

Морфометричні дослідження кровоносних судин шкіри та м'язів у хворих з ішемічною формою синдрому діабетичної стопи

С. М. Діденко¹, В. В. Бойко², Ю. В. Іванова², В. Ю. Субботін¹, О. В. Каленська¹,
Л. В. Каленська¹, І. М. Савицька³

¹Клінічна лікарня «Феофанія», м. Київ,

²Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В. Т. Зайцева НАМН України, м. Харків,

³Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України, м. Київ

Morphometric investigations of the blood vessels of skin and muscles in patients, suffering an ischemic form of the diabetic foot syndrome

S. M. Didenko¹, V. V. Boyko², Yu. V. Ivanova², V. Yu. Subbotin¹, O. V. Kalenska¹,
L. V. Kalenska¹, I. M. Savytska³

¹Clinical Hospital «Feofaniya» of the State Affairs Management, Kyiv,

²Zaytsev Institute of General and Urgent Surgery, Kharkiv,

³Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, Kyiv

Реферат

Мета. Вивчити кількісні критерії ураження кровоносних судин шкіри та м'язів у хворих з ішемічною формою (ІФ) синдрому діабетичної стопи (СДС) та визначити на їх основі ступінь діабетичної мікроангіопатії (ДМАП).

Матеріали і методи. Відібрані зразки парафінових блоків шкіри та м'язів 49 хворих із цукровим діабетом (ЦД) 2-го типу та ІФ СДС на тлі стенозично-оклюзійного ураження артерій нижньої кінцівки, які перебували на лікуванні в Центрі судинної хірургії Клінічної лікарні «Феофанія» протягом 2014 – 2017 рр. Для порівняння відібрані зразки шкіри та м'язів 10 пацієнтів, які не мали системних захворювань. Проводили гістологічні та імуногістохімічні дослідження для виявлення колагену IV типу – маркера базальних мембран; VEGF – судинного ендотеліального фактора росту; CD31 – маркера ендотеліальних клітин; гладком'язового актину. Вимірювали та порівнювали діаметри та щільність кровоносних судин шкіри та м'язів.

Результати. Виявлені характерні зміни морфометричних показників судин гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) шкіри та м'язів при ДМАП, що дає змогу визначити її ступінь.

Висновки

1. Визначені кількісні показники, які змінювались залежно від перебігу та компенсації ЦД; щільність судин ГМЦР у сосочковому шарі шкіри; товщина базальних мембран кровоносних судин; діаметр просвіту судин ГМЦР.
2. Характерними якісними змінами в тканинах є: згладження базальної мембрани епідермісу, її розпушення на окремих ділянках; підвищення експресії рецепторів до VEGF (VEGFR–1); підвищення рівня експресії актину у кровоносних судинах, у тому числі в капілярах; нерівномірна експресія CD31 в кровоносних судинах.
3. На основі сукупності отриманих даних про якісні та кількісні зміни ГМЦР шкіри і м'язів розроблено критерії для визначення ступеня ДМАП, що може бути використано з метою створення алгоритму комплексного лікування хворих з ІФ СДС.

Ключові слова: цукровий діабет; синдром діабетичної стопи; діабетична мікроангіопатія.

Abstract

Objective. To study a quantitative criteria of affection of blood vessels in the skin and muscles in patients, suffering an ischemic form (IF) of diabetic foot syndrome (DFS) and to determine on their base a diabetic microangiopathy degree (DMAP).

Materials and methods. The probes of paraffin blocks of the skin and muscles were selected in 49 patients, suffering a Type II diabetes mellitus (DM) and IF of DFS on background of stenotic–occlusive affection of the lower extremities arteries, who were treated in the Centre of Vascular Surgery of Clinical Hospital «Feofaniya» in 2014 – 2017 yrs. For comparison the probes of the skin and muscles were selected in 10 patients, who did not have systemic diseases. There were conducted histological and immunohistochemical investigations for detection of a Type IV collagen – marker of basal membranes, VEGF – vascular endothelial growth factor; CD31 – marker of endothelial cells, and of a smooth muscles actin. The diameters and density of the blood vessels in the skin and muscles were measured and compared.

Results. Characteristic changes of morphometric indices of the hemomicrocirculatory bed (HMCB) of vessels in the skin and muscles in DMAP, what permits to detect its degree.

Conclusion

1. There were determined a quantitative indices, which have changed, depending on course and compensation of DM: density of the HMCB vessels in a papillary layer of the skin; the thickness of basal membranes of the blood vessels; diameter of the vessel's lumen in HMCB.
2. There are characteristic qualitative changes in tissues: a basal membrane of epidermis smoothing, its modulation in some sites; rising of expression of receptors towards VEGF (VEGFR–1); rising of the actin level expression in the blood vessels, including those in capillaries; uneven expression of CD31 in the blood vessels.
3. Basing on the obtained summarized data, concerning qualitative and quantitative changes in HMCB of skin and muscles, criteria were elaborated for determination of the skin and muscles DMAP degree, what may be applied to create the algorithm for complex treatment of patients, suffering IF of DFS.

Keywords: diabetes mellitus; diabetic foot syndrome; diabetic microangiopathy.

В останні десятиліття ЦД набув масштабів неінфекційної пандемії. Поширеність цього захворювання кожні 10 – 15 років подвоюється. Водночас до моменту установлення діагнозу більше ніж половина хворих уже мають клінічно виражену ДМАП [1], яка як ускладнення ЦД асоціюється з ризиком раннього розвитку і швидкого прогресування ішемічної хвороби серця, ураження судин головного мозку і периферичних артерій. Отже, проблема ЦД перетворилася на проблему судинної патології [2].

На увагу заслуговує можлива патогенетична роль морфологічних змін ГМЦР у розвитку такого ускладнення ЦД, як СДС [3]. Зв'язок між судинними порушеннями і станом шкіри хворих із ЦД очевидний, є численні дані про кореляцію між ними, проте здатність таких судинних порушень призводити до незворотних змін тканин стопи не доведена, незважаючи на те, що факт порушення функціонального тону судин не викликає сумнівів [4].

Одним із факторів, що мають велике значення для регенерації тканин, є рівень їх васкуляризації. Всі ці морфологічні компоненти тканин, які легко виявляють під час проведення імуногістохімічних реакцій, несуть інформацію про функціональний стан клітинних елементів та міжклітинних структур. У даний час за допомогою імуногістохімічних методів з високою достовірністю виявляють широкий спектр клітинних типів і позаклітинних компонентів. Знання імуногістохімічних особливостей різних компонентів тканин є необхідною умовою для використання цих методів з метою діагностики ряду захворювань [5].

Для визначення перебігу патологічних процесів важливо мати уявлення про найбільш значущі імуногістохімічні особливості клітинних і позаклітинних компонентів шкіри та м'язів. У проведеному дослідженні увага була приділена тим маркерам, які вважають основними для діагностичних цілей і які можуть бути виявлені в тканинах після фіксації у формаліні і ущільнення в парафіні [6].

Мета дослідження: вивчити кількісні критерії ураження кровоносних судин шкіри та м'язів у хворих з ІФ СДС та визначити на їх основі ступінь ДМАП.

Матеріали і методи дослідження

Для проведення досліджень були відібрані зразки парафінових блоків шкіри та м'язів 49 хворих (дослідна група) з ІФ СДС на тлі поєданого стенотично-оклюзійного ураження артерій стегнового та підколінно-гомількового сегментів, які перебували на лікуванні в Центрі судинної хірургії Клінічної лікарні «ФЕОФАНІЯ» протягом 2014 – 2017 рр. Для порівняння були відібрані зразки шкіри та м'язів 10 пацієнтів, які не мали системних захворювань (порівняльна група).

Матеріали для досліджень отримували під час виконання оперативних втручань з дотриманням правил етики і деонтології без морально-правових порушень згідно з положеннями Конвенції Ради Європи «Про захист прав та гідності людини у зв'язку з використанням досягнень біології та медицини» (1997 р.).

Отриманий матеріал фіксували в розчині нейтрально-го формаліну з об'ємною часткою 10%. Після фіксації відібрані зразки тканин ущільнювали в парафіні за загальноприйнятою схемою. Парафінові зрізи товщиною 4 мкм ви-

готовляли за допомогою мікротома Leica 2025. Частину з них забарвлювали гематоксиліном і еозиним, пікрофуксином за ван Гізоном. Для оцінки стану базальних мембран та порушень обміну в тканинах використовували метод реакції Шифф-йодної кислоти (ШИК-реакція) за МакМанусом з контролем амілазою. Фотодокументування гістологічних препаратів здійснювали за допомогою цифрової камери ICC50 HD світлооптичного мікроскопа Leica DM 500, морфометричну обробку – за допомогою відеоаналізатора і комп'ютерної програми «Paradise», розробленої науково-виробничою компанією «ЕВА».

Проводили імуногістохімічні дослідження з використанням таких антигенів: VEGF, CD31, гладком'язового актину, колагену IV типу.

Імунохімічні реакції проводили за стандартними протоколами з використанням моноклональних мишачих та кролячих антитіл.

Для імунохімічних досліджень виготовляли гістологічні зрізи товщиною 4 мкм на адгезивних предметних скельцях. Після депарафінування та промивання зрізів у дистильованій воді антигени демаскували. Для цього використовували 10% демаскувальний буфер, витримували зрізи протягом 40 хв від моменту закипання води в пароварці при температурі 98 °C у режимі «Пара», потім охолоджували. Зрізи витримували у трьох порціях буферу для промивання по 3 – 4 хв. Блокування ендогенної пероксидази здійснювали у 3% розчині перекису водню протягом 10 хв. Інкубацію антитіл у рекомендованих виробником розведеннях проводили протягом 30 хв за кімнатної температури у вологій камері. Поміщали зрізи в абсолютний спирт, ксилол, бальзам.

Товщину базальних мембран епідермісу та судин ГМЦР шкіри та м'язів у препаратах вимірювали у шести полях зору після ШИК-реакції та імуногістохімічного забарвлення антитілами до колагену IV типу при збільшенні $\times 400$. Отримані дані порівнювали між собою.

Просвіт кровоносних судин (артерій, венул, капілярів) у сосочковому шарі шкіри та поперечносмугастих м'язах вимірювали після імуногістохімічного забарвлення антитілами до колагену IV при збільшенні $\times 400$, також досліджували шість випадкових полів зору. Визначали щільність капілярів у сосочковому шарі дерми та поперечносмугастих м'язах у перерахунку на 1 мм² у препаратах, забарвлених імуногістохімічно з антитілами до CD31, підраховували лише позитивно забарвлені судини. Морфометричну та статистичну обробку здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Paradise». Статистичну достовірність різниці визначали за допомогою t-критерію Ст'юдента. Щодо всіх статистичних даних прийнято рівень достовірності – менше 0,05 ($p < 0,05$).

Результати

У зразках шкіри та м'язів хворих порівняльної групи під час дослідження імуногістохімічними методами експресії колагену IV типу було виявлено збереження базальної мембрани судин шкіри без ознак потовщення і розшарування. У капілярах досліджених зразків шкіри товщина базальної мембрани становила $(1,09 \pm 0,01)$ мкм ($n=12$). У зразках тканин хворих дослідної групи як при компенсо-

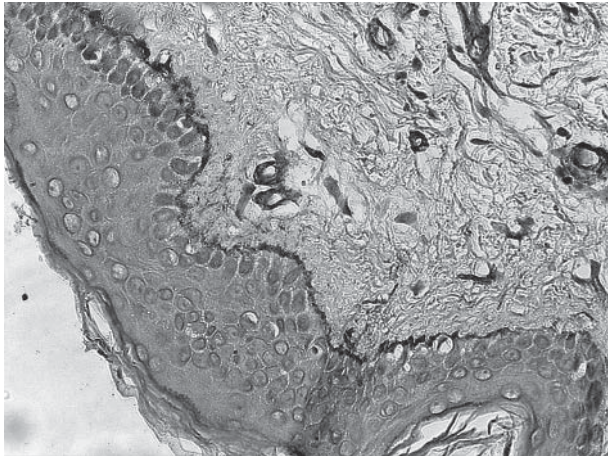


Рис. 1.
Мікрофото.
 Озпушення та потовщення базальних мембран судин ГМЦР сосочкового шару шкіри при ДМАП III ступеня. Забарвлення антитілами до колагену IV типу. Зб. $\times 400$.

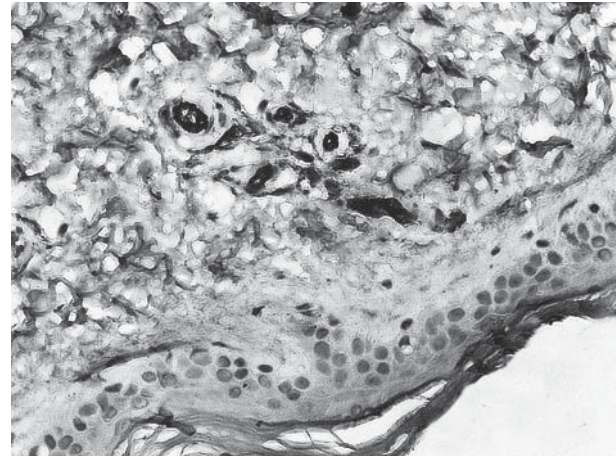


Рис. 3.
Мікрофото.
 Шкіра хворого з ЦД та ДМАП III ступеня. Вогнищева експресія CD31 у судинах дерми. Імуногістохімічне забарвлення антитілами до CD31. Зб. $\times 400$.

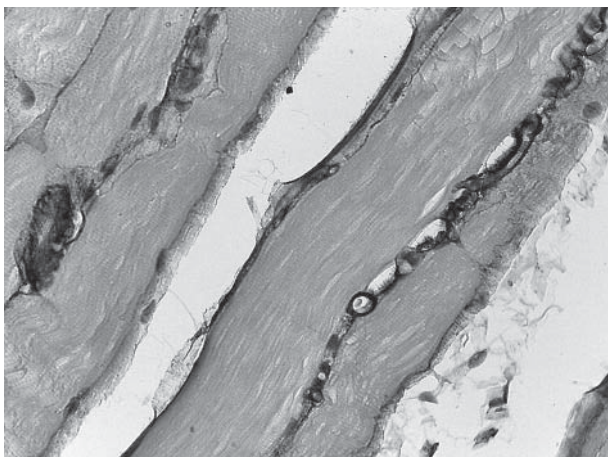


Рис. 2.
Мікрофото.
 Експресія колагену IV типу. Зменшення кількості відкритих капілярів у м'язах. Потовщення базальних мембран кровеносних судин. Зб. $\times 400$.

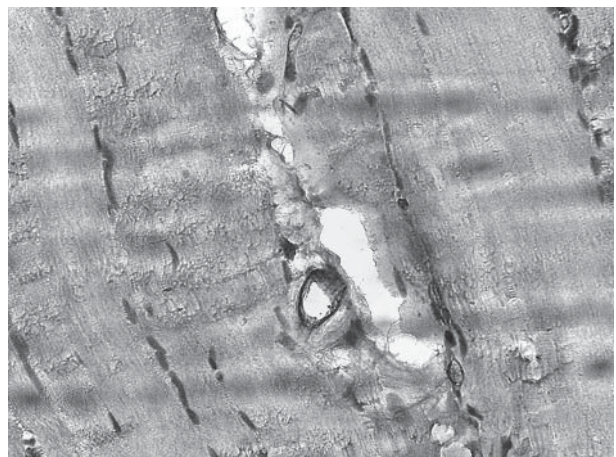


Рис. 4.
Мікрофото.
 Мени виражена експресія CD31 у судинах м'язів хворих з ДМАП III ступеня. Імуногістохімічне забарвлення антитілами до CD31. Зб. $\times 400$.

ваному та субкомпенсованому ЦД, так і при тяжкому перебігу некомпенсованого ЦД спостерігали потовщення базальної мембрани і збільшення експресії колагену IV типу, що призводило до прогресуючого звуження судин. Виявляли також розпушення дифузно потовщеної стінки судин ГМЦР сосочкового шару шкіри (рис. 1), що порушувало їх проникність. Товщина базальної мембрани капілярів при I ступені ДМАП становила $(2,01 \pm 0,05)$ мкм ($n=8$), II – $(2,67 \pm 0,05)$ мкм ($n=10$), III – $(3,89 \pm 0,11)$ мкм ($n=30$) ($p < 0,05$). Крім того, при III ступені ДМАП внутрішній діаметр всіх судин ГМЦР зменшувався. Збільшувалась експресія інших типів колагену не тільки у внутрішній, а й в інших оболонках судин. У скелетних м'язах відзначали набряк перимізію, капіляри були переважно закриті, здавлені набряклими строною та м'язовими волокнами, щільність їх значно зменшувалась (рис. 2) і становила 27% від щільності капілярів у м'язовій тканині хворих порівняльної групи, зменшувався й діаметр капілярів, у ГМЦР м'язів зменшувалась кількість артерій, а також зменшувався діаметр артерій і венул.

Під час вивчення щільності та розподілу судин ГМЦР шкіри після імуногістохімічного забарвлення антитілами до CD31 у пацієнтів порівняльної групи виявляли рівномірну експресію антигену в ендотелії судин, що свідчило про нормальний фізіологічний стан. У шкірі та м'язах хворих із ІФ СДС було виявлено високу інтенсивність та вогнищевий характер експресії CD31 (рис. 3), тобто на деяких ділянках препаратів експресії CD31 у судинах не було внаслідок атрофії ендотелію, що було найбільш характерними змінами, які виявляли в мікросудинах, крім того, визначали безсудинні ділянки, частіше під час дослідження м'язів.

Підрахунок кількості капілярів та венул сосочкового шару дерми показав, що у хворих з ДМАП I ступеня їх щільність на 1 м^2 була найменша, але поступово збільшувалась і максимально зростала при ДМАП III ступеня (табл. 1).

У поперечносмугастих м'язах хворих дослідної групи щільність судин ГМЦР, особливо капілярів (рис. 4), зменшувалась відносно даних, отриманих у порівняльній групі (табл. 2).

Таблиця 1. Зміни параметрів судин ГМЦР сосочкового шару дерми в залежності від ступеня ДМАП ($\bar{x} \pm m$)

Параметри	порівняльна	Групи пацієнтів		
		дослідна		
		ступінь ДМАП		
		I	II	III
Діаметр (мкм)				
артеріол	26,63 ± 1,69	24,02 ± 2,7*	15,65 ± 1,44*	10,28 ± 0,95*
венул	38,98 ± 2,15	33,26 ± 3,07	20,18 ± 2,03*	12,64 ± 1,06*
капілярів	8,19 ± 0,69	7,58 ± 1,1*	6,38 ± 0,58*	5,73 ± 0,47*
Щільність судин на 1мм ²	98,5 ± 3,4	112,1 ± 5,6	138, ± 4,1*	156,9 ± 8,1*

Примітка. * – вірогідність показників порівняно з показниками у пацієнтів, які не мали ЦД (p < 0,05). Теж в таблиці 2.

Таблиця 2. Зміни параметрів судин ГМЦР поперечносмугастих м'язів у залежності від ступеня ДМАП ($\bar{x} \pm m$)

Параметри	порівняльна	Групи пацієнтів		
		дослідна		
		ступінь ДМАП		
		I	II	III
Діаметр (мкм)				
артеріол	28,17 ± 0,67	23,17 ± 0,86*	18,97 ± 0,9*	12,68 ± 0,67*
венул	35,69 ± 1,01	30,75 ± 2,71*	23,06 ± 2,1*	13,56 ± 1,05*
капілярів	7,85 ± 0,09	7,47 ± 0,33*	6,79 ± 0,61*	5,07 ± 0,58*
Щільність судин на 1мм ²	166,5 ± 6,1	129,12 ± 3,11*	62,58 ± 4,16*	44,96 ± 3,96*

У результаті проведених досліджень встановлено, що кровоносні судини звужувались як у шкірі, так і у м'язах, їх внутрішній діаметр зменшувався внаслідок посиленого синтезу колагену, процесів склерозування та змін метаболізму в клітинах оболонки судин.

У хворих із ЦД підвищувалась у тканинах експресія VEGFR-1 внаслідок порушень метаболічних процесів та гіпоксії. Активація VEGFR-1 у свою чергу викликала підвищення судинної проникності. Все це призводило до розвитку мікросудинних порушень. Крім того, змінювались процеси ангіогенезу. Новоутворення кровоносних судин при ЦД мало компенсаторний характер, воно збільшувалось при підвищенні експресії VEGFR-1 у шкірі хворих з ДМАП, корелюючи з вираженістю порушень в ГМЦР. Так, у шкірі пацієнтів порівняльної групи спостерігали слабо виражену імунопозитивну реакцію. У шкірі хворих дослідної групи реакція кровоносних судин була яскраво виражена.

