

© Коллектив авторов, 2010  
УДК 616.34-007.271-018.61:599.323.4

А.Л. Зашихин<sup>1</sup>, Я. Селин<sup>2</sup> и А.О. Бармина<sup>1</sup>

## РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЛАДКОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ

<sup>1</sup>Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А.Л. Зашихин) Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск; <sup>2</sup>Департамент интегративной медицинской биологии (зав. — проф. Я. Селин) Университета Умеа, Швеция, e-mail: zashihin2@atknnet.ru

При использовании световой, электронной микроскопии и иммуногистохимических методов изучали реактивную трансформацию гладкой мышечной ткани (ГМТ) стенки кишки при развитии острой частичной высокой обтурационной кишечной непроходимости. Исследован материал тонкой кишки 10 крыс-самцов, полученный в зоне наложения лигатуры в проксимальной и дистальной зонах, которые отстояли от нее на 3 см. Исследования показали, что при частичной кишечной непроходимости имеет место неодинаковый характер структурно-функциональной трансформации ГМТ, обусловленной различием функциональных и деструктивных нагрузок. При этом перестройка популяции гладких миоцитов является одним из механизмов адаптации ГМТ к изменяющимся условиям функционирования. Иммуногистохимический анализ не выявил изменения характера экспрессии маркерных и фенотипических белков в исследуемых зонах тонкой кишки в динамике эксперимента.

**Ключевые слова:** гладкая мышечная ткань, гладкие миоциты, реактивность, иммуногистохимия, электронная микроскопия.

Гладкие миоциты (ГМ) висцеральной мышечной ткани обладают отчетливо выраженной чувствительностью к воздействию экстремальных факторов [9, 12, 15]. Ответная реакция гладкой мышечной ткани (ГМТ) реализуется как на клеточном, так и на тканевом уровне. На этапе срочной компенсаторно-приспособительной реакции значительные по силе факторы могут вызвать некробиотические изменения в ГМ, что выражается в осмиофилии цитоплазмы, ее вакуолизации, расширении цистерн комплекса Гольджи и эндоплазматической сети, просветлении матрикса митохондрий и нарушении контактов между клетками [8, 11–13]. На долговременном этапе адаптации компенсаторные и приспособительные реакции выражаются в виде репаративной регенерации или компенсаторной гипертрофии [2, 5].

Настоящая работа выполнена с целью изучения реактивной трансформации ГМТ стенки тонкой кишки при развитии острой частичной обтурационной кишечной непроходимости.

**Материал и методы.** Исследование выполнено в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ №755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) на 20 половозрелых белых беспородных крысах, содержащихся в стандартных условиях лабораторного вивария.

Для изучения реактивного ответа ГМТ лабораторных животных (белые крысы) (n=10) использовали модель экспериментальной частичной обтурационной кишечной непроходимости [8]. Материал брали на 3-и сутки в трех зонах: в зоне наложения лигатуры, в проксимальной и дистальной

зонах, которые отстояли от нее на 3 см. В качестве контроля использовали материал тонкой кишки 10 интактных крыс.

Для получения однородной взвеси изолированных ГМ и изучения фрагментов стенки тонкой кишки использовали оригинальный метод прицельной клеточной диссоциации [4], позволяющий избирательно выделять из стенки органов тканевые компоненты определенного типа. Выделенные микрофрагменты диссоциировали в 50% водном растворе КОН в течение 2,5–3 ч. Разделения клеток достигали с помощью гидроудара струи воды из микропипетки с последующим пассажем содержимого пробирки, что позволяло получить однородную взвесь клеток, из которой готовили мазки. Выявление ДНК в ядрах проводили в строго идентичных условиях по методу Фельгена [6], контролем служили мазки, не подвергшиеся гидролизу в растворе соляной кислоты. Суммарный белок цитоплазмы выявляли амидочерным 10Б [1].

Цитоспектрофотометрический анализ проводили с помощью сканирующего спектрофотометра МФТХ-2М (ЛОМО, Россия), оборудованного монохроматором и позволяющем строго выдерживать параметры длины волны. ДНК фотометрировали при длине волны 546 нм, а суммарный белок цитоплазмы — при 580 нм зондом диаметром 0,5 мкм. Одновременно измеряли линейные размеры ГМ и их ядер при помощи окулярного микрометра МОВ-1-15х в двух взаимно перпендикулярных плоскостях. Объемы ГМ и их ядер вычисляли по формуле эллипсоида вращения [7].

Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) в течение 2 ч и дофиксировали в течение 1 ч в 2% растворе тетраоксида осмия при температуре 5 °С. Кусочки промывали в буфере, затем обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и ацетоне, в 70% спирте контрастировали 1% уранилацетатом в течение 12 ч и заливали в смесь эпон-аралдита. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (Bromma, Швеция), подвергали двойному контрастированию в 2,5% раство-

ре уранилацетата и 0,3% растворе цитрата свинца по E.S. Reynolds [16], в последующем просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-100CX (Япония).

Для оценки экспрессии маркерных и фенотипических белков в ГМТ тонкой кишки крыс был использован иммуногистохимический метод. Материал фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0,1M фосфатно-солевом буфере (PBS, Sigma, США) при pH 7,4, заливали в парафин, затем готовили срезы толщиной 5–7 мкм. Срезы инкубировали в течение 30 мин в PBS с добавлением 0,6% перекиси водорода, 1% раствора тритона X-100 и 5% нормальной лошадиной сыворотки (Vector Laboratories, Inc, США).

Экспозицию с первичными антителами осуществляли в течение 2 ч при температуре 37°C. В качестве первичных антител использовали: моноклональный иммуноглобулин G1 мыши к десмину, клон D33 (1:100, Dakopatts, Дания), моноклональный IgG мыши к виментину, клон 3B4 (1:50, Dako, Дания), моноклональный IgG2 мыши к  $\alpha$ -актину, клон 1A4 (1:100, Biomed, США), моноклональный IgG мыши к миозину, клон 12B (1:100, Chemicon, США). Для разведения антител использовали буфер с белком (bovine serum albumin, Sigma Chemical Company, США) при pH 7,2.

Визуализацию реакции иммунофлюоресцентным методом проводили вторичными антителами (1:200), конъюгированными с флюорохромами изотиоцианатом флюоресцеина (FITC) для десмина D33,  $\alpha$ -гладкомышечного актина, гладкомышечного миозина и виментина 3B4; и вторичными антителами, конъюгированными с Cy3 для виментина (ICN); использовали моноклональные люминесцентные флюорохромы: Alexa Fluor 594, красный, поликлональные Alexa Fluor 488, зеленый (IgG, Molecular Probes, Inc, США) (45–60 мин при комнатной температуре). Докраску ядер клеток проводили с помощью ядерного красителя DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол, Molecular Probes, Inc, США). Результаты окрашивания оценивали с помощью флюоресцентного микроскопа (Olympus, Германия).

При пероксидазо-антипероксидазном методе использовали вторичные биотинилированные антитела (biotinylated anti-mouse IgG, H+L, Vector, Laboratories, США) с добавлением 5% нормальной лошадиной сыворотки в течение 45–60 мин при температуре 37 °C. Затем проводили промывку. После этого инкубировали в течение 45 мин с пероксидазо-антипероксидазо (ПАП)-иммунным комплексом (пероксидаза хрена, тип IgG1, Dako) в разведении 1:100 в течение 30 мин. Продукты иммунопероксидазной реакции визуализировали хромогеном (диаминобензидин, DAB, 1%, Dako, Дания) в течение 5–10 мин. Результаты оценивали при световой микроскопии.

Вариационные ряды обрабатывали в пакете Statistica 6.0, результаты представляли в виде среднего значения и его стандартной ошибки. Значимость различий с контролем определяли с помощью критерия Стьюдента для независимых выборок при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Для получения четких структурно-метаболических характеристик ГМТ тонкой кишки при острой высокой экспериментальной частичной непроходимости было проведено комплексное исследование ГМ интактной мышечной ткани. Анализ характера распределения ГМ по показателю их объема показал, что в контрольной группе ГМТ представлена

тремя типами ГМ: малыми, средними и большими, различающимися по их морфометрическим параметрам. Статистический анализ характера распределения ГМ кишки по объему цитоплазмы показал, что у крыс данный показатель имеет наиболее выраженный коэффициент вариации (74,07%) среди других изученных параметров. Это также подтверждается положительной величиной эксцесса (+4,26) с учетом его ошибки репрезентативности и свидетельствует о гетероморфии изучаемой популяции.

При исследовании реактивной перестройки ГМТ различных зон стенки тонкой кишки в условиях нарушения функционирования было выявлено значимое увеличение средних показателей объемов ГМ в проксимальной зоне ( $6579 \pm 382$  мкм<sup>3</sup>) и уменьшение данного показателя в зоне наложения лигатуры и дистальной зоне ( $3177 \pm 158$  мкм<sup>3</sup> и  $3177 \pm 158$  мкм<sup>3</sup> соответственно) по сравнению с таковым в контрольной группе ( $4620 \pm 231$  мкм<sup>3</sup>) ( $P < 0,05$ ). При сравнительном анализе средних показателей объемов ядер ГМ было выявлено, что в проксимальной зоне ( $316 \pm 17$  мкм<sup>3</sup>) и в зоне наложения лигатуры ( $143 \pm 6$  мкм<sup>3</sup>) этот показатель выше ( $P < 0,05$ ), чем в дистальной зоне ( $114 \pm 4$  мкм<sup>3</sup>).

Анализ содержания цитоплазматических белков в ГМ выявил значимое уменьшение этого показателя во всех зонах. Содержание белков цитоплазмы в ГМ контрольной группы составило  $0,495 \pm 0,006$  отн. ед., в проксимальной зоне —  $0,4470 \pm 0,0017$  отн. ед., в зоне наложения лигатуры —  $0,4441 \pm 0,0008$  отн. ед., в дистальной зоне —  $0,4490 \pm 0,0021$  отн. ед. Это, вероятно, соответствует различному характеру перестройки внутриклеточных метаболических процессов в разных зонах кишки в динамике развития обтурационной непроходимости. Показатель содержания ДНК в ядрах и доля гиперплоидных клеток достигали наибольшего значения в проксимальной зоне ( $P < 0,01$ ).

Изменения среднего показателя объема ГМ реактивно-измененной ГМТ отражают изменения структуры клеточной популяции. В ГМТ выявлено значимое ( $P < 0,05$ ) увеличение доли малых ГМ и уменьшение относительного содержания средних ГМ в зонах наложения лигатуры и дистальной, а в проксимальной зоне отмечается снижение доли малых, возрастание средних и появление больших ГМ (1,6%). ГМ проксимальной зоны характеризовались значимо большим объемом ядра ( $P < 0,01$ ), чем ГМ других зон.

Иммуногистохимически в интактной ГМТ кишки крысы была отмечена положительная реакция на  $\alpha$ -гладкомышечный актин, гладко-

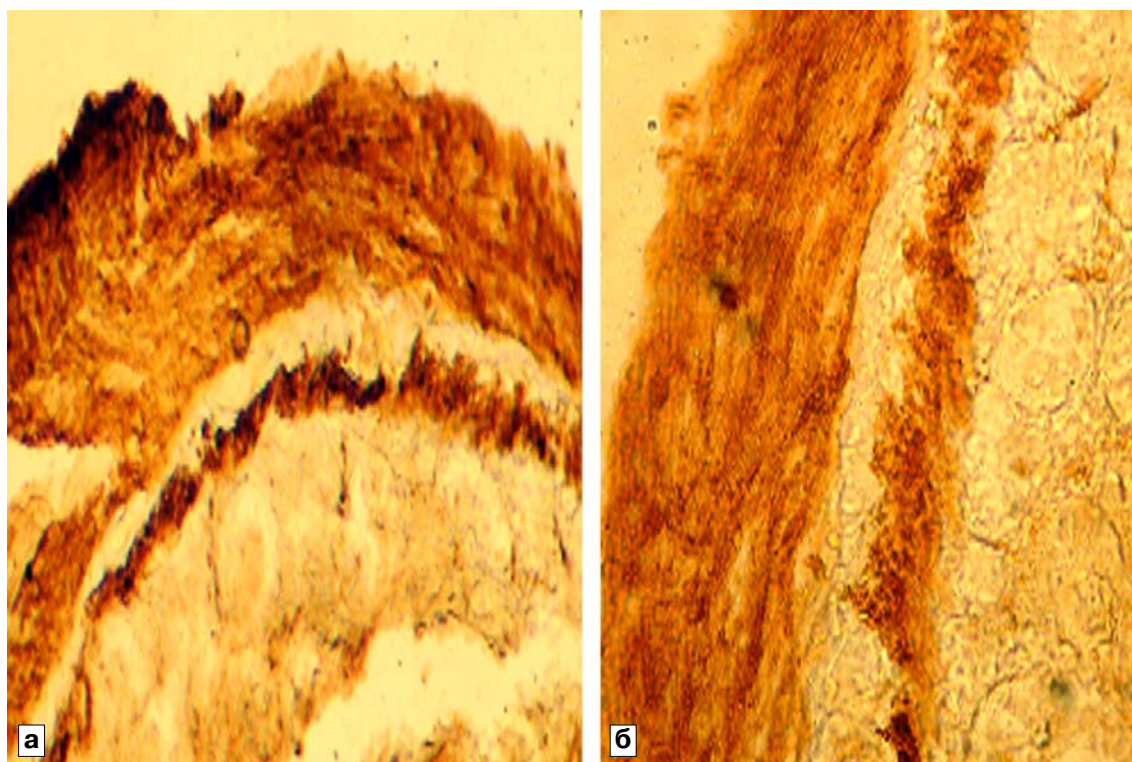


Рис. 1. Позитивная иммуногистохимическая реакция в гладкой мышечной ткани (ГМТ) тонкой кишки крысы.

а — реакция на  $\alpha$ -гладкомышечный актин в интактной ГМТ; б — реакция на  $\alpha$ -гладкомышечный актин в проксимальной по отношению к месту наложения лигатуры зоне тонкой кишки. Пероксидазо-антипероксидазный метод. а — об. 20, ок. 10; б — об. 40, ок. 10.

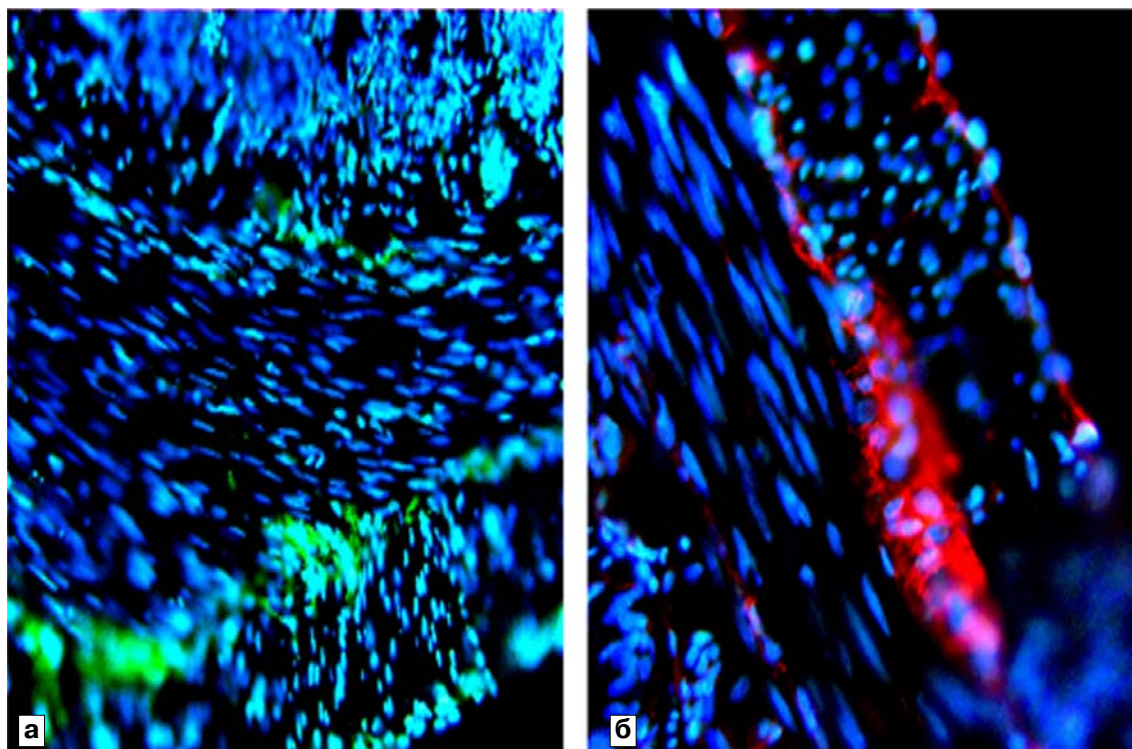


Рис. 2. Реакция на виментин в прослойке соединительной ткани интактной гладкой мышечной ткани (а) — зеленая флюоресценция и гипертрофированном отделе (б) — красная флюоресценция стенки тонкой кишки крысы.

а — об. 20, ок. 10; б — об. 40, ок. 10.

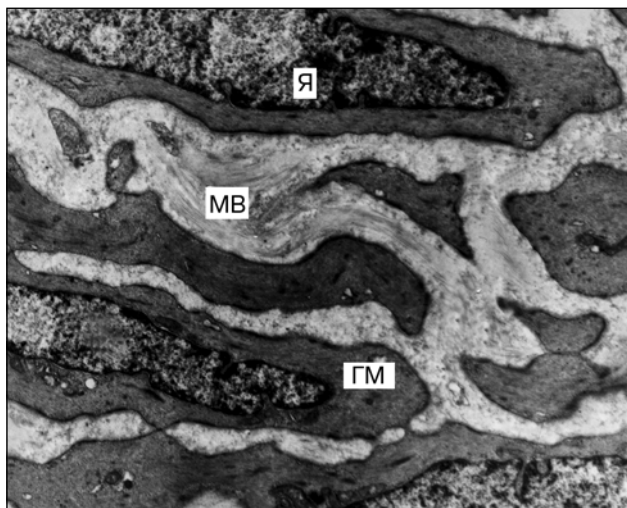


Рис. 3. Отек межклеточного вещества в гладкой мышечной ткани тонкой кишки крысы при обтурационной кишечной непроходимости.

ГМ — гладкий миоцит; МВ — межклеточное вещество; Я — ядро. Ув. 18 000.

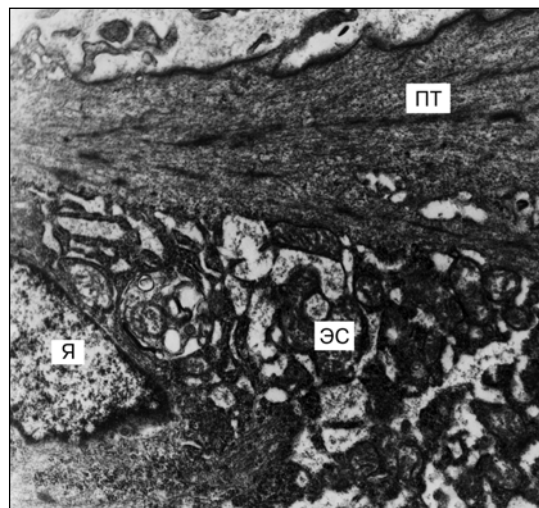


Рис. 4. Ультраструктура гладкого миоцита синтетического типа гладкой мышечной ткани тонкой кишки крысы.

Я — ядро, ЭС — расширенные цистерны эндоплазматической сети; ПТ — плотные тельца. Ув. 27 000.

мышечный миозин и десмин (рис. 1) и негативная реакция на виментин. Позитивная реакция на виментин имела место в соединительной ткани, расположенной между мышечными слоями (рис. 2). В условиях развития кишечной непроходимости данный характер реакции на указанные белки оставался без изменений.

При развитии частичной кишечной непроходимости в проксимальной зоне тонкой кишки развивается гипертрофия ее стенки. При этом выявляется отек межклеточного вещества, увеличение расстояния между ГМ (рис. 3). В составе пластов

встречаются ГМ, характеризующиеся хорошо развитыми компонентами эндоплазматической сети и комплекса Гольджи, что позволяет отнести их к миоцитам синтетического типа (рис. 4). В зоне наложения лигатуры отмечаются наиболее выраженные изменения ультраструктурной организации ГМ. В ряде клеток отмечается деструкция филаментозного материала, изменение структуры митохондрий и формирование крупных перинуклеарных вакуолей (рис. 5). В составе пластов располагаются отдельные ГМ, утратившие связи с окружающими клетками. Они характеризуются

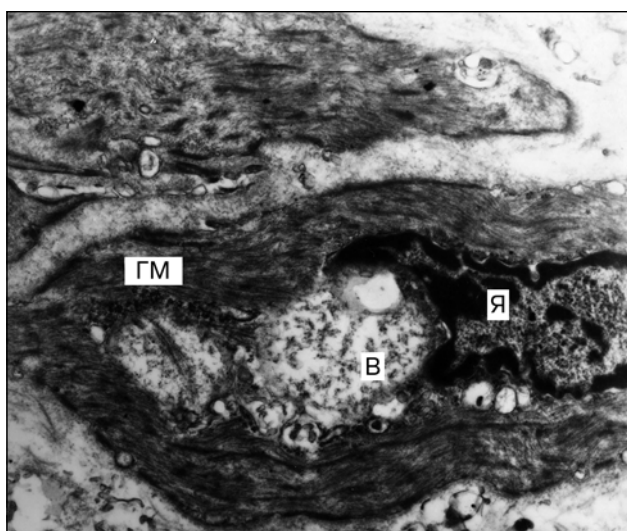


Рис. 5. Ультраструктура гладкой мышечной ткани тонкой кишки крысы в зоне наложения лигатуры.

В — крупная перинуклеарная вакуоль. Остальные обозначения те же, что на рис. 3. Ув. 18 000.

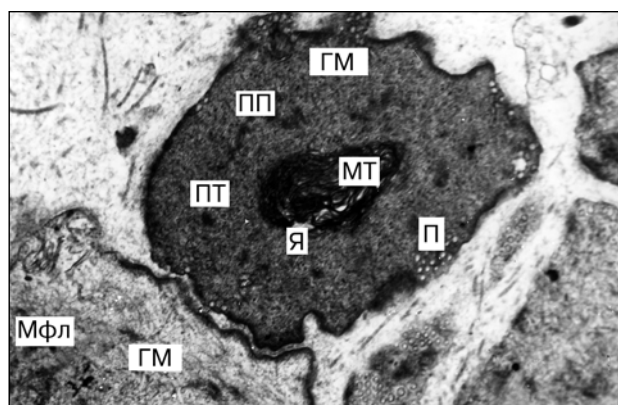


Рис. 6. Миелиноподобная структура в составе цитоплазмы гладкого миоцита из гладкой мышечной ткани тонкой кишки крысы.

П — пузырьки; ПП — прикрепительные полосы; МТ — миелиноподобное тельце; Мфл — миофиламенты. Остальные обозначения те же, что на рис. 3 и 4. Ув. 20 000.



небольшими размерами, высокой электронной плотностью цитоплазмы и наличием в ней многочисленных миелиноподобных структур и вакуолей (рис. 6). Существенных изменений в ультраструктуре нервных терминалей исследованных зон кишки нам выявить не удалось.

**Обсуждение полученных данных.** При формировании частичной кишечной обтурационной непроходимости характер структурной и функциональной трансформации ГМТ существенно различается в зонах тонкой кишки относительно места наложения лигатуры. Наиболее выражена перестройка в проксимальной зоне, где происходит растяжение и гипертрофия мышечного компонента [8, 11, 15]. Данные изменения сопровождаются увеличением представительства средних и больших ГМ в популяции и нарастанием синтеза ДНК. Эти результаты соответствуют данным литературы [2, 3, 5, 14] о повышении белкового синтеза и синтеза ДНК в ГМТ при увеличении функциональной нагрузки. В дистальной зоне, где имеет место снижение функциональной активности [9, 10, 12], отмечаются уменьшение средних показателей объема ГМ и их ядер, снижение синтеза ДНК и экспрессии цитоплазматических белков. Тем не менее, нам не удалось выявить изменения характера экспрессии маркерных и фенотипических белков ГМТ в исследуемых зонах тонкой кишки в изученный период развития обтурационной непроходимости.

