

## **Экспрессия синаптофизина в поднижнечелюстных железах собак при экспериментальных органосохраняющих операциях**

*Белорусский государственный медицинский университет*

В результате иммуногистохимического исследования с использованием синаптофизина доказано преимущество в плане сохранения функциональной активности оставшейся части поднижнечелюстной железы у экспериментальных животных (собак) после применения микрохирургической методики резекции железы по сравнению с традиционно применяемыми методиками операции. Ключевые слова: поднижнечелюстная железа, экспериментальная хирургия, иммуногистохимия

В основе традиционного выполнения органосохраняющих операций на больших слюнных железах лежат два основные оперативно-технические приема: тупое разъединение железистой ткани кровоостанавливающим зажимом, либо острое отсечение части железы скальпелем [2, 3, 7, 9]. Однако при этом нанесенная хирургическая травма ткани слюнной железы может вызвать такие послеоперационные осложнения, как острый воспалительный процесс, формирование слюнных кист и слюнных свищей, а нередко приводит и к структурно-функциональной гибели сохраняемой при операции слюнной железы.

Нами экспериментально разработана на собаках микрохирургическая методика анатомического разъединения ткани слюнной железы по междольковым соединительнотканым прослойкам с одномоментной диатермокоагуляцией междольковых кровеносных сосудов и выводных протоков [1, 4]. В сравнительном аспекте изучены гистологические изменения оставшейся части поднижнечелюстной железы экспериментальных животных через 1 месяц после выполнения микрохирургической резекции органа и применения традиционных методик операции. В результате исследования было выявлено, что микрохирургическая резекция слюнной железы по конечному результату больше соответствует органосохраняющему характеру операции по сравнению с традиционно применяемыми с этой целью хирургическими методиками (тупое разъединение железистой ткани кровоостанавливающим зажимом или острое отсечение части железы скальпелем), поскольку позволяет практически полностью сохранить структурную полноценность оставшейся части слюнной железы.

Цель исследования: Целью нашего исследования было выявить степень нарушения функциональной активности оперированных поднижнечелюстных желез собак путем сравнительного изучения экспрессии синаптофизина в сохраняемой части железы после проведения микрохирургической и традиционно применяемых методик проведения органосохраняющих операций на больших слюнных железах.

Материал и методы

Экспериментальные операции проводились на базе экспериментально-биологической клиники центральной научно-исследовательской лаборатории

Белорусского государственного медицинского университета. Объектом исследования являлись поднижнечелюстные железы 14 беспородных собак. Все оперативные вмешательства на животных (экспериментальные операции и забор материала для последующего иммуногистохимического исследования) проводились под внутривенным гексеналовым (тиопенталовым) наркозом. Первая группа (опытная группа) состояла из 4 экспериментальных животных, которым проводилось удаление 1/3 части поднижнечелюстной железы (передний полюс ее) путем микрохирургического анатомического разъединения железистой ткани по междольковым соединительнотканым прослойкам с одномоментной диатермокоагуляцией междольковых кровеносных сосудов и выводных протоков, последующим зашиванием капсулы железы и операционной раны. При этом использовался операционный микроскоп (увеличение в 5-10 раз), набор микрохирургического инструментария и атравматического шовного материала (этилон 7/0).

Вторую группу (группа сравнения) составили 3 экспериментальные животные, которым проводилось удаление 1/3 части поднижнечелюстной железы путем острого отсечения ее переднего полюса скальпелем, с последующим гемостазом кровоточащих сосудов диатермокоагуляцией их, зашиванием капсулы железы и операционной раны.

Третья группа (группа сравнения) состояла из 3 экспериментальных животных, которым проводилось удаление 1/3 части поднижнечелюстной слюнной железы (передний полюс ее) путем тупого разъединения железистой ткани кровоостанавливающим зажимом "Mosquito", с последующей остановкой кровотечения диатермокоагуляцией, зашиванием капсулы железы и операционной раны.

Контролем служили здоровые поднижнечелюстные железы 4 собак.

Через 1 месяц после проведенных экспериментальных операций проводился забор материала для последующего иммуногистохимического исследования путем прижизненной экстирпации оперированной ранее поднижнечелюстной железы вместе с ее выводным протоком (по типу операционной эксцизионной биопсии). После удаления слюнной железы, проводили тщательный гемостаз и операционную рану зашивали. В послеоперационном периоде отмечалась полное сохранение жизнедеятельности лабораторного животного.