Проведені якісні дослідження експресії VEGFR-1 свідчили, що при ДМАП II та III ступеня посилювався синтез VEGF, який регулював ангіогенез.

На посилений ангіогенез при тяжкому перебігу та декомпенсації ЦД вказувала підвищена експресія актину в стінках судин ГМЦР, який у деяких спостереженнях виявляли навіть у стінках окремих капілярів як м'язів, так і сосочкового шару дерми. Тобто за допомогою імунгістохімічної реакції виявляли клітини з частковим гладком'язовим диференціюванням, а наявність таких клітин у стінках поодиноких капілярів свідчила про значні зміни в процесах диференціювання.

У стінці артерій хворих дослідної групи при ДМАП II та III ступеня спостерігали гіперплазію гладком'язових клі-

тин, у деяких міоцитах відзначали включення ліпідів, що вказувало на дистрофічні зміни в цих клітинах. Глибина і прояви дистрофічних і деструктивних процесів у клітинах кровоносних судин наростали з наростанням тяжкості стану хворих.

Обговорення

Шляхом застосування морфологічних та імунгістохімічних методів виявлено зміни судин шкіри та м'язів у хворих з ІФ СДС.

При виявленні колагену IV типу в зразках тканин хворих із ДМАП II та III ступеня спостерігали дифузне потовщення базальних мембран кровоносних судин дерми та м'язів і зменшення їх діаметру.

Під час вивчення експресії CD31 у кровоносних судинах хворих з ІФ СДС виявлено збільшення судинної щільності в дермі та зменшення її у м'язах, ендотелій судин пошкоджувався вже при II ступені ДМАП та більш значно – при III ступені.

ДМАП характеризувалась гіпертрофією медії артеріол, про що свідчило підвищення рівня експресії актину в цитоплазмі міоцитів.

У шкірі та м'язах нижньої кінцівки хворих з ІФ СДС при виявленні VEGFR-1 при ДМАП II та III ступеня спостерігали виражену експресію, якої не було в контрольних зразках.

Морфологічна структура шкіри може відображати зміни в інших тканинах. У м'язах зміни мають певні особливості, що не завжди корелюють зі змінами в тканинах шкіри. Зважаючи на відносну простоту біопсії шкіри, перспективним є її використання для визначення ступеня ДМАП.

Висновки

1. Визначені кількісні показники, що змінювались залежно від перебігу та компенсації ЦД: щільність судин ГМЦР у сосочковому шарі шкіри; товщина базальних мембран кровоносних судин; діаметр просвіту судин ГМЦР.

2. Характерними якісними змінами в тканинах є: згладження базальної мембрани епідермісу, її розпушення на окремих ділянках; підвищення рівня експресії VEGFR-1 та актину в кровоносних судинах, у тому числі в капілярах; нерівномірна експресія CD31 у кровоносних судинах.

3. На основі сукупності отриманих даних про якісні та кількісні зміни ГМЦР шкіри і м'язів розроблено критерії для визначення ступеня ДМАП, що може бути використано для створення алгоритму комплексного лікування хворих з ІФ СДС.

References

1. Fisher M, McMurray JJ. Epidemiology of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetic Cardiology* John Wiley & Sons, UK, 2007, 422 p. doi:10.1002/9780470723807.
2. Babayeva AR, Tarasov AA, Bezborodova TA, Zakhar'ina OA. Kontseptsiya sistemnogo vospaleniya v patogeneze diabeticheskoy angiopatii. *Vestnik GMU Vypusk* 2010;1(33): 3–8. [In Russian].
3. Walsh D. Pathophysiological mechanisms of angiogenesis. *Adv Clin Chem*. 2007;1(44):187–221. PMID: 17682343.
4. Schram MT, Stehouwer CD. Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res*. 2005 Apr;37 Suppl 1:49–55. doi: 10.1055/s-2005-861363.
5. Wasserman J, Maddox J, Racz M, Petronic-Rosic V. Update on Immunohistochemical Methods Relevant to Dermatopathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2009;7(133):1053–61. doi: 10.1043/1543-2165-133.7.1053.
6. Petrov SV, Rajhlin NT. Rukovodstvo po immunohimicheskoy diagnostike opuholej cheloveka pod redakciej 3 izdanie dopolnennoe i pererabotannoe. Kazan: Izd-vo «Titul», 2004; 456 p. [In Russian].