Результаты настоящего исследования подтвердили данные литературы о том, что при обтурационной непроходимости изменения ГМТ в стенке проксимальной зоны кишки сопровождаются гипертрофией мышечной оболочки [8, 9]. В структуре популяции ГМ появляются большие клетки. В свете имеющихся данных их появление в гипертрофированном отделе тонкой кишки свидетельствует о том, что в основе изменений ГМТ, наряду с гиперплазией, лежат гипертрофические процессы. В зоне наложения лигатуры происходят деструкция клеточных элементов, отек межклеточного вещества, нарушение кровоснабжения, иннервации и трофики [12, 15], при этом в дистальной зоне (каудальнее лигатуры) развивается гиподисфункция кишки [9, 12].

Полученные данные позволяют констатировать, что реактивная трансформация ГМТ разных зон тонкой кишки при экспериментальной непроходимости имеет дифференцированный характер, что, вероятно, обусловлено неодинаковым уровнем функциональных и деструктивных нагрузок, развившихся при формировании обтурационной непроходимости в условиях эксперимента [12, 15,

17]. Эти процессы в ГМ разных зон тонкой кишки можно рассматривать как проявление тканевой реакции, направленной на компенсацию нарушений функции тонкой кишки, а перестройку структуры популяции ГМ — как тканевый механизм, обеспечивающий адаптацию к изменяющимся функциональным нагрузкам.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Брумберг В.А. и Певзнер Л.З. Использование амидочерного в цитофотометрическом исследовании клеточных протеинов. Цитология, 1972, т. 14, № 5, с. 674–676.
2. Гладкий А.П. и Баженов Д.В. Реактивность гладкой мышечной ткани толстой кишки в условиях экспериментальной непроходимости. Арх. анат., 1976, т. 71, вып. 7, с. 47–51.
3. Зашихин А.Л. и Агафонов Ю.В. Структура популяции гладких миоцитов (аспекты внутриорганной организации гладкой мышечной ткани). Морфология, 1997, т. 112, вып. 4, с. 61–67.
4. Зашихин А.Л., Агафонов Ю.В. и Лисишников Л.В. Патент РФ на изобретение № 2104524 от 23.05.1994 г. «Способ получения препаратов изолированных клеток».
5. Кауфман О.Я. Гладкая мышечная ткань. В кн.: Структурные основы адаптации и компенсации нарушений функций. М., Медицина, 1987, с. 131–153.
6. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., Изд-во иностр. лит-ры, 1962.
7. Хесин Я.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. М., Медицина, 1967.
8. Bertoni S., Gabella G., Ballabeni V. et al. Plasticity of rat small intestine after removal of a chronic mechanical obstruction. Neurogastroenterol. Motil., 2006, v. 18, p. 862–872.
9. Cogliandro R.F., De Giorgio R., Barbara G. et al. Chronic intestinal pseudo-obstruction. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 2007, v. 21, № 4, p. 657–669.
10. Dite P., Lata J. and Novotny I. Intestinal obstruction and perforation- the role of the gastroenterologist. Dig. Dis., 2003, v. 21, № 1, p. 63–67.
11. Gabella G. Development of visceral smooth muscle. Results Probl. Cell Differ., 2002, v. 38, p. 1–37.
12. Guarino M.P., Carotti S., Cogliandro R. et al. Impaired contractility of colonic muscle cells in a patient with chronic intestinal pseudo-obstruction. Dig. Liver Dis., 2007, v. 10, p. 225–229.
13. Huizinga J.D. Neural injury, repair and adaptation in the GI tract. IV Pathophysiology of GI motility related to interstitial cells of Cajal. Am. J. Physiol., 1998, v. 275 (3 Pt 1), p. 381–396.
14. Paulin D. and Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. Exp. Cell Res., 2004, v. 301, p. 1–7.
15. Stanghellini V., Cogliandro R.F., de Giorgio R. et al. Chronic intestinal pseudo-obstruction: manifestations, natural history and management. Neurogastroenterol. Motil., 2007, v. 19, № 6, p. 440–452.
16. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 1963, v. 17, p. 208–212.
17. Won K.-J., Suzuki T., Hori M. et al. Motility disorder in experimentally obstructed intestine: relationship between muscularis

inflammation and disruption of the ICC network. *Neurogastroenterol. Motil.*, 2006, v. 18, p. 53–61.

Поступила в редакцию 19.10.09  
Получена после доработки 18.02.10

## REACTIVE CHANGES OF SMOOTH MUSCLE TISSUE OF RAT SMALL INTESTINE DURING EXPERIMENTAL INTESTINAL OBSTRUCTION

A.L. Zashikhin, J. Sehlin and A.O. Barmina

Using light, electron microscopy and immunohistochemical methods, the reactive transformation of smooth muscle tissue (SMT) was studied in the intestinal wall during the development of acute partial high intestinal obstruction. The material of small intestine was taken from 10 male rats in both the zone of ligation application, and proximal and distal zones, 3 cm distant from the

ligation zone. The results of the study demonstrate that in partial intestinal obstruction, the nature of structural and functional SMT transformation was variable depending upon differences in functional and destructive loads. During these changes, the remodeling of smooth myocyte population was shown to be one of the mechanisms of SMT adaptation to the changing conditions of functioning. Immunohistochemical analysis found no changes in the pattern of expression of marker and phenotypic proteins in the intestinal zones studied during the dynamics of an experiment.

**Key words:** *smooth muscle tissue, smooth muscle cells, reactivity, immunohistochemistry, electron microscopy.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Northern State Medical University, Arkhangelsk; Department of Integrative Medical Biology, Umea University, Sweden

© Коллектив авторов, 2010  
УДК 616.37-006.2-039-018:599.323.4

С.В.Дорошкевич<sup>1</sup>, П.Г.Пивченко<sup>2</sup> и Е.Ю.Дорошкевич<sup>1</sup>

## АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПСЕВДОКИСТЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

<sup>1</sup> Кафедра анатомии человека с курсом оперативной хирургии и топографической анатомии (зав. — доц. В.Н. Жданович) Гомельского государственного медицинского университета; <sup>2</sup> кафедра нормальной анатомии (зав. — проф. П.Г. Пивченко) Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск

Цель исследования — изучить клеточные популяции нейтрофильных гранулоцитов, макрофагов, фибробластов и лимфоцитов в соединительной ткани стенки псевдокисты поджелудочной железы (ПЖ) с использованием количественных методов. Для моделирования псевдокисты использовали локальное холодное воздействие на ПЖ белой крысы с помощью криохирургического комплекса КСН 3А/В. Выявлены общее снижение содержания клеток в стенке псевдокисты и смена доминирующих популяций на протяжении исследования. На 14–21-е сутки эксперимента преобладают нейтрофильные гранулоциты, к 30-м суткам доминирующими оказываются макрофаги, которые на 45-е сутки замещаются фибробластами. Наблюдается прогрессивное увеличение количества лимфоцитов в течение эксперимента.

**Ключевые слова:** *клеточные популяции, псевдокиста, поджелудочная железа.*

Интерес к проблеме псевдокист поджелудочной железы (ПЖ) обусловлен значительным увеличением числа больных с этой патологией, что связано с ростом заболеваемости острым деструктивным панкреатитом [7, 13], при котором, по данным компьютерной томографии и ультразвукового исследования, псевдокисты ПЖ выявляются в 50% случаев [11].

Псевдокисты ПЖ характеризуются склонностью к различного рода осложнениям, частота которых может составлять 20–50%, при этом смертность достигает 40–60% [1]. Однако имеются наблюдения возможности в 15–30% случаев

спонтанного регресса псевдокист, возникших на фоне острого панкреатита, без проведения при этом активных консервативных мероприятий [4]. В литературе в основном освещены клинические аспекты, а данные морфологических исследований ограничиваются указанием на наличие в стенке псевдокисты признаков неспецифического воспаления [2, 10, 14, 15].

Цель настоящего исследования — изучение отдельных клеточных популяций в соединительной ткани стенки псевдокисты ПЖ с использованием количественных методов.