

**В.М.Шкуропат**<sup>1</sup>  
**І.В.Твердохліб**<sup>2</sup>  
**М.Ф.Дрюк**<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Дніпропетровська міська багатопрофільна клінічна лікарня №4

<sup>2</sup> Дніпропетровська державна медична академія

<sup>3</sup> Інститут хірургії та трансплантології ім. А.О.Шалімова АМН України

**Ключові слова:** ішемія нижньої кінцівки, ревааскуляризація, післяопераційний період, імуногістохімія, VEGF, CD34, електронна мікроскопія.

*Надійшла: 28.06.2009*

*Прийнята: 07.08.2009*

УДК 616.36-089.87

## **ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗУЛЬТАТІВ ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З ХРОНІЧНОЮ ІШЕМІЄЮ НИЖНЬОЇ КІНЦІВКИ ІІІ СТУПЕНЯ**

**Резюме.** Метою дослідження був імуногістохімічний і електронномікроскопічний аналіз стану переднього великогомілкового м'язу хворих з хронічною ішемією нижньої кінцівки ІІІ ступеня після проведення прямої, непрямой і композитної ревааскуляризації в найближчому і віддаленому післяопераційному періодах. Хворі були розділені на три групи: 1) 37 хворих, яким була виконана стегново-гомількова реконструкція; 2) 57 хворих, яким була виконана непрямая ревааскуляризація з аутотрансплантацією аспірата кісткового мозку; 3) 50 хворих, яким була здійснена композитна ревааскуляризація дистальних відділів кінцівки. Спостереження здійснювали в ранньому післяопераційному періоді і в терміні до двох років. Проводили імуногістохімічне дослідження експресії маркерів VEGF і CD34 і ультраструктурний аналіз біоптатів переднього великогомілкового м'язу на межі між верхньою і середньою третинами м'язу. Дослідження показали, що проведення прямої ревааскуляризації обумовлює суттєву нормалізацію імуногістохімічних характеристик тканини переднього великогомілкового м'язу за експресією факторів VEGF і CD34, а також ультраструктури м'язових волокон у хворих всіх досліджених вікових груп протягом 6 місяців після оперативного втручання, проте не забезпечує стабілізації позитивних змін у віддаленому післяопераційному періоді. Непряма ревааскуляризація істотно не змінює структурно-функціонального стану компонентів переднього великогомілкового м'язу у найближчому післяопераційному періоді, проте обумовлює нормалізацію та стабілізацію імуногістохімічних та ультраструктурних показників ішемізованої м'язової тканини за рахунок ініціації неоваскулогенезу у хворих віком до 75 років. Композитна ревааскуляризація дозволяє отримати нормалізуючий ефект в найближчому післяопераційному періоді та забезпечити його стабілізацію стосовно вивчених імуногістохімічних і ультраструктурних критеріїв у віддаленому післяопераційному періоді.

**Морфологія.** – 2009. – Т. ІІІ, № 3. – С. 142-153.

© В.М.Шкуропат, І.В.Твердохліб, М.Ф.Дрюк, 2009

**Shkuropat V.M., Tverdokhlebl I.V., Drjuk M.F. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of results of surgical treatment of patients with III degree chronic ischemia of lower limb.**

**Summary.** The purpose of research was the immunohistochemical and ultrastructural analysis of anterior tibial muscle in patients with III degree chronic ischemia of lower limb after direct, indirect and composite revascularization in near-term and long-term postoperative periods. Patients have been divided into three groups: 1) 37 patients after femoral-tibial reconstruction; 2) 57 patients after indirect revascularization with autotransplantation of bone marrow; 3) 50 patients after composite revascularization of distal part of lower limb. The observation was carried out in the near-term postoperative period and in 2 years. Immunohistochemical investigation of markers VEGF and CD34 expression and ultrastructural study of tissue samplings of anterior tibial muscle taken between superior and middle one thirds was carried out. It have been determined that direct revascularization causes the significant improvement in immunohistochemical characteristics of anterior tibial muscle on VEGF and CD34 expression both in ultrastructure of muscle fibers in all age groups during 6 months after operation, however does not provide the stabilization of positive changes in long-term postoperative period. Indirect revascularization does not change significantly structurally-functional condition of components of muscle in near-term postoperative period, however causes the stable normalization of parameters of tissue components due to initiation of neovasculogenesis at patients till 75 years. Composite revascularization allows to receive near-term normalizing effect concerning the studied immunohistochemical and ultrastructural criteria and to provide its stabilization in the long-term postoperative period.

**Key words:** ischemia of the lower limb, revascularization, postoperative period, immunohistochemistry, VEGF, CD34, electron microscopy.

ішемічних ушкоджень нижніх кінцівок зайняла важливе місце в експериментальних і клінічних розробках (Takeshita S. et al., 1996). Зокрема, при використанні клітин кісткового мозку в лікуванні ішемії біль у спокої у хворих зменшується на 80%, а після трансплантації клітин кісткового мозку ангіографічно відзначали розвиток колатерального кровообігу в 27 кінцівках з 45 (Matsubara H. et al., 2003). Перше клінічне застосування факторів росту для стимуляції ангіогенезу було проведене у хворих з критичною ішемією нижніх кінцівок більше 10 років тому (Baumgartner I. et al., 1998). Отримані позитивні результати стали новим напрямком в лікуванні критичної ішемії кінцівок (Rivard A. et al., 1998).

Фактор росту судинного ендотелію (VEGF) відомий як білок, що індукується гіпоксією та виявляє властивості мітогена ендотеліоцитів, а також сприяє їх виживаності (Ferrara N., 1999). VEGF стимулює мікрогемодинаміку, викликає швидке збільшення та міграцію ендотеліальних клітин (Dvorak H.F. et al., 1995; Gerber H.P. et al., 1998). Показано, що стимуляція експресії VEGF можлива в умовах гіпоглікемії, запалення, клітинної дегенерації, тканинної регенерації через підсилення транскрипції та за рахунок стабілізації мРНК фактора VEGF (Shih S.C. et al., 1999). В експериментальних умовах були зроблені спроби використовувати навіть екзогенний VEGF для корекції різних мікросудинних ушкоджень у міокарді, а також у нижніх кінцівках (Baumgartner I. et al., 1998; Rosengart T.K. et al., 1999; Rissanen T.T. et al., 2001). Важлива властивість VEGF – це позитивний хемотаксичний ефект на міграцію попередників ендотеліоцитів і макрофагів, які також додатково індуюють ріст мікросудин (Argas M. et al., 1998; Kalka C. et al., 2000).

Показано, що фактор VEGF відіграє суттєву роль у процесах регенерації скелетних м'язових волокон після ішемічних ушкоджень, в той час як його експресія в інтактній м'язовій тканині залишається незначною (Jennische E. et al., 1993). Зокрема, VEGF і рецептори до нього локалізовані не лише на клітинній мембрані м'язових волокон, але й в саркоплазмі та ядерних оболонках виснажених ішемічною дегенерацією скелетних м'язів (Shen B.Q. et al., 1998; Li W., Keller G., 2000). До того ж, інтерналізація VEGF призводить не лише до фенотипових змін ендотеліоцитів (Li W., Keller G., 2000; Arbiser J.L. et al., 2000): поряд зі стимуляцією ангіогенеза в аутокринному варіанті цей фактор індукує міогенне диференціювання, а також попереджає розвиток апоптотичних реакцій у процесах ішемічної загибелі м'язових компонентів (Gerber H.P. et al., 1998; Jiang B.H. et al., 1999; 2000). Отже, регенераторна конверсія міобластів у міоцити скелетного м'яза, що відбувається завдяки аутокринній дії VEGF, поєднується з його антиапоптотичним впливом і, можливо, сприяє підвищенню витри-

валості скелетної м'язової тканини відносно ішемії.

