструвалася на люмінесцентному мікроскопі ЛЮМАМ-И-3. Паралельно для ідентифікації тканинних базофілів (мастоцитів) вибірково була поставлена гістохімічна реакція з толуїдиновим синім при  $pH < 3$ . Препарати вивчалися з використанням світлового мікроскопа “МБИ-6”.

### **Результати досліджень та їх обговорення**

Дослідження стану нервових структур після внутрішньом'язового введення колагену показали, що через 7 та 14 днів серед м'язових волокон виявляються численні тонкі волоконця з помірною аргірофілією та значна кількість гіпераргірофільних волокон з варикозними розширеннями (мікрофото 1), що свідчить про розвиток реактивних процесів в зоні введення колагену і ушкодження структури тканин та нервових утворень.

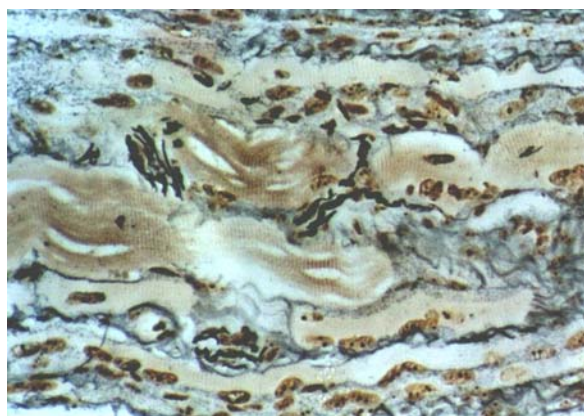
Через 1 місяць після введення колагену в м'язи стегна щура спостерігається виражене проростання нервових структур між м'язовими волокнами зі збереженням ознак гіпераргірофілії (мікрофото 2).

У цей же строк визначалися також добре сформовані нервові волокна біля новоутворених кровоносних судин (мікрофото 3).

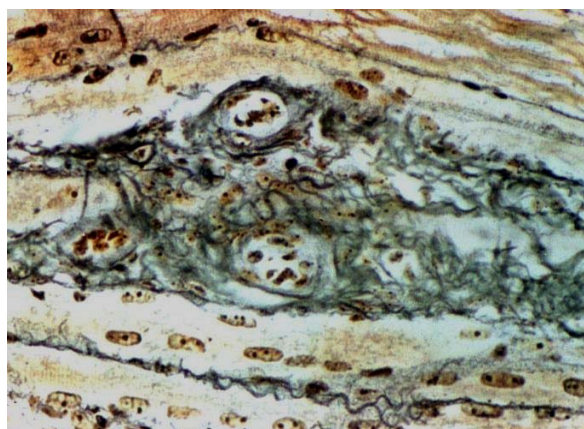
Такі мікроскопічні зміни відображають переважно периваскулярну проліферацію нервових волокон та свідчать про можливість додаткового утворення нервових зв'язків, що посилює нейротрофічну дію та в цілому має важливе значення при трансплантації та регенерації (П. Г. Пивченко, 1997).



Мікрофото 1. М'яз стегна білого щура через 14 днів після початку експерименту. Наявність численних тонких волоконць з помірною аргірофілією та значної кількості гіпераргірофільних волокон з варикозними розширеннями. Імпрегнація сріблом за способом Більшовського у модифікації Коротченка. Об. 25, ок. 10.



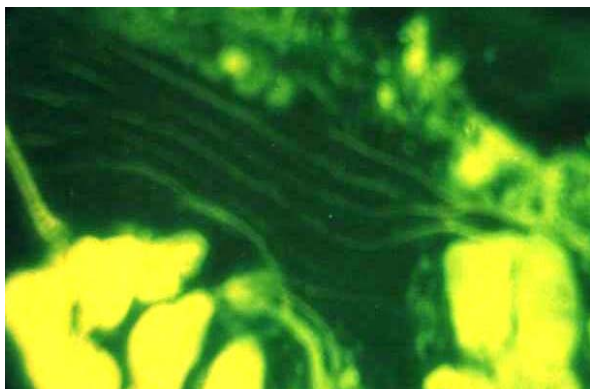
Мікрофото 2. М'яз стегна білого щура через 30 днів після початку експерименту. Проліферація нервових структур поміж м'язовими волокнами зі збереженням ознак гіпераргірофілії. Імпрегнація сріблом за способом Більшовського у модифікації Коротченка. Об.25, ок. 10.



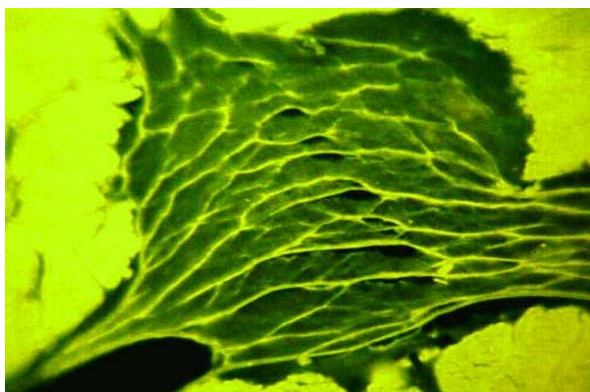
Мікрофото 3. М'яз стегна білого щура через 30 днів після початку експерименту. Сплетіння аргірофільних нервових волокон навкруги кровоносних судин через 1 місяць після введення колагену в м'язи стегна щура. Імпрегнація сріблом за способом Більшовського у модифікації Коротченка. Об.25, ок. 10.