В работе использован непрямой иммунопероксидазный метод с применением первичных антител к синаптофизину (СФ). Синаптофизин является основным структурным пептидом секреторных везикул. Распределение СФ в экзо- и эндокринных органах позволяет оценить степень дифференцировки и функциональной активности клеток [5, 6, 8]. Фиксация материала проводилась в 2% растворе Замбони. После промывки серийных криостатных срезов на них наносился 10% раствор нормальной козьей сыворотки (Dakopatts; X907). Обработанные сывороткой препараты помещались в темную увлажненную камеру на 30 минут. После удаления сыворотки срезы обрабатывались сывороткой, содержащей поликлональные антитела к синаптофизину (ДАКО А010, 1:400).

Извлеченные из темной увлажненной камеры препараты дважды промывались в кюветах с фосфатным буфером (рН 7.4). На срезы наносилась сыворотка козы с

вторичными антителами (GAR IgG, Dakopatts Z421) в разведении 1:100. Препараты помещались в инкубационную камеру, где сохранялись на протяжении 12 часов. После удаления избыточных вторичных антител на срезы наносился раствор, содержащий пероксидазно-антипероксидазный (ПАП) комплекс (Dakopatts Z113, 1:100) и препараты оставлялись в камере для инкубации еще на 12 часов. В качестве хромогена для выявления продукта реакции применялся диаминобензидин (Amerham).

#### Результаты и обсуждение

При иммуногистохимическом исследовании срезов поднижнечелюстной железы животных контрольной группы выявлено значительное количество

иммунореактивных к синаптофизину клеточных и волокнистых элементов

Продукт иммуногистохимической реакции различной степени выраженности в виде мелкодисперсных или пылевидных глыбок был распределен в цитоплазме, а также концентрировался как в апикальной, так и базальной частях клеток концевых отделов железистого органа. Вокруг концевых секреторных отделов прослеживались иммунореактивные к синаптофизину нервные волокна с варикозными утолщениями различной величины.

Через 1 месяц после резекции поднижнечелюстных желез путем анатомического микрохирургического разъединения железистой ткани по междольковым прослойкам у экспериментальных животных наблюдалась следующая иммуногистохимическая картина. Распределение иммунореактивных к синаптофизину гранул на срезах органа экспериментальных животных через 1 месяц после микрохирургической резекции поднижнечелюстной железы не имело существенных отличий от распределения продукта реакции к структурному пептиду в ткани железы контрольных животных. Выраженность иммуногистохимической реакции к синаптофизину также не была подвержена подвержена значительным вариациям. Так, синаптофизин-иммунореактивные структуры с сильной, средней и слабой реакцией прослеживались в концевых секреторных отделах – в центральной или апикальной частях или концентрировались в базальном отделе железистых клеток. Иммунореактивные к синаптофизину нервные волокна с гранулами продукта реакции различной величины точечной, овальной формы окружали концевые секреторные отделы или располагались между ними (рис. 1).

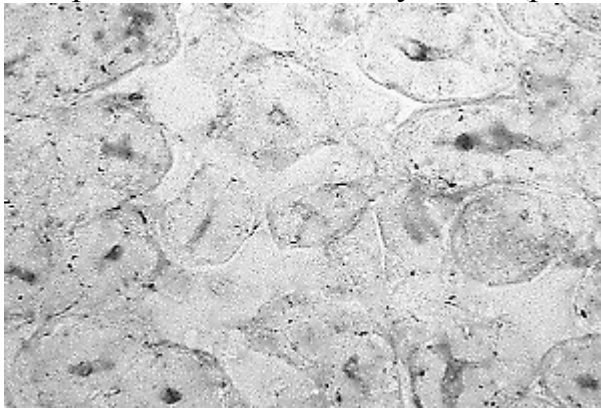


Рис. 1. Иммунореактивные к синаптофизину структуры поднижнечелюстной железы экспериментальных животных через 1 месяц после микрохирургической резекции железы

Примечание 1 - увеличение 400. Примечание 2 - непрямой иммуногистохимический метод

В поднижнечелюстных железах экспериментальных животных через 1 месяц после резекции органа путем острого отсечения части железы скальпелем большинство клеток концевых секреторных отделов и нервных волокон демонстрировало среднюю и слабую интенсивность иммуногистохимической реакции к синаптофизину. СФ-иммунореактивные нервные волокна с небольшими варикозными утолщениями на срезах поднижнечелюстной железы располагались неравномерно об окружая концевые секреторные отделы или следуя между ними. Они могли концентрироваться в подкапсулярной зоне и не определяться в центральных отделах органа. Продукт иммуногистохимической реакции отмечался в цитоплазме клеток концевых секреторных отделов в виде пылевидных глыбок, которые концентрировались в апикальной части или в базальном отделе.

В концевых секреторных отделах поднижнечелюстных желез экспериментальных животных через 1 месяц после резекции органа путем тупого разъединения железистой ткани кровоостанавливающим зажимом по сравнению с тканью органа собак предыдущих экспериментальных групп и контрольных животных иммунореактивность к синаптофизину заметно снижалась.

Значительно увеличивались промежутки между концевыми секреторными отделами. Отмечалось также неравномерное распределение СФ-ИР структур на площади срезов поднижнечелюстной железы. Продукт реакции к синаптофизину в железистых клетках прослеживался в виде мелкодисперсных глыбок.

Иммунореактивные к СФ нервные волокна с незначительным количеством варикозных утолщений окружали концевые секреторные отделы поднижнечелюстной железы или проходили между ними, число и величина варикозных расширений были также значительно меньше.

Выводы

1. В клетках концевых секреторных отделов поднижнечелюстной железы и нервных волокнах трех групп экспериментальных животных выявлена экспрессия синаптофизина, что является характерным признаком функциональной активности органа. При этом распределение иммунореактивных к структурному пептиду элементов и выраженность иммуногистохимической реакции в поднижнечелюстных железах зависели от применяемого метода оперативного вмешательства.

2. Микрохирургическая методика резекции поднижнечелюстных желез собак по конечному результату в функциональном отношении больше соответствует органосохраняющему характеру операции по сравнению с традиционно применяемыми с этой целью хирургическими методиками (тупое разъединение железистой ткани кровоостанавливающим зажимом или острое отсечение части железы скальпелем).

3. Полученные в результате экспериментальной работы данные позволяют применить микрохирургические принципы операций на железистой ткани в клинике при органосохраняющем хирургическом лечении болезней больших слюнных желез.

Литература

1. Ластовка, А. С. Морфо-биохимическое обоснование микрохирургического метода проведения органосохраняющих операций на поднижнечелюстных железах / А. С. Ластовка, В. А. Переверзев, В. В. Руденок // Докл. НАН Беларуси. 2001. Т. 45. № 1. С. 75–78.
2. Солнцев, А. М. Заболевания слюнных желез / А. М. Солнцев, В. С. Колесов, Н. А. Колесова. Киев: Здоров`я, 1991. 312 с.
3. de Pina, D.P. Aesthetic resection of the submandibular salivary gland / D.P. de Pina, W.C. Quinta // Plastic and reconstructive surgery. 1991. Vol. 88. № 5. P. 779–787.
4. Lastovka, A. Experimental application of microsurgical techniques of organsparing salivary glands operation / A. Lastovka A., O. Chudacov, A. Shabanovich // J. Craniomaxillofac. Surg. 2002. Vol. 30. [16 Congress EACMS: abstr.]. P. 316.
5. Leube, RE, Leimer, U., Grund, C. et al. (1994) Sorting of synaptophysin into special vesicles in nonneuroendocrine epithelial cells J. Cell Biol 127: 1589–1601.
6. Portela-Gomes, Stridsberg, M., Johansson, U., Grimelius, J. (1999) Colocalisation of synaptophysin with different neuroendocrine hormones Histochem. Cell Biol 111 (1): 49–54.
7. Surgery of the parotid gland. Indications. Review of the anatomy / J.L. Poncet [et al] // Ann. Radiol. Paris. 1991. Vol. 34. № 1–2. P. 122–129.
8. Wiedenman, B, Franke, WW (1985) Identification and localisation of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38, 000 characteristic of presynaptic vesicles. Cell 41: 1017–1028.
9. Yamada, T. Study of promotion recovery of rat salivary gland after half-side excision / T. Yamada, H. Yamamoto, K. Kakudo // J. Craniomaxillofac. Surg. 2006. Vol. 34. Suppl. S1. [EACFMS XVIII Congress: abstr.]. P. 200.