На думку Rissanen ТТ (14), окрім здатності стимулювати ангіогенез, VEGF може обумовлювати багато інших ефектів, які сприяють відновленню ушкоджених ішемією тканин.

Слід зауважити, що на фоні гострої ішемії м'язові волокна активно, дифузно і рівномірно експресують VEGF, але за умов хронічної ішемії нижніх кінцівок синтез фактора VEGF має обмежений характер внаслідок певних молекулярно-біологічних і метаболічних механізмів; до того ж, такий синтез відбувається лише в ушкоджених м'язових волокнах або у тих, що регенерують (Tuomas T. et al., 2002).

Тому на особливу увагу заслуговує аналіз можливості стимулювати синтез VEGF м'язовою тканиною в умовах ішемічного ушкодження для спрямованої дії у декількох напрямках: 1) пряма індукція ангіогенеза; 2) підвищення виживаності м'язових волокон; 3) опосередкована стимуляція м'язово-типового диференціювання; 4) протидія апоптотичним механізмам.

**Мета дослідження:** імуногістохімічний і електронномікроскопічний аналіз стану переднього великогомілкового м'язу хворих з хронічною ішемією нижньої кінцівки III ступеня після проведення прямої, непрямой і композитної реваскуляризації в найближчому і віддаленому післяопераційному періодах.

#### **Матеріали та методи**

Всього досліджено біопсійний матеріал від 144 пацієнтів з ішемією кінцівки III ступеня внаслідок оклюзійно-стенотичного ураження артерій стегново-підколінно-гомількового сегменту віком від 25 до 84 років.

Хворі були розділені на три групи. До першої групи увійшло 37 хворих, яким була виконана стегново-гомількова реконструкція, де передня великогомілкова артерія була облітерована і не відновлювалася. До другої групи увійшло 57 хворих, яким реконструктивна операція на артеріях стегново-підколінно-гомількового сегменту не виконувалася. Всім хворим цієї групи була виконана непряма реваскуляризація з ауотрансплантацією аспірата кісткового мозку для стимуляції васкулогенезу в передню групу м'язів. З метою поліпшення кровопостачання виконували ауотрансплантацію аспірата кісткового мозку, взятого з крила клубової кістки. До третьої групи увійшло 50 хворих з ураженням стегново-підколінно-гомількового сегменту при оклюзії передньої великогомілкової артерії, яким була здійснена композитна реваскуляризація дистальних відділів кінцівки: реконструктивна операція на артеріях гомілки і непряма реваскуляризація з ауотрансплантацією аспірата кісткового мозку. Реконструктивні операції і міелотрансплантацію виконували одночасно. При виконанні реконструктивних операцій ми прагнули включити в

кровотік якомога більше магістральних артерій гомілки. Тому ми виконували стегново-підколінно-гомілкове шунтування з одномоментною пластикою гирла гомілкових артерій за оригінальною методикою.

Як контроль використовували матеріал біопсії м'язової тканини, отриманий при оперативних втручаннях з приводу травм нижньої кінцівки від 8 пацієнтів відповідних вікових груп без судинної патології.

Для морфологічного аналізу використовували внутрішні (глибокі) і поверхневі (субфасціальні) ділянки переднього великогомілкового м'яза на межі між верхньою і середньою третинами м'яза. Дані гістологічного дослідження викладені нами у попередній публікації (Шкуропат В.М. та співавт., 2008). У кожній з клінічних підгруп проводили по 3 паралельних імуногістохімічних і ультраструктурних дослідження.

Для постановки імуногістохімічних реакцій використовували парафінові блоки біопсійного матеріалу. Як первинні моноклональні антитіла використовували такі до фактора росту судинного ендотелію VEGF (LabVision) і до цитоспецифічного маркера ендотелію CD-34 (DAKO, Данія), який накопичується в цитоплазмі ендотеліальних клітин (Garlanda С. та ін., 1997). Проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25<sup>0</sup> С на протязі 30 хвилин. Оцінка експресії кожного маркера проводилась індивідуально. Ідентифікацію реакції здійснювали за допомогою системи візуалізації EnVision (DakoCytomation) за допомогою хромогену DAB та додаткового забарвлення гематоксиліном Майєра для відтворення структурної організації тканини.

Ультраструктурне дослідження біоптатів проводили після фіксації зразків у 2,5%-ному розчині глутарового альдегіду. Виготовлення ультратонких зрізів проводили на ультрамікроскопі УМТП-6М з блоків, залитих в епон-аралдіт. Дослідження проводили на електронному мікроскопі ЕМВ-100Б при напрузі 75 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 25000. У цілому, електронно-мікроскопічне дослідження проводили за схемою, запропонованою В.Я.Карупу (1984). Кількісну оцінку ультраструктурних змін, включаючи визначення щільності упакування міофібрил і мітохондрій в саркоплазмі м'язових волокон, проводили на електроннограмах методом крапкового рахунку за формулою (Автанділов Г.Г., 1990):

$$V_v = \frac{P_i}{P_t},$$

де  $V_v$  – щільність упакування структури;

$P_i$  - кількість точок тест-системи, які доводяться на структуру;

$P_t$  - загальна кількість точок тест-системи.

Морфометричні дані піддавали статистичній обробці. Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили з урахуванням критерію  $t$  Стьюдента (Лакин Г.Ф., 1990).

### Результати та їх обговорення

Імуногістохімічне дослідження інтраопераційних біоптатів переднього великогомілкового м'яза у хворих з хронічною ішемією нижньої кінцівки усіх досліджуваних вікових груп виявило нерівномірний характер експресії VEGF у м'язовій тканині. Зокрема, даний білок мав дифузну цитоплазматичну локалізацію і помірно накопичувався лише у тих м'язових волокнах, що розташовувались поблизу ділянок з найбільшим дистрофічно-некротичним ушкодженням. Такі стоншені VEGF-позитивні волокна мали численні ознаки дегенерації різного ступеня. Також джерелом експресії VEGF слугували макрофаги навколо мікросудин зі збереженим або розширеним просвітом. Ті м'язові волокна, що були ушкоджені меншою мірою і зберігали загальні тинкторіальні властивості, майже не експресували даний маркер. Дистрофічні волокна з помірним накопиченням VEGF розташовувались невеликими групами поблизу зон значного інтерстиційного набряку або поодинокі між VEGF-негативними м'язовими волокнами.

В інтактній м'язовій тканині (у групі контрольних спостережень) нам не вдалося візуалізувати експресію VEGF. Виняток склали лише ті тканинні зразки, що були отримані від осіб контрольної групи віком більше 75 років: у цих зразках відзначалася слабка дифузна цитоплазматична експресія VEGF. Враховуючи, що одним з найбільш активних індукторів синтезу VEGF є гіпоксія, можна припустити, що пов'язані з віком обмеження тканинної мікроциркуляції нижніх кінцівок можуть обумовити певну ініціацію експресії даного білкового фактора на фоновому рівні навіть у осіб без клінічних проявів хронічної ішемії.

Реакція з ендотеліальним маркером CD34 виявила, що більшість гемокапілярів була виключеною з регіонального кровообігу. Артеріоли і венули характеризувалися патологічною дилатацією. Важливо відзначити, що у тканинних ділянках з активним розвитком дистрофічних процесів щільність CD34-позитивного матеріалу суттєво перевищувала таку в ділянках зі збереженою тканинною структурою. Така підвищена щільність мікросудин поблизу дистрофічно-некротичних осередків у більшості спостережень була асоційована зі значною лейкоцитарною інфільтрацією, а також наявністю поодиноких ліпоцитів і макрофагів.

Незалежно від віку пацієнтів експресія маркера CD34 у контрольних зразках м'язової тканини не відрізнялася від такої в основних групах дослідження за своєю інтенсивністю, проте роз-

поділення CD34-позитивного матеріалу в інтактному м'язі було рівномірним в усіх досліджуваних тканинних ділянках, а характер конфігурації мікросудин і загальна ангіоархітектоніка свідчили про стабільний і характерний для норми стан всіх ланок мікроциркуляторного русла.

При ультраструктурному дослідженні інтраопераційних біоптатів переднього великогомілкового м'яза спостерігалися суттєві і широкі за спектром патологічні прояви у саркоплазмі м'язових волокон. Зокрема, в результаті розвитку хронічної ішемії значно зменшувалася частка міофібрилярного апарату, що було пов'язано із набряком і вакуолізацією цитоплазми, а також з деструкцією самих міофібрил. Значно порушувалася структура Т-трубочок, змінювалась архітектура триад, ушкоджувались або зникали характерні утворення клітинної поверхні й субсарколемальні ультраструктури. Внаслідок тривалої ішемії у найбільшому ступені ушкоджувався мітохондріальний апарат: органели набували кулястої форми, електронна щільність матрикса різко зменшувалась, кристи у більшості органел

були відсутні або фрагментувалися. У складі найбільш ушкоджених волокон поряд з явищами кристалізу саркомеру спостерігалася фрагментація зовнішньої мітохондріальної мембрани.

Проведення кількісного ультраструктурного дослідження показало, що внаслідок деструкції міофібрилярного апарату та значного внутрішньоклітинного набряку щільність упаковки функціонуючих міофібрил в саркоплазмі більш ніж вдвічі поступалася показникам контрольної групи у всіх досліджуваних вікових групах хворих (рис. 1). Динаміка такого ж напрямку була характерною для параметра щільності упаковки мітохондрій (рис. 2). Навпроти, показник коефіцієнту сферичності мітохондрій різко зростав, відображаючи зміни форми більшості органел до майже ідеально кулястої, що є вкрай не характерним для мітохондрій скелетної м'язової тканини (рис. 3). Ці дані підтвердили і кількісно оцінили критичний характер виснаженості і функціональної неповноцінності мітохондріального апарату в умовах хронічного ішемічного ушкодження м'язових волокон.

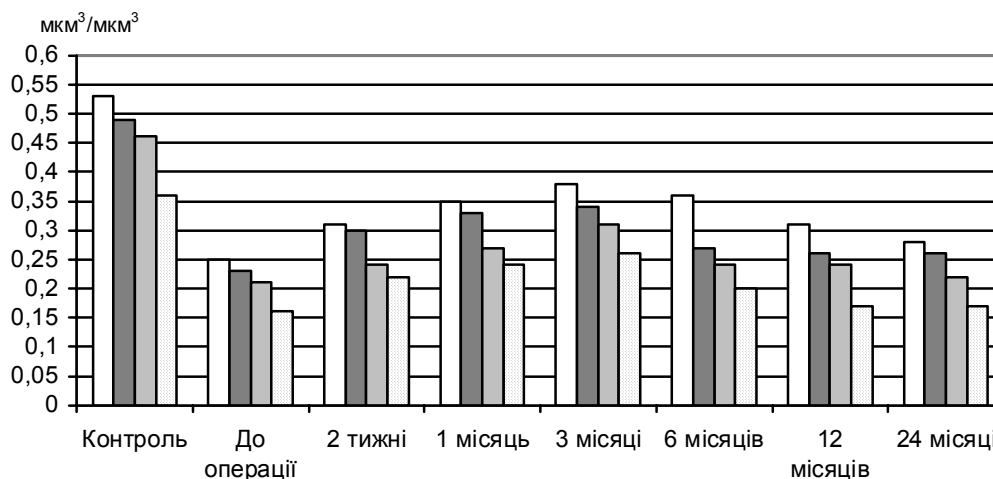


Рис. 1. Динаміка щільності упаковки міофібрил у саркоплазмі переднього великогомілкового м'яза (MKM<sup>3</sup>/MKM<sup>3</sup>) після проведення прямої ревазуляризації.

Імуногістохімічне дослідження біоптатів після проведення прямої ревазуляризації протягом першого місяця післяопераційного періоду виявило суттєве зниження експресії VEGF у цитоплазмі волокон переднього великогомілкового м'яза хворих всіх досліджуваних вікових груп, що поєднувалося з активною експресією ендотеліального фактора CD34 у численних гемокapілярах, більшість яких ставала функціонально активною. При цьому загальна щільність мікросудин суттєво не змінювалась у порівнянні з передопераційним станом, але зберігалася помірна кількість VEGF-позитивних макрофагів у перивазальному просторі.

Через 3 місяці після оперативного втручання

кількість таких макрофагів значно зменшувалась, натомість з'являлися поодинокі м'язові волокна з активною цитоплазматичною експресією маркера VEGF. Ці волокна зазвичай були меншими за діаметром у порівнянні з іншими, містили центрально розташовані ядра і супроводжувалися маркер-позитивними міосателітоцитами. Лише у хворих віком понад 75 років такі волокна не виявлялися.

Через 6 місяців після операції у тканині м'яза спостерігалися невеликі групи тонких волокон, які активно накопичували мітку до VEGF, проте не мали центрально розташованих ядер, не супроводжувалися активними сателітними клітинами, не виявляли поперечної посмугованості

та містили ознаки дистрофії, хоча щільність CD34-позитивних елементів у прилеглих ділян-

ках залишалася високою, як і на попередніх етапах дослідження.

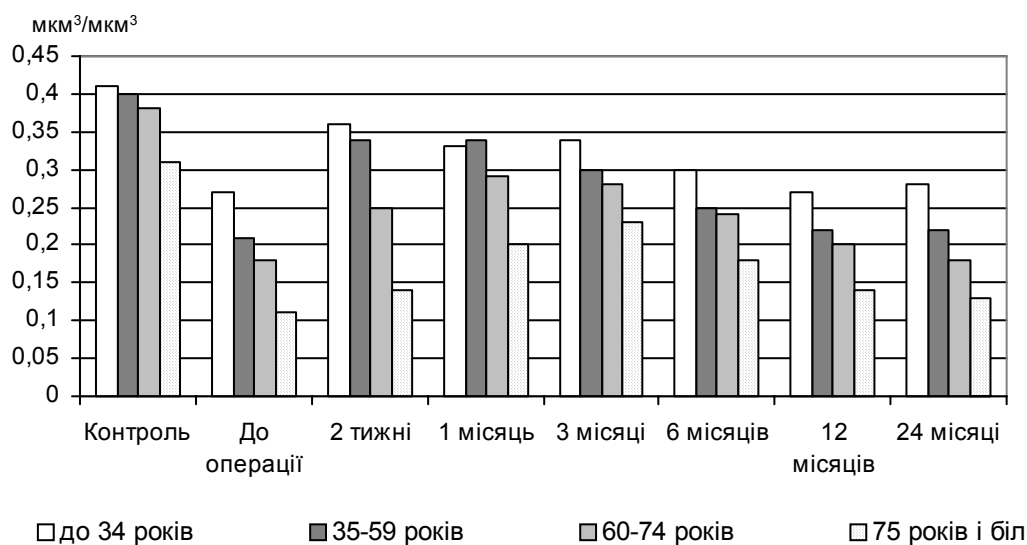


Рис. 2. Динаміка змін щільності укладання мітохондрій у саркоплазмі волокон переднього великогомілкового м'язу ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) після проведення прямої ревазуляризації.

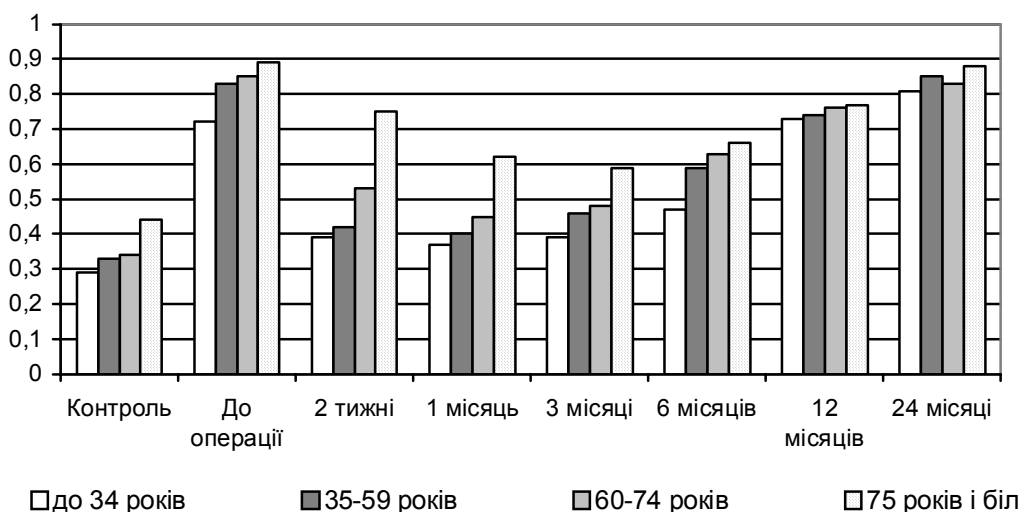


Рис. 3. Динаміка змін коефіцієнта сферичності мітохондрій у саркоплазмі волокон переднього великогомілкового м'язу після проведення прямої ревазуляризації.

У віддаленому післяопераційному періоді кількість означених дистрофічних волокон з виразною експресією VEGF закономірно зростала; крім того, часто поряд з групами цих волокон спостерігалися некротичні зони й осередки інтерстиційного набряку. Щільність експресії ендотеліального маркера CD34 лише незначно знижувалась у порівнянні з попередніми етапами спостереження, але переважна більшість мікросудин мала численні патологічні зміни на фоні лейкоцитарної і моноцитарної інфільтрації. Загалом, імуногістохімічна картина м'язової тканини по маркерах VEGF і SD34 через 2 роки після

операції наближалася до такої, що виявлялася до проведення прямої ревазуляризації у всіх досліджуваних вікових групах.

При ультраструктурному дослідженні біоптатів м'язу протягом перших трьох місяців після проведення прямої васкуляризації у саркоплазмі м'язових волокон спостерігався незначний набряк та поодинокі вакуолі. Загальна структура Т-трубочок і триад у більшості випадків відповідала нормальному плану будови. На противагу передопераційному стану, ознаки деструкції міофібрил не виявлялися, проте у всіх вікових групах вони значно поступалися за щільністю відповідним

контрольним характеристикам. Мітохондріальний апарат був представлений дуже поліморфними органелами. Частина мітохондрій залишалася кулястої форми, зі зменшеною електронною щільністю матрикса і невеликим вмістом крист. Звичайно такі органели розташовувались під сарколемою або поблизу ядра. Інші органели набували витягнутої форми, значно збільшувались та мали ознаки високої функціональної активності (розвинені кристи, електронно-щільний матрикс). Характерна локалізація таких мітохондрій – між міофібрилами. Проявів кристалізації або фрагментації зовнішньої мітохондріальної мембрани у цей період не спостерігалось. Через 6 і 12 місяців після операції відзначалося набрякання і вакуолізація цитоплазми. У саркоплазмі спостерігалася велика кількість мілких фрагментів міофібрил і хаотично розташовані міофіламенти, порушувалася структура Т-трубочок і елементів ендоплазматичного ретикулума. Більшість мітохондрій втрачали електронну щільність матрикса і кристи. Міжміофібрилярні мітохондрії зменшувалися за розмірами та наближались до кулястої форми. Зовнішня мембрана цих мітохондрій у ряді випадків була ушкодженою. Дослідження, проведене через 2 роки після оперативного втручання, вказало на зростання ступеня патологічних змін на ультраструктурному рівні.

За даними кількісного ультраструктурного дослідження, щільність упакування міофібрил в саркоплазмі протягом перших трьох місяців після операційного періоду поступово зростала, але після цього знов починала знижуватись внаслідок деструкції міофібрил та зростання внутрішньоклітинного набряку у хворих всіх вікових груп (рис. 1). Щільність упакування мітохондрій зростала у пацієнтів віком до 60 років дуже активно; у хворих похилого та старечого віку зростання було повільнішим (рис. 2). Проте у всіх пацієнтів після 3-го місяця післяопераційного періоду відбувалося закономірне зниження значень параметра. Динаміка змін показника коефіцієнту сферичності мітохондрій м'язових волокон після проведення прямої ревазуляризації показана на відповідній діаграмі (рис. 3).

Протягом найближчого післяопераційного періоду після проведення непрямой ревазуляризації (аутопересадка кісткового мозку) імуногістохімічне дослідження тканинних біоптатів не виявило будь-яких помітних змін експресії фактора VEGF у цитоплазмі м'язових волокон та фактора CD34 на поверхні ендотеліоцитів мікросудин у порівнянні з передопераційним станом.

Через 3 місяці після непрямой ревазуляризації поряд з групами дистрофічно змінених VEGF-позитивних м'язових компонентів відзначалася поява численних невеликих за діаметром поодинокі розташованих м'язових волокон з

помірною цитоплазматичною експресією маркера VEGF. Такі волокна містили центрально розташовані ядра і супроводжувалися маркер-позитивними міосателітоцитами. Часто поряд з ними візуалізувалися VEGF-позитивні макрофаги навколо гемокапілярів. Необхідно зауважити, що у хворих віком більше 75 років волокна у стані регенерації не виявлялися. У даний термін спостереження експресія CD34 не відрізнялася за інтенсивністю та локалізацією від попередніх етапів, проте значна частка гемокапілярів мала формені елементи у своєму просвіті.

Через 6 місяців після операції у тканині переднього великогомілкового м'яза ми спостерігали лише невелику кількість згрупованих дегенеративних VEGF-позитивних волокон. Навпроти, тканина м'яза була насиченою мілкими волокнами із значним накопиченням фактора VEGF у цитоплазмі, які знаходилися на різних стадіях регенерації. Якщо у цей термін дослідження переважали активовані сателітні міоцити, а більш зрілі диференційовані волокна складали лише незначну частку, то через 1 рік у пацієнтів всіх вікових груп, за виключенням старшої, візуалізувалися зрілі VEGF-позитивні волокна. Важливо відзначити, що щільність CD34-позитивних елементів також помітно зростала, що свідчило про активацію процесів неоваскулогенезу за рахунок збільшення новоутворених примітивних гемокапілярів.

Через 2 роки після аутопересадки кісткового мозку цитоплазматична експресія VEGF була на низькому рівні у більшості м'язових волокон. Незначна кількість волокон з ознаками дистрофії накопичувала VEGF у помірному ступені. Такі осередки підвищеної експресії фактора спостерігалися поблизу некротичних ділянок й зон значного інтерстиційного набряку. Щільність експресії ендотеліального маркера CD34 залишилася на рівні попереднього етапу. Патологічні зміни і ознаки лейкоцитарної інфільтрації виявлялися лише у тих мікросудинах, які були розташовані у зонах інтерстиційного набряку. Імуногістохімічна характеристика м'язової тканини по маркерах VEGF і SD34 через 2 роки після непрямой ревазуляризації свідчила про суттєве підвищення щільності функціонуючих гемокапілярів за рахунок неоваскулогенезу у більшості хворих. Лише у пацієнтів віком понад 75 років зміни експресії VEGF і SD34 не мали позитивного характеру.

За допомогою електронної мікроскопії післяопераційних біоптатів переднього великогомілкового м'яза протягом перших трьох місяців після проведення непрямой ревазуляризації у хворих всіх вікових груп нам не вдалося спостерігати суттєвих ультраструктурних змін у порівнянні з передопераційним станом. Зокрема, зберігалися виразний набряк і вакуолізація цитоплазми, відзначалася деструкція міофібрил. Струк-

тура Т-трубочок і триад була ушкодженою у більшості спостережень. Також залишалися ушкодженими кулясті мітохондрії з редукованим матриксом і порушеними кристами. На подальших етапах дослідження у хворих віком до 75 років спостерігався незначний саркоплазматичний набряк та поодинокі вакуолі. Загальна структура Т-трубочок і триад виглядала стабільною, ознаки деструкції міофібрил виявлялися рідко, щільність міофібрилярного апарату зростала. Мітохондрії були поліморфними. Частка мітохондрій під сарколемою та поблизу ядра залишалася кулястої форми, зі зменшеною електронною щіль-

ністю матрикса і невеликим вмістом крист. Між міофібрилами мітохондрії були витягнутої форми, великими за розмірами, з розвинутими кристами та помірною електронною щільністю матрикса. Проявів кристалізу або фрагментації зовнішньої мітохондріальної мембрани не спостерігалося.

Дані ультраструктурометрії щодо післяопераційної динаміки значень щільності упакування міофібрил, мітохондрій та їх коефіцієнта сферичності по вікових групах представлені на відповідних діаграмах (рис. 4-6).

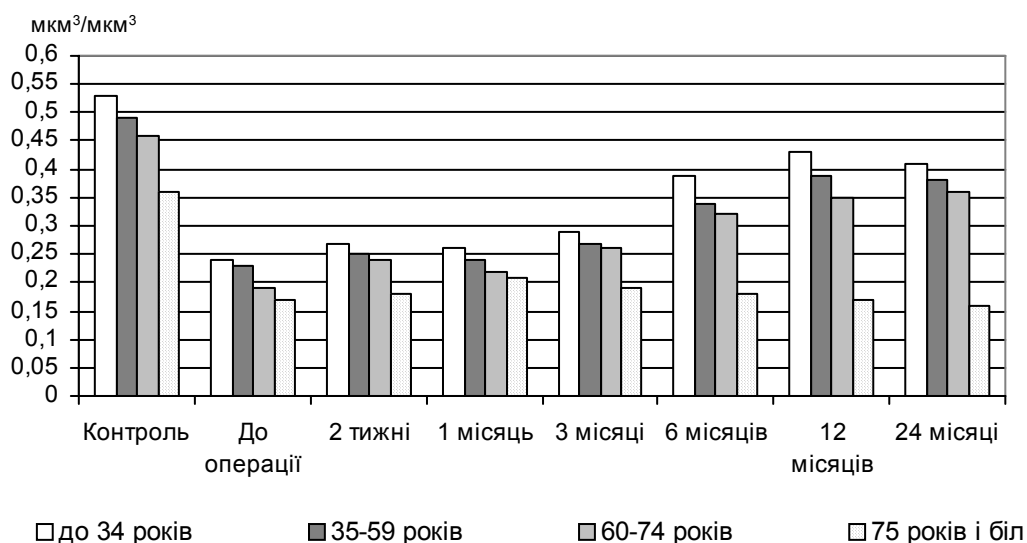


Рис. 4. Динаміка змін щільності упакування міофібрил у саркоплазмі волокон переднього великогомілкового м'язу (мкм³/мкм³) після проведення непрямой ревазуляризації.

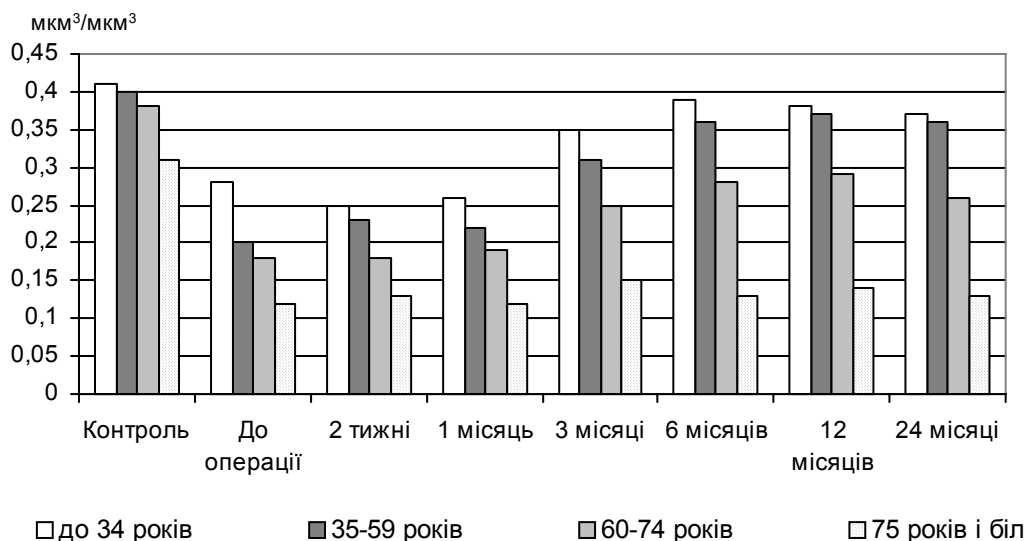


Рис. 5. Динаміка змін щільності упаковки мітохондрій у саркоплазмі волокон переднього великогомілкового м'язу ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) після проведення непрямой ревазуляризації.

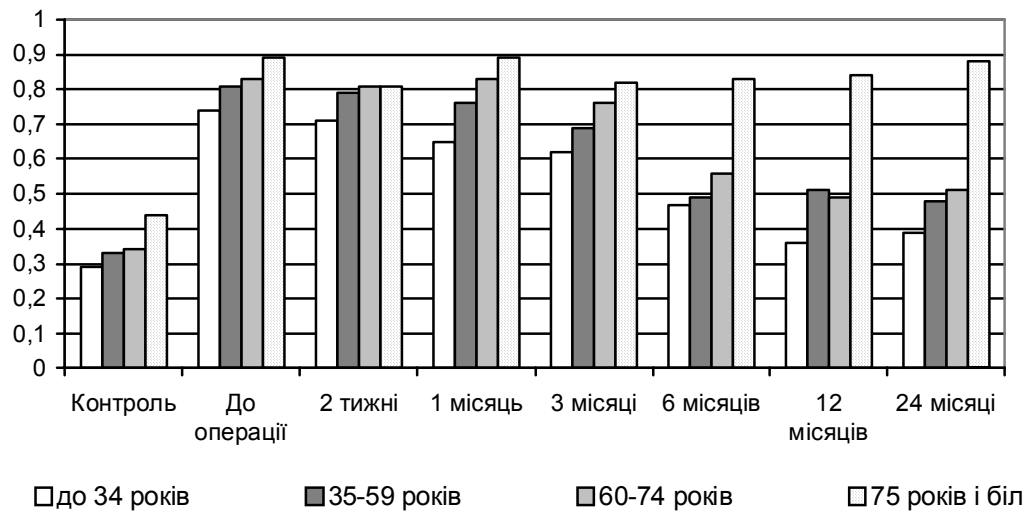


Рис. 6. Динаміка змін коефіцієнта сферичності мітохондрій у саркоплазмі волокон переднього великогомілкового м'язу після проведення непрямой ревазуляризації.

Дослідження імуногістохімічних особливостей щодо розподілу VEGF у м'язовій тканині через 2 і 4 тижні після проведення композитної ревазуляризації показало значне зниження експресії даного маркера у цитоплазмі незалежно від віку хворих. CD34 також активно експресувався ендотеліальними клітинами численних гемокапілярів, більшість яких ставали функціонально спроможними. Щільність мікросудин суттєво не змінювалась у порівнянні з передопераційним станом. У перикапілярному просторі накопичувалися клітини моноцитарного ряду, які активно експресували VEGF.

Через 3 місяці після оперативного втручання спостерігалися поодинокі м'язові волокна з активною цитоплазматичною експресією маркера VEGF. Ці волокна були малими за діаметром, містили центрально локалізовані ядра. Міосателітоцити навколо таких волокон також активно синтезували VEGF. У молодих пацієнтів кількість регенеруючих м'язових волокон була значно вищою, ніж у літніх хворих. У даний термін спостереження експресія CD34 не відрізнялася за інтенсивністю та локалізацією від попереднього етапу дослідження.

Через 6 місяців після операції у тканині переднього великогомілкового м'язу більшості пацієнтів віком до 75 років спостерігалася невелика кількість згрупованих дегенеративних VEGF-позитивних волокон з ознаками дистрофії. Навпроти, тканина м'язу була насиченою мілкими волокнами із значним накопиченням фактора VEGF у цитоплазмі, які знаходилися на різних стадіях регенерації. Окремі диференційовані волокна також містили мітку VEGF у саркоплазмі,

причому розподіл мітки був нерівномірним. На поперечних зрізах волокон помірне гістохімічне забарвлення спостерігалось субсарколемально, в той час як центральні частини волокон залишалися вільними від мітки. Розподілення CD34-позитивних структур було рівномірним, експресія – інтенсивною. У хворих старечого віку через 6 місяців після операції у тканині м'язу спостерігалися групи тонких волокон, які активно накопичували мітку до VEGF, проте не мали ознак регенерації, не виявляли поперечної посмугованості та містили ознаки дистрофії, хоча щільність CD34-позитивних елементів у прилеглих ділянках залишалася як на попередніх етапах післяопераційного періоду.

Наприкінці першого року спостереження кількість VEGF-позитивних клітин з ознаками регенерації та диференціювання залишалася високою. Більшість волокон мали субсарколемальну локалізацію імуногістохімічної мітки. Часто спостерігалися сателітні міоцити, які також синтезували VEGF. Щільність CD34-позитивних мікросудин значно зростала, що вказувало на активацію процесів неоваскулогенезу. Через 2 роки після аутотрансплантації у більшості спостережень лише поодинокі зрілі м'язові волокна без суттєвих патологічних ознак демонстрували помірну цитоплазматичну експресію VEGF. Також зустрічалися невеликі групи VEGF-позитивних м'язових волокон з ознаками дистрофії поблизу поодиноких мілких ділянок з некротично-дистрофічними змінами, а також у зонах виразного інтерстиційного набряку. Щільність експресії ендотеліального маркера CD34 не поступалася попередньому етапу, проте виявлялися мікро-

судини з периваскулярним набряком і звуженим просвітом. У зонах значного інтерстиційного набряку відзначалася помірна лейкоцитарна інфільтрація. У літніх пацієнтів кількість VEGF-позитивних дистрофічних волокон значно збільшувалась у порівнянні з попереднім етапом спостереження. Щільність експресії ендотеліального маркера CD34 лише незначно знижувалась у порівнянні з попередніми етапами, але переважна більшість мікросудин мала численні патологічні зміни на фоні лейкоцитарної і моноцитарної інфільтрації.

Ультраструктурне дослідження біопатів переднього великогомілкового м'яза протягом перших трьох місяців після проведення компримованої ревазуляризації у хворих досліджуваних вікових груп виявило нормалізацію багатьох внутрішньоклітинних структур. Організація Т-трубочок і триад у більшості випадків відповідала нормальному плану будови, ознаки деструкції міофібрил не виявлялися, проте їх щільність була дещо нижчою, ніж у контрольній групі. У саркоплазмі м'язових волокон спостерігався помірний інтрацелюлярний набряк та поодинокі вакуолі. Мітохондріальний апарат був представлений поліморфними органелами. Частка мітохондрій, що локалізувалися переважно під сарколемою або навколо ядра, залишалася кулястої форми, зі зменшеною електронною щільністю матрикса і невеликим вмістом крист. Міжміофібрилярні мітохондрії ставали витягнуті за формою, збільшувались за розмірами та мали розвинені кристи й електроно-щільний матрикс. Проявів кристалізу або фрагментації зовнішньої мітохондріальної мембрани не спостерігалось. Такі компенсаторні реакції мітохондріального апарату відзначалися у пацієнтів віком до 75 років. У хворих старечого віку спостерігалось набрякання і ваку-

лізація цитоплазми, у саркоплазмі візуалізувалися фрагменти міофібрил, порушувалася структура тубулярних елементів. Більшість мітохондрій мали низьку електронну щільність матрикса і малу кількість мітохондріальних крист. Міжміофібрилярні мітохондрії зменшувалися за розмірами та наближалися до кулястої конфігурації. Починаючи з 6-го місяця післяопераційного періоду у хворих віком до 75 років спостерігався незначний саркоплазматичний набряк та поодинокі вакуолі. Загальна структура Т-трубочок і триад виглядала стабільною, ознаки деструкції міофібрил виявлялися рідко, щільність міофібрилярного апарату зростала. Мітохондрії залишалися поліморфними. Незначна частка субсарколемальних та парануклеарних мітохондрій зберігала кулясту форму, містила невелику кількість крист та матрикс з помірною електронною щільністю. Міжміофібрилярні мітохондрії були витягнутої форми, великими за розмірами, з розвинутими кристами та помірною електронною щільністю матрикса.

За даними ультраструктурометрії, щільність упакування міофібрил в саркоплазмі протягом перших трьох місяців післяопераційного періоду поступово зростала і залишалася стабільною протягом всього періоду спостереження, за виключенням пацієнтів старечого віку (рис. 7). Щільність упакування мітохондрій зростала у пацієнтів віком до 60 років дуже активно; у хворих похилого та старечого віку зростання було повільнішим. У віддаленому післяопераційному періоді значення параметра суттєво не змінювалися за виключенням пацієнтів старечого віку (рис. 8). Динаміка змін показника коефіцієнту сферичності мітохондрій м'язових волокон після проведення компримованої ревазуляризації показана на відповідній діаграмі (рис. 9).

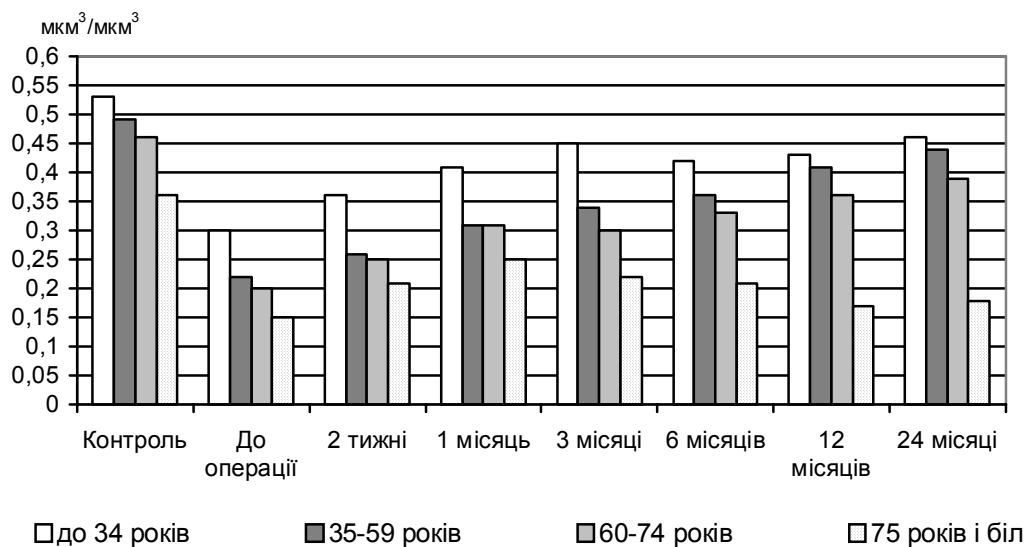


Рис. 7. Динаміка змін щільності упакування міофібрил у саркоплазмі волокон переднього великогомілкового м'язу ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) після проведення комpositної реваскуляризації.

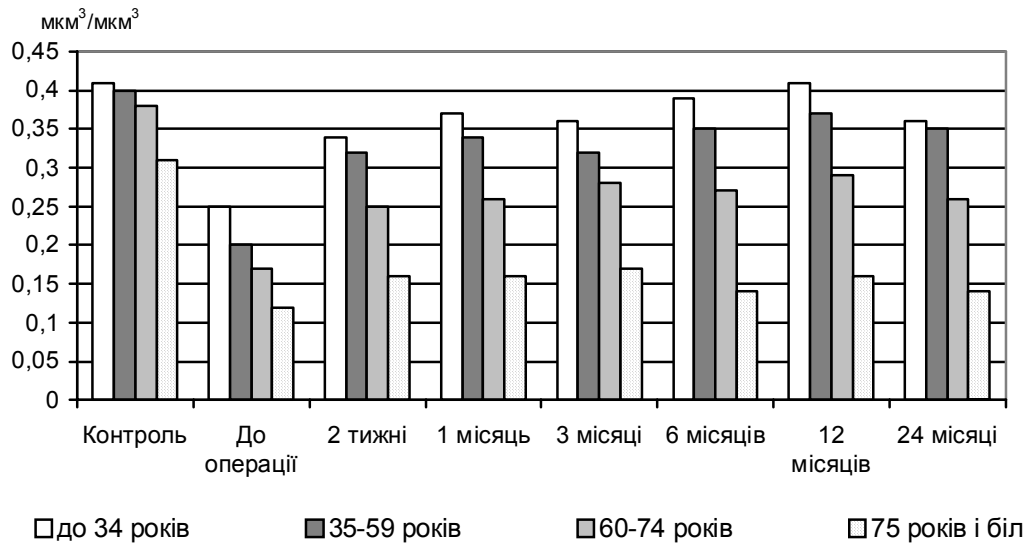


Рис. 8. Динаміка змін щільності упакування мітохондрій у саркоплазмі волокон переднього великогомілкового м'язу ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ ) після проведення комpositної реваскуляризації.

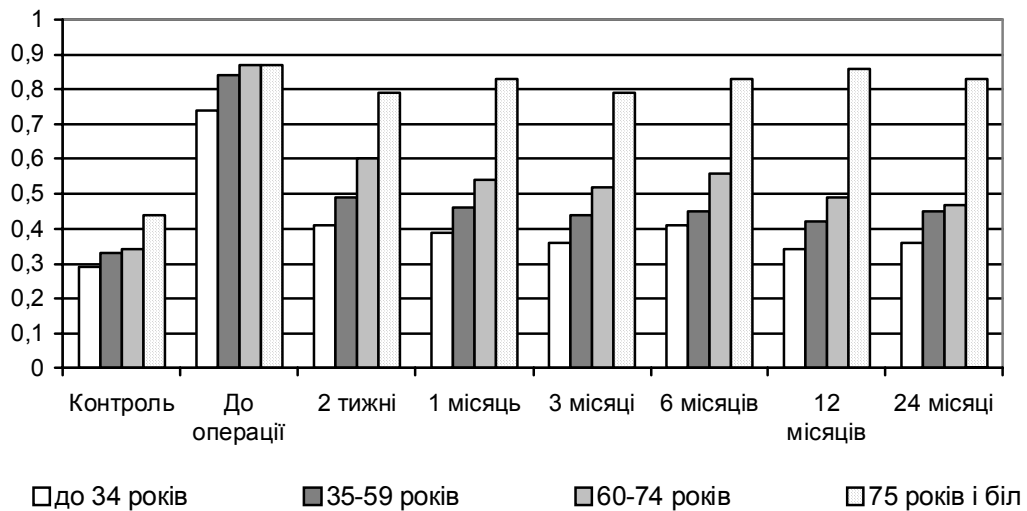


Рис. 9. Динаміка змін коефіцієнта сферичності мітохондрій у саркоплазмі волокон переднього великогомілкового м'язу після проведення комpositної реваскуляризації.

### Підсумок

Таким чином, проведення прямої реваскуляризації обумовлює суттєву нормалізацію імуногістохімічних характеристик тканини переднього великогомілкового м'язу за експресією факторів VEGF і CD34, а також ультраструктури м'язових волокон у хворих всіх досліджених вікових груп протягом 6 місяців після оперативного втручання, проте не забезпечує стабілізації позитивних змін у віддаленому післяопераційному періоді. Непряма реваскуляризація за допомогою ауто-

рансплантації аспірата кісткового мозку істотно не змінює структурно-функціонального стану компонентів переднього великогомілкового м'язу у найближчому післяопераційному періоді, проте обумовлює нормалізацію та стабілізацію імуногістохімічних та ультраструктурних показників ішемізованої м'язової тканини за рахунок ініціації неоваскулогенеза у хворих віком до 75 років. Комpositна реваскуляризація у даного контингенту хворих дозволяє отримати нормалізуючий ефект операції в найближчому післяопе-

раційному періоді та забезпечити його стабілізацію стосовно вивчених імуногістохімічних і ультраструктурних критеріїв у віддаленому післяопераційному періоді.

**Перспективи подальших досліджень** по-

в'язані з дослідженням клінічних особливостей перебігу післяопераційного періоду після проведення прямої, непрямой і комpositивної реваскуляризації з використанням аутоотрансплантації аспірата кісткового мозку.

### Літературні джерела

Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия : [руководство] / Г. Г. Автандилов. - М. : Медицина, 1990. - 384 с.

Карупу В. Я. Электронная микроскопия / В. Я. Карупу. - К. : Вища школа, 1984. - 162 с.

Лакин Г. Ф. Биометрия : [Учеб. пособие для биол. спец. вузов.- 4-е изд., перераб. и доп.] / Г. Ф. Лакин. - М. : Высшая школа, 1990. - 352 с.

Шкурпат В. М. Кількісна морфологічна оцінка результатів хірургічного лікування хворих з хронічною ішемією нижньої кінцівки за допомогою прямої, непрямой і комpositивної реваскуляризації / В. М. Шкурпат, І. В. Твердохліб, М. Ф. Дрюк. // Морфологія. - 2008. - Т. II, № 4. - С. 60-71.

Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease / T. K. Rosengart, L. Y. Lee, S. R. Patel [et al.] // *Circulation*. - 1999. - Vol. 100. - P. 468-474.

Characterization of MEC 14.7, new monoclonal antibody recognizing mouse CD34: a useful reagent for identifying and characterizing blood vessels and hematopoietic precursors / Garlanda C., Berthier R., Garin J. et al. // *Eur. J. Cell. Biol.*- 1997.- Vol. 73. - P. 368-377.

Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia / I. Baumgartner, A. Pieczek, O. Manor [et al.] // *Circulation*. - 1998. - Vol. 97. - P. 1114-1123.

Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (kdr/flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration / Tuomas T. Rissanen, Ismo Vajanto, Mikko O. Hiltunen [et al.] // *Am. J. Pathol.* - 2002. - Vol. 160, № 4. - P. 1393-1403.

Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor / N. Ferrara // *J. Mol. Med.* - 1999. - Vol. 77. - P. 527-543.

Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro / B. Q. Shen, D. Y. Lee, H. P. Gerber [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1998. - Vol. 273. - P. 29979-29985.

Jennische E. Expression of hepatocyte growth factor in growing and regenerating rat skeletal muscle / E. Jennische, S. Ekberg, G. L. Matejka // *Am. J. Physiol.* - 1993. - Vol. 265. - P. 122-128.

Li W. VEGF nuclear accumulation correlates with phenotypical changes in endothelial cells / W. Li, G. Keller // *J. Cell. Sci.* - 2000. - Vol. 113. - P. 1525-1534.

Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia using autologous bone marrow cell transplantation / H. Matsubara // *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. - 2003. - №10. - P. 877-883.

Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb / M. Arras, W. D. Ito, D. Scholz [et al.] // *J. Clin. Invest.* - 1998. - Vol. 101. - P. 40-50.

Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B / B. H. Jiang, M. Aoki, J. Z. Zheng [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1999. - Vol. 96. - P. 2077-2081.

Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to slowly growing angiosarcoma and high level expression of the VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in vivo / J. L. Arbiser, H. Larsson, L. Claesson-Welsh [et al.] // *Am. J. Pathol.* - 2000. - Vol. 156. - P. 1469-1476.

Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells / B. H. Jiang, J. Z. Zheng, M. Aoki, P. K. Vogt // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2000. - Vol. 97. - P. 1749-1753.

Rissanen T. T. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb—on the way to the clinic / T. T. Rissanen, I. Vajanto, S. Ylä-Herttua // *Eur. J. Clin. Invest.* - 2001. - Vol. 31. - P. 651-666.

Rivard A. Angiogenesis and vasculogenesis in treatment of cardiovascular disease / A. Rivard, J. M. Isner // *Mol. Med.* - 1998. - Vol. 4. - P. 429-440.

Shih S. C. Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L / S. C. Shih, K. P. Claffey // *J. Biol. Chem.* - 1999. - Vol. 274. - P. 1359-1365.

Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia / S. Takeshita, L. Weir, D. Chen [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* - 1996. - Vol. 227, № 2. - P. 628-635.

Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation / H. P. Ger-

ber, A. McMurtrey, J. Kowalski [et al.] // J. Biol. Chem. - 1998. - Vol. 273. - P. 30336-30343.

Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects / C. Kalka, H. Masuda, T. Takahashi [et al.] // Circ. Res. - 2000. - Vol. 86. - P.

1198-1202.

Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis / H. F. Dvorak, L. F. Brown, M. Detmar, A. M. Dvorak // Am. J. Pathol. - 1995. - Vol. 146. - P. 1029-1039.

**Шкуропат В.Н., Твердохлеб И.В., Дрюк Н.Ф. Иммуногистохимическая и ультраструктурная характеристика результатов хирургического лечения больных с хронической ишемией нижней конечности III степени.**

**Резюме.** Целью исследования был иммуногистохимический и электронномикроскопический анализ состояния передней большеберцовой мышцы у больных с хронической ишемией нижней конечности III степени после проведения прямой, не прямой и комбинированной реваскуляризации в ближайшем и отдаленном послеоперационном периодах. Исследован биопсийный материал пациентов в возрасте от 25 до 84 лет. Больные были разделены на три группы: 1) 37 больных, которым была выполнена бедренно-берцовая реконструкция; 2) 57 больных, которым была выполнена не прямая реваскуляризация с ауто-трансплантацией аспирата костного мозга; 3) 50 больных, которым была осуществлена комбинированная реваскуляризация дистальных отделов конечности. Наблюдение осуществляли в раннем послеоперационном периоде и в сроки до двух лет. Исследование проводили по возрастным группам: I – до 34 лет; II – 35-59 лет; III – 60-74 лет; IV – 75 лет и старше. Проводили иммуногистохимическое исследование экспрессии маркеров VEGF и CD34 и ультраструктурный анализ биоптатов передней большеберцовой мышцы на границе между верхней и средней третями. Исследование показали, что проведение прямой реваскуляризации обуславливает существенную нормализацию иммуногистохимических характеристик ткани передней большеберцовой мышцы по экспрессии факторов VEGF и CD34, а также ультраструктуры мышечных волокон у больных всех исследуемых возрастных групп на протяжении 6 месяцев после оперативного вмешательства, однако не обеспечивает стабилизации положительных изменений в отдаленном послеоперационном периоде. Не прямая реваскуляризация с помощью ауто-трансплантации аспирата костного мозга существенным образом не изменяет структурно-функционального состояния компонентов передней большеберцовой мышцы в ближайшем послеоперационном периоде, однако обуславливает нормализацию и стабилизацию иммуногистохимических и ультраструктурных показателей ишемизированной мышечной ткани за счет инициации неоваскулогенеза у больных в возрасте до 75 лет. Комбинированная реваскуляризация у данного контингента больных позволяет получить ранний нормализующий эффект операции в ближайшем послеоперационном периоде и обеспечить его стабилизацию относительно изученных иммуногистохимических и ультраструктурных критериев в отдаленном послеоперационном периоде.

**Ключевые слова:** ишемия нижней конечности, реваскуляризация, послеоперационный период, иммуногистохимия, VEGF, CD34, электронная микроскопия.