Через 3-6 міс в сполучній тканині, яка проростає між м'язовими клітинами, вже спостерігається добре сформована мережа нервових волокон і нервових закінчень, що розміщуються між м'язовими структурами та безпосередньо їх іннервують.

Характерним є те, що при паралельному дослідженні в люмінесцентному мікроскопі пофарбованих акрединоним оранжевим препаратів через 2-3 міс після введення колагену було виявлено значне збільшення рівня флуоресценції нервових волокон в порівнянні зі строком 7 діб. Якщо на 7-у добу від початку дослідження нервові волокна давали помірний рівень жовто-зеленої флуоресценції, то через 2-3 міс визначалась яскрава флуоресценція добре розгалужених нервових волоконець від жовто-зеленого до червоного кольору, які розміщувались між яскраво флуоресціюючими м'язами (мікрофото 4, 5).



Мікрофото 4. М'яз стегна білого щура через 7 діб після початку експерименту. Помірний рівень флуоресценції нервових волоконець, розміщених між м'язами. Фарбування акрединоним оранжевим. Об.40, ок. 20.



Мікрофото 5. М'яз стегна білого щура через 90 діб після початку експерименту. Чітка мережа нервових волоконець з високим рівнем флуоресценції, розміщених між м'язами. Фарбування акрединоним оранжевим. Об.40, ок. 20.

Поруч з нервовими волокнами часто виявляються мастоцити з високим рівнем флуоресценції від жовто-зеленого до червоного кольору. Їх характерне розміщення біля судин забезпечує діяльність гемодинамічних і трофічних регуляторних механізмів в тканинах та органах (П.А. Мотавкин и соавт., 1992, 1997; Н.А. Клименко, С.В. Тартарко, 1997).

Аналізуючи отримані в роботі дані про розвиток і розміщення нервових волокон з явищами гіпераргірофілії і варикозних змін як між м'язовими волокнами, так і навколо кровоносних судин, слід припустити можливе виникнення реіннерваційних процесів та створення додаткових нервових зв'язків в умовах трансплантації алоколагену в м'язи щурів. Ці результати узгоджуються також з деякими даними літератури. Так, Uvöginen і співавтори (1995) роблять висновок, що після трансекції фібіального нерва тонкі фібрилярні структури утвореного зовнішньоклітинного колагенового матриксу формують ложе, вздовж якого відбувається регенерація аксона, і таким чином сприяють відновленню морфологічної цілісності нерва. А.В. Свіріним та співавторами (2003) при підкапсулярній імплантації колагенової губки при атрофії зорового нерва, спричиненій захворюванням на глаукому, були отримані позитивні клінічні результати – покращання васкуляризації сітківки ока та поліпшення функції зорового нерва протягом 1 року.

В той же час, приймаючи до уваги дані літератури про те, що здатність живих структур до флуоресценції є ознакою їх успішної життєдіяльності, високої функціональної активності та структурної завершеності (В.Н. Карнаухов 1978; Н.А. Черногрядская и соавт., 1978; А.М. Горчаков и соавт., 1999; В.Г. Меренков, 2006), отримані в роботі додаткові дані про наявність високого рівня флуоресценції м'язових і нервових волокон у віддалений період після введення алоколагену дають підстави говорити про позитивні зміни в структурній організації та функціональній активності нервових утворень і м'язів в цілому.

Таким чином, результати морфологічних досліджень нервових утворень в м'язовій тканині разом з даними люмінесцентної мік-



роскопії свідчать про те, що ін'єкційне введення в м'язи щурів колагену викликає активний розвиток неоіннерваційних процесів, утворення навколо м'язів і біля кровоносних судин додаткових нервових зв'язків. При трансплантації алоколагену в м'язи щурів спостерігається також підвищення функціональної активності нервових структур та

м'язових волокон, на що вказує високий рівень їх флуоресценції. Отримані дані дають можливість вважати, що екзогенне введення колагену сприяє поліпшенню кровопостачання та іннервації тканин і є перспективним для використання з метою коригування дефектів тканин та органів, пов'язаних з порушеннями нейротрофічної регуляції.

