

© Н. А. Шудло, М. М. Шудло, Н. А. Кононович, 2014
УДК 616.748.41-001.32-003-93:599.323.4

Н. А. Шудло, М. М. Шудло и Н. А. Кононович

ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ, РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПОСЛЕ ЗАКРЫТОГО ЧАСТИЧНОГО РАЗДАВЛИВАНИЯ

Клинико-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти (зав. — д-р мед. наук Н. А. Шудло), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, г. Курган

С целью оценки степени регенерации скелетной мышцы у 15 взрослых крыс Вистар моделировали закрытое частичное раздавливание передней большеберцовой мышцы. Исследование проведено с использованием методов световой микроскопии, компьютерной морфометрии полутонких срезов. Непрерывность передавленных мышечных волокон (МВ) восстанавливалась к 21-м суткам после повреждения. Через 90 сут существенно уменьшалась выраженность фиброза и возрастала васкуляризация эндомизия, восстанавливалась вариабельность диаметров МВ, но сохранялись разветвлённая структура и миопатические изменения ткани, связанные с незавершённой реиннервацией повреждённых внутримышечных нервов.

Ключевые слова: скелетная мышца, повреждение, регенерация, морфометрия, крыса

Травмы скелетных мышц (контузия, раздавливание, разрыв, отморожение) вызывают длительные, иногда необратимые нарушения опорно-двигательных функций [12]. Их сочетание с переломами костей приводит к замедлению и снижению прочности костного сращения [11]. Между тем, существующие консервативные и оперативные методы лечения повреждений мышц недостаточно эффективны.

Гистогенетические основы регенерационного миогенеза хорошо изучены [2, 7]. Независимо от механизма повреждения мышечные волокна подвергаются дегенерации, в которой участвуют клетки воспалительного ряда. Регенераторные потенции мышц определяются присутствием тканеспецифических клеток-предшественников (миосателлитоцитов) в неповреждённых участках базальных мембран, а также возможностями реваскуляризации и реиннервации. Дифференцировка миосателлитоцитов в миообласты, пролиферация и слияние последних приводят к формированию многоядерных миотуб и мышечных волокон *de novo*. Многие миообласты сливаются с частично некротизированными мышечными волокнами и предотвращают их полную дегенерацию.

С помощью иммунофлюоресцентных методов установлено, что после полного раздавливания медленных мышц «миолиз» [6] сопровождается разрушением базальных мембран и фиброзом; в быстрых мышцах базальные мембраны сохраняются, перестраиваются в процессе регенерации,

и мышца приобретает, по выражению авторов, квази-нормальную структуру уже через 16 сут.

Для количественной оценки регенерации мышц применяются маркеры пролиферации, дифференцировки и становления метаболических типов мышечных волокон [8, 10]; гистоморфометрические параметры используются ограниченно. Несмотря на многочисленные исследования различных моделей повреждения мышц [1, 2, 6–10, 13], вопрос о полноте спонтанной регенерации после закрытого частичного раздавливания не имеет определённого ответа, хотя именно такой вид травмы наиболее часто встречается в клинике.

Цель настоящего исследования — гистоморфометрическая оценка восстановления скелетной мышцы на стандартизированной экспериментальной биологической модели закрытого частичного раздавливания.

Материал и методы. Исследование проведено на 18 взрослых белых крысах-самцах линии Вистар, которые содержались в условиях вивария. При выполнении экспериментов руководствовались требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и принципами Европейской конвенции [3]. У 15 животных под комбинированным наркозом в условиях операционной изогнутым эластичным кишечным зажимом в течение 20 с проводили сдавление голени на уровне средней трети при стандартном положении клемм, вызывающее формирование компрессионной борозды. Животных выводили из опыта через 7, 21 и 90 сут после операции. Для морфологических исследований иссекали среднюю треть

Сведения об авторах:

Шудло Наталья Анатольевна, Шудло Михаил Моисеевич (e-mail: m.m.sch@mail.ru), Кононович Наталья Андреевна, клинико-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, 640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6

передней большеберцовой мышцы (область компрессионной борозды). После альдегидно-осмиевой фиксации образцы измельчали по стандартной схеме, заливали в аралдит. Поперечные и продольные полутонкие (толщиной 1 мкм) срезы получали на ультратомах РМ III (LKB, Швеция) и окрашивали по Б.Уикли [5] и М.Онтелл [14]. Препараты изучали, используя микроскопы Opton (ФРГ), и проводили количественный анализ. Используя аппаратно-программный комплекс при инструментальном увеличении 800, получали цифровые изображения. Их геометрическую калибровку проводили с помощью цифрового изображения шкалы объективного микрометра. Пользуясь электронной версией оригинальной тестовой решетки [4], в графическом редакторе PhotoFiltre осуществляли точечную объемометрию. Определяли объемную долю (плотность, %) мышечных волокон (V_{Vmf}), микрососудов (V_{Vmv}), эндомизии (V_{Vend}) и нейтральных элементов во внутримышечных нервах (V_{Vneur}). В каждом поле зрения определяли число мышечных волокон и микрