

## МОРФОЛОГІЯ

© Ю.О.Безсмертний

УДК 612.398.192: 661.982: 612.015.6: 611.73: 599.323.4

Ю.О.Безсмертний

**ОСОБЛИВОСТІ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН М'ЯКИХ ТКАНИН ЩУРІВ ПРИ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ, ЇЇ КОМБІНАЦІЇ З ІНГІБУВАННЯМ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА КОРЕКЦІЇ ДЕКАМЕВІТОМ****НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету  
ім. М.І.Пирогова (м. Вінниця)**

Дана робота є фрагментом НДР «Вивчити роль молекулярно-генетичних, метаболічних, гемокоагуляційних та імунзапальних чинників у формуванні порушень репаративного остеогенезу та розробити рекомендації з його оптимізації», номер держ. реєстрації 0110U006379.

**Вступ.** В останні роки встановлено [2, 4], що гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є незалежним чинником розвитку серцево-судинних захворювань та тромботичних ускладнень. Механізми несприятливого впливу надлишку гомоцистеїну (ГЦ) пов'язують з токсичною його дією на ендотелій судин через стимуляцію проліферації гладенько-м'язових клітин судин, посилення оксидативного стресу, активацію агрегації тромбоцитів і коагуляційного каскаду, гальмуванням антикоагуляційної системи та продукції оксиду азоту [5, 6, 7]. Описані морфологічні прояви індукованих ГГЦ змін стосуються лише серцево-судинної системи і ідентифікуються у вигляді гіпертрофії ендотеліальних клітин, ущільнення субендотеліального простору, зміщення еластичної мембрани, гіпертрофії гладеньких м'язових клітин, розшарування середньої оболонки артеріальних судин [3].

Відомо, що метаболічні процеси та функціональний стан м'яких тканин значною мірою залежить від особливостей кровопостачання. Не виключено, що залучені в реалізацію токсичної дії ГГЦ судинні механізми можуть негативно впливати не тільки на стан кровопостачання м'яких тканин, а й на їх морфофункціональний стан, однак детальних досліджень в цьому напрямку не проводилось.

**Метою роботи** було дослідити в експерименті вплив ГГЦ, її поєднання з введенням інгібітору синтази оксиду азоту L-NAME та корекції засобом з гіпогомоцистеїмічною дією декамевітом на морфологічний стан м'яких тканин у щурів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Досліди проведені на 60 білих нелінійних щурах-самцях масою 250-270 г. Під час експериментів всі тварини перебували в стандартних умовах, з 12-годинним світло-тіньовим режимом, вільним доступом до води та їжі і отримували напівсинтетичну крохмально-казеїнову дієту з контрольованим вмістом всіх макро- та мікронутрієнтів [3]. Модель ГГЦ створювали у 40

тварин (групи 2, 2а, 3, 4) шляхом інтрагастрального введення тіолактону D, L-гомоцистеїну (Fluka, Німеччина) в дозі 100 мг/кг маси тіла 1 раз на добу. Тваринам 3 групи додатково давали неселективний інгібітор синтази оксиду азоту L-NAME (метиловий ефір L-N $\omega$ -нітроаргініну) в дозі 30 мг/кг маси 1 раз на добу. Вказані речовини вводили на 1% розчині крохмалю протягом 28 діб. Контроль (групи 1а, 1) склали 20 щурів, яким вводили еквівалентні об'єми розчину крохмалю.

Для профілактики ГГЦ-індукованих порушень був використаний полівітамінний комплекс декамевіт (Декамевіт®, АТ «Київський вітамінний завод») – єдиний з вітчизняних препаратів, який містить в одній таблетці високі дози вітамінів В6, В9, В12 - 20,0; 2,0; 0,1 мг. Декамевіт додавали в дієту тварин 4 групи весь термін досліду в кількості 781 мг на 1 кг сухого корму, що забезпечувало надходження 1430 мкг вітаміну В6, 143 мкг вітаміну В9, 7,15 мкг вітаміну В12 на 1 кг маси тіла тварин. Вказані дози вітамінів В6, В9, В12 перевищують добову потребу щурів в 7-20 разів, при цьому є нетоксичними і мають гіпогомоцистеїмічну дію [1].

Частину тварин (групи 1а, 2а) виводили з експерименту на 14 добу, а решту (групи 1, 2, 3, 4) – на 28 добу під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Досліди виконували згідно міжнародних вимог «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Strasburg, 1986), правил гуманного відношення до експериментальних тварин, затверджених комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І.Пирогова.

Вміст загального ГЦ в сироватці крові визначали імунферментним методом набором «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія).

Для мікроскопічного дослідження шматочки судин, м'язів та нервів фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну за стандартною методикою, зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та заливали в парафін. Гістологічні зрізи готували товщиною до 15-20 мкм, забарвлювали гематоксилін-еозіном та пікрофуксином за ван Гізон. Гістологічні зрізи нервових волокон забарвлювали гематоксилін-еозіном.

## МОРФОЛОГІЯ

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм "MS Excel XP". Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Введення тваринам тіолактону ГЦ в дозі 100 мг/кг маси тіла викликало достовірне зростання рівня ГЦ в сироватці крові за станом на 14 та 28 добу в 2,4 та 2,6 рази, відповідно. Введення інгібітору синтази оксиду азоту L-NAME потенціувало формування ГЦ: у тварин 3 групи (ГЦ + L-NAME) вміст ГЦ втричі перевищував такий в контролі. Збагачення дієти тварин полівітамінним комплексом декамевіт стимувало розвиток ГЦ - вміст ГЦ в сироватці крові у тварин 4 групи (ГЦ + декамевіт) підвищився лише в 1,5 рази (табл.).

Таблиця

**Вміст гомоцистеїну в сироватці крові за умов ГЦ, її поєднання з введенням L-NAME та корекції декамевітом (M±m, n=10)**

№ групи	Характеристика групи	Вміст ГЦ в сироватці крові, мкмоль/л
Стан на 14 добу		
1а	Контроль	7,23±0,25
2а	ГЦ	17,2±1,20*
Стан на 28 добу		
1	Контроль	7,19±0,26
2	ГЦ	18,5±0,99*
3	ГЦ + L-NAME	21,9±1,17*#
4	ГЦ + декамевіт	11,0±0,74*#

**Примітка:** \* - p<0,05 – відносно групи відповідного контролю;  
# - p<0,05 – відносно групи 2.

При гістоморфологічному дослідженні тканин шурів з тіолактон-індукованою ГЦ (група № 2а) на 14 добу в місцях локалізації судин спостерігали набряк та периваскулярну клітинну інфільтрацію. Ендотеліальний шар судин був потовщеним, нерівномірним, з ділянками значної десквамації. Поряд з проліферацією ендотеліоцитів, які мали вигляд «частоколу» і займали стовпчасте положення, в

поодиноких місцях десквамації ендотелію реєстрували виразний набряк внутрішньої оболонки судин. На зрізі капілярних судин, в місцях пошкодження ендотеліального шару, спостерігали реактивне розмноження ендотеліоцитів, виражену проліферацію гладком'язових елементів, внутрішньосудинну агрегацію еритроцитів з формуванням поодиноких пристінкових тромбів.

В скелетних м'язах відмічені набряк та помірні дистрофічні зміни. Набряк, який розповсюджувався під епімізієм, поєднувався з руйнуванням сарколемми м'язових волокон, дисконплексацією міофібрил та втратою ними еозінофільності. Між м'язовими волокнами, які характеризувались втратою поперечної міофібрилярності та поперечної посмугованості, простежувались ділянки з вираженою інфільтрацією ефекторними клітинами запалення, що вказувало на ознаки розвитку інтерстиційного міозиту.

В нервових волокнах, що пронизували скелетні м'язи, спостерігали субепіневральний набряк з ознаками розшарування епіневрію. При великому збільшенні візуалізувались гіпертрофовані та інтенсивно базофільно забарвлені ядра шванівських клітин на фоні гідронізації нервових волокон.

На 28 добу спостереження в судинах формувалась картина більш виразних альтераційних та тромботичних змін. Простежувались об'ємні ділянки десквамації та проліферації ендотеліоцитів з стовпчастим стоянням його ядер, гіпертрофія гладеньких міоцитів, звуження просвіту, внутрішньосудинна агрегація тромбоцитів та еритроцитів з формуванням численних тромбів, які в більшості випадків перекривали їх просвіт.

Під впливом токсичної дії ГЦ в м'язових волокнах відмічали глибокі дистрофічні зміни з декомплексацією та деградацією міофібрил, формуванням тканинного детриту та некрозу. Ядра міофібрил були гіпохромними, в частині препаратів не простежувались. Саркоплазма міофібрил втрачала такі ознаки структурності як поздовжню та поперечну посмугованість. Глибокі дистрофічні та некротичні зміни в м'язових волокнах викликали реакцію ефекторних клітин – макрофагів, лімфоцитів, рідше нейтрофільних лейкоцитів та тучних клітин, які формували інфільтрати поміж стромальних та ендомізієвих проміжків. Мікроскопічно простежувалась типова картина альтеративного та інтерстиційного міозиту. В нервах відмічали дистрофічні зміни, які характеризувались вираженим набряком епіневрію, периневрію та ендоневрію, розшаруванням, а в частині препаратів аневризматичним потовщенням з лінійним просвітленням нервових волокон.

У тварин, яким протягом чотирьох тижнів вводили інтрагастрально тіолактон ГЦ в комбінації з L-NAME, порівняно з групою № 2, відмічено більш виразну агрегацію еритроцитів. Досить часто такі агрегати займали більшу частину просвіту судини з утворенням пристінкових тромбів. При ретракції тромба виявлялись ділянки десквамації ендотеліоцитів та значний набряк інтими в цих місцях. Пошкодження

та потовщення ендотеліального шару судин поєднувалось з проліферацією гладком'язових елементів, набряком та периваскулярною інфільтрацією.

В м'язах цих тварин спостерігали більш глибокі дистрофічні та некротичні зміни, що супроводжувались формуванням запальних інфільтратів, які містили здебільшого еозінофільні клітини. Запальні інфільтрати простежувались поміж альтерованих і розріджених м'язових волокон та в прошарках сполучної тканини з ліпоцитами. В більшості препаратів реєструвались широкі зони спотворено забарвлених поперечних зрізів м'язових волокон базофільного характеру з втратою повздожньої та поперечної посмугованості, ділянками вираженої запальної інфільтрації. На фоні глибоких дистрофічних змін відмічали фокуси вздуття та розшарування міофібрил з утворенням зон некрозу м'язових волокон та формуванням тканинного детриту.

В нервових волокнах спостерігали виражений набряк, дегенерацію нервових волокон, інфільтрацію нервових стовбурів лімфоцитами та еозінофілами, ознаки артеріїту та облітерацію в нервовому стовбурі. Набряк та наслідки ексудації спричинювали потовщення, розволокнення нерва, розрідження та фрагментацію волокон.

У тварин, яким на фоні введення тіолактону ГЦ у комбінації з L-NAME призначали декамевіт (група № 4), виявлено менш виразну внутрішньосудинну агрегацію тромбоцитів та еритроцитів в порівнянні з тваринами без корекції. Загальний план будови стінки судин подібний до контрольних тварин, хоча, в окремих полях простежуються незначні ділянки десквамації ендотеліоцитів, поодинокі пристінкові тромби, які значно менші, ніж у тварин попередніх груп. Зменшення токсичної дії тіолактону ГЦ на ендотелій судин під впливом декамевіту чітко простежується при великому збільшенні мікропрепаратів. Так, в артеріях та венах, поряд з помірними ознаками стазу та повнокров'я, не відмічається стовбчастого розташування ядер ендотеліоцитів, відсутні ознаки проліферації гладком'язових елементів та периваскулярні клітинні інфільтрати.

Схожа мікроскопічна картина простежується з боку скелетних м'язів та нервів. Так, на фоні незначно відмінного забарвлення м'язових волокон та набряку, відсутні набухання та дисконкомплексация міофібрил, збережена їх повздожня міофібрилярність та поперечна посмугованість. На поперечному зрізі м'язових волокон не помітно контрасту еозінофілії волокон. Ядра м'язових волокон та міосателітних клітин мають базофільне забарвлення. Клітинні інфільтрати відсутні.

Нерви характеризуються звичайною будовою, ознак їх потовщення, розволокнення та фрагментації не відмічено.

Таким чином, у тварин з тіолактон-індукованою ГЦ на 14 добу спостереження відмічено набряк, гіперплазію та десквамацію ендотеліального шару судин, проліферацію гладком'язових елементів, внутрішньосудинну агрегацію еритроцитів з формуванням поодиноких пристінкових тромбів. ГЦ

спричинювала помірні дистрофічні зміни в скелетних м'язах, які характеризувались набряком, дисконкомплексацияю міофібрил з втратою ними повздожньої міофібрилярності та поперечної посмугованості, розвитком інтерстиційного міозиту. На 28 добу експерименту поглиблювались альтеративні, тромботичні та дистрофічні прояви токсичної дії ГЦ. В судинах простежувались об'ємні ділянки десквамації та проліферації ендотеліоцитів, гіпертрофія гладеньких міоцитів, внутрішньосудинна агрегація тромбоцитів та еритроцитів з формуванням численних тромбів. В м'язах та нервах відбувались виражені патологічні зміни, які характеризувались просторими дистрофічними та некротичними процесами, що відбувались на фоні ушкодження ендотелію судин, тромбоутворення та клітинної інфільтрації. Слід відмітити, що при поєднанні ГЦ з L-NAME мікроскопічна картина альтеративних, тромботичних та дистрофічно-некротичних проявів була більш виразною.

Призначення декамевіту запобігало токсичному впливу ГЦ на судини, м'язи та нерви. Відмічено зменшення агрегації тромбоцитів та еритроцитів у просвіті судин, зменшення числа тромбів та їх розмірів. Поряд з менш виразними змінами в ендотеліоцитах, відмічали помірні дистрофічні зміни в м'язових волокнах з збереженням їх структурної поперечної та повздожньої міофібрилярності.

### Висновки.

1. Тіолактон-індукована ГЦ вже на 14 добу експерименту викликає значні зміни в судинах (набряк, гіперплазія та десквамація ендотеліального шару, проліферація гладком'язових елементів, внутрішньосудинна агрегація еритроцитів з формуванням поодиноких пристінкових тромбів), м'язах (набряк, дисконкомплексация міофібрил з втратою повздожньої міофібрилярності та поперечної посмугованості і розвитком інтерстиційного міозиту), нервах (субепіневральний набряк з ознаками розшарування).

2. В більш віддалені терміни (28 днів) вказані зміни поглиблювались: в судинах простежувались об'ємні ділянки десквамації та проліферації ендотеліоцитів, гіпертрофія гладеньких міоцитів, внутрішньосудинна агрегація тромбоцитів та еритроцитів з формуванням численних тромбів; в м'язах та нервах на фоні ушкодження ендотелію судин, тромбоутворення та дистрофічно-некротичних проявів наступали виражені дистрофічні та некротичні процеси.

3. Поєднання ГЦ з введенням неселективного інгібітора синтази оксиду азоту L-NAME викликало більш виразні альтеративні, тромботичні та дистрофічно-некротичні прояви.

4. Призначення декамевіту дозволяє профілакувати токсичний вплив ГЦ на тканини.

**Перспективи подальших досліджень** направленні на з'ясування ролі гіпергомоцистеїнемії в розвитку порушень репаративної регенерації кісткової тканини та розробку патогенетично обґрунтованих підходів до профілактики та лікування кісткової дисрегуляції, асоційованої з синдромом ГЦ.