1. Горчаков А.М., Карнаух В.М., Меленец Ю.В., Горчакова Ф.Т. Идентификация патологических состояний на основе люминисцентного анализа клеток крови // Биофизика. – 1999. – Т.44, №3. – С. 559-564.
2. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М.: Наука, 1978. – 208 с.
3. 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.
4. Коротченко В.В. Модифікація методу Більшовського (дослідження нервових тканин) // Фізіол. журн. – 1969. – Т.15, №4. – С. 571-572.
5. Меренков В. Г. Использование макроскопического флуоресцентного анализа при исследовании остеологического материала. – © 2006 г. <http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/N-12-html/merenkov/merenkov.htm>
6. Мотавкин П.А. Современные представления о механизмах регуляции мозгового кровообращения // Морфология. – 1992. – Т. 103, вып. 7-8. – С. 7-36.
7. Мотавкин П.А., Зуга М.В., Баранов В.Ф., Елисеева Е.В., Невзорова В.А. Моаминергическая иннервация медиастинальной плевры плодов человека // Морфология. – 1997. – Т.111, №1. – С. 43-46.
8. Пивченко П. Г. Закономерности регенерации подчревного нерва собаки при его трансплантации в стенку толстой кишки // Морфология. – 1997. – Т.111, №1. – С. 46-52.
9. Свириной А.В., Хоу Сяньжу, Елисеева Т.О. Эффективность подкапсульной имплантации коллагеновой губки в лечении глаукоматозной атрофии зрительного нерва // Вестн. офтальмол. – 2003. – Т.119, №3. – С. 6-8.
10. Черноградская Н.А., Розанов Ю.М., Богданова М.С., Боровиков Ю.С. Ультрафиолетовая флуоресценция клетки. – Л.: Наука, 1978. – 215 с.
11. Accordi M., Oliva C., Finco G. The use of collagen of crosslinked structure (phonagel) for the surgical treatment of cordal atrophy. First experiments in Italy // Acta Phoniatr. lat. – 1988. – V.10, № 3. – P. 366 – 372.
12. Anderson TD, Sataloff RT. Complications of collagen injection of the vocal fold: report of several unusual cases and review of the literature // J. Voice. – 2004. – V.18, №3. – P. 392-397.
13. Chhetri O.K., Blumin J.H., Vinters H.V., Berke G.S. Histology of nerves and muscles in adductor spasmodic dysphonia // Ann Otol Rhinol Laryngol. – 2003. – V.112, №4. – P. 334-341.
14. Ford Ch. N., Staskowski P.A., Diane M., Bless M. Autologous collagen vocal fold Injection: A Preliminary Clinical Study // Laryngoscope. – 1995. – V. 105, №9. – P. 944-948.
15. Hoffman H., McCabe D., McCulloch T., Jin S.M., Karnell M. Laryngeal collagen injection as an adjunct to medialization laryngoplasty // Laryngoscope. – 2002. – V.112, №8 Pt 1. – P. 1407-1413.
16. Remacle M, Lawson G, Delos M, Jamart J. Correcting vocal fold immobility by autologous collagen injection for voice rehabilitation. A short-term study // Ann Otol Rhinol Laryngol. – 1990. – V.108, №8. – P. 788-793.
17. Sewall GK, Jiang J, Ford CN. Clinical evaluation of Parkinson's-related dysphonia // Laryngoscope. – 2006. – V.116, №10. – P. 1740-1744.
18. Vuorinen V, Siironen J, Roytta M. Axonal regeneration into chronically denervated distal stump. 1. Electron microscope studies // Acta Neuropathol (Berl). 1995. – V.89, №3. – P. 209-218.

Надійшла до редакції 13.06.07.

© А.Ф. Карась, Г.А. Карась, Г.В. Латишевська, Г.Ю.Мініна, 2007

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ  
МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ИННЕРВАЦИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ  
ИНЪЕКЦИОННОГО ВВЕДЕНИЯ КОЛЛАГЕНА**

*Карась А.Ф., Карась Г.А., Латышевская Г.В.,  
Минина А.Ю. (Киев)*

*Резюме*

На основании морфологических исследований и люминесцентной микроскопии нервных образований мышечной ткани показано, что инъекционное введение в мышечную ткань крыс коллагена вызывает активное развитие неиннервационных процессов, образование вокруг мышц и кровеносных сосудов дополнительных нервных связей. Выявлено повышение функциональной активности нервных структур и мышечных волокон, о чем свидетельствует высокий уровень их флуоресценции. Полученные данные дают основание заключить, что экзогенное введение коллагена способствует улучшению иннервации и кровоснабжения тканей и является перспективным для применения с целью корректировки дефектов тканей и органов, обусловленных нарушением нейротрофической регуляции.

**EXPERIMENTAL MORPHOLOGICAL  
INVESTIGATION OF MUSCULAR TISSUE  
INNERVATIONS AFTER THE COLLAGEN  
INJECTION**

*Karas A.F., Karas G.A., Latushevskaya G.V.,  
Minina A.Y. (Kiev)*

*Summary*

On the basis of morphological investigations luminescent microscopy of muscular tissues nerve formations it is shown, that the collagen injection in the rats muscular tissues cause the active development of the neoinnervational processes, formation of additional nerve connections around muscles and blood vessels. It was found the nerve structures and muscle fibers rising functional activity, and the high level of fluorescence is witnessed about that. The acquired data said that exogenous collagen injections promote the innervation processes and tissues blood supply.