## Список літератури

1. Артемчук М.А. Профілактично-лікувальна дія вітамінних та вітамінно-мікроелементних препаратів за гострої та хронічної метіонінової гіпергомоцистеїнемії / М.А. Артемчук // Biomedical and Biosocial Anthropology. - 2006. - №7. - С.17-20.
2. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / Пентюк О. О., Луцюк М. Б., Андрушко І. І., Поставітенко К. П. // Укр. біохім. журн. - 2003. - Т.75, №1. - С.5-17.
3. Пентюк О.О. Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О.О. Пентюк, М. Б. Луцюк, К. П. Поставітенко // Досягнення біології та медицини. - 2004. - №1 (3). - С.35-38.
4. A comparative study on pathogenic effects of homocysteine and cysteine on atherosclerosis / J.Su, S.Wang, Y.Hunag [et al.] // Wei Sheng Yan Jiu. - 2009. - Vol. 38, № 1. - P. 43-46.
5. Homocysteine and arterial disease. Experimental mechanisms / J.W.Cook, L.M.Taylor, S.L.Orloff [et al.] // Vascul Pharmacol. - 2002. - Vol. 38, № 5. - P. 293-300.
6. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials / C.Antoniades, A.S.Antonopoulos, D.Tousoulis [et al.] // Eur Heart J. - 2009. - Vol. 30, № 1. - P. 6-15.
7. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease / H.Jakubowski // J. Physiol. Pharmacol. - 2008. - Vol. 59, № 9. - P. 155-167.

УДК 612.398.192: 661.982: 612.015.6: 611.73: 599.323.4

### **ОСОБЛИВОСТІ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН М'ЯКИХ ТКАНИН ЩУРІВ ПРИ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ, ЇЇ КОМБІНАЦІЇ З ІНГІБУВАННЯМ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА КОРЕКЦІЇ ДЕКАМЕВІТОМ**

**Безсмертний Ю.О.**

**Резюме.** Досліджено вплив гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ), її комбінації з введенням інгібітора синтезу оксиду азоту та корекції декамевітом на морфологічний стан м'яких тканин. Встановлено, що на фоні ГГЦ в м'язах та нервах розвивались виражені дистрофічні та некротичні процеси, що відбувались на фоні ураження ендотелію судин, тромбоутворення та клітинної інфільтрації. Поєднання ГГЦ з введенням неселективного інгібітора синтази оксиду азоту L-NAME значно поглиблювало альтеративні, тромботичні та некротичні зміни в тканинах. Призначення декамевіту профілакувало токсичний вплив ГГЦ на тканини.

**Ключові слова:** гіпергомоцистеїнемія, м'які тканини, оксид азоту, декамевіт

УДК 612.398.192: 661.982: 612.015.6: 611.73: 599.323.4

### **ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ, ЕЁ КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИРОВАНИЕМ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА И КОРРЕКЦИИ ДЕКАМЕВИТОМ**

**Бессмертный Ю.А.**

**Резюме.** Исследовано влияние гипергомоцистеинемии (ГГЦ) и её комбинации с введением ингибитора синтеза оксида азота и коррекции декамевитом на морфологическое состояние м'яких тканей. Установлено, что на фоне ГГЦ в мышцах и нервах развиваются выраженные дистрофические и некротические процессы, которые осуществляются на фоне поражения эндотелия сосудов, тромбообразования и клеточной инфильтрации. Сочетание ГГЦ с введением неселективного ингибитора синтазы оксида азота L-NAME значительно усугубляло альтеративные, тромботические и некротические изменения в тканях. Назначение декамевита профилакировало токсическое влияние ГГЦ на ткани.

**Ключевые слова:** гипергомоцистеинемия, мягкие ткани, оксид азота, декамевит.

UDC 612.398.192: 661.982: 612.015.6: 611.73: 599.323.4

### **Peculiarities Of Morphological Changes In Soft Tissues Of Rats In Hyperhomocysteinemia, Its Combination With Nitric Oxide Synthesis Inhibition And Correction By Decamevitum**

**Bessmertnyi I.A.**

**Summary.** Influences of hyperhomocysteinemia (HHcy), its combination with administration of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME and correction by Decamevitum on morphological condition of soft tissues. Established that the background HHcy in the muscles and nerves developed pronounced dystrophic and necrotic processes that took place against a background of vascular endothelial damage, thrombus formation and cellular infiltration. Combining HHcy with the introduction of nonselective nitric oxide synthase inhibitor L-NAME significantly deeper alternatives, thrombotic and necrotic changes in tissues. Appointment Decamevitum warned HHcy toxic effects on tissue.

**Key words:** hyperhomocysteinemia, soft tissues, nitric oxide, Decamevitum.

Стаття надійшла 18.10.2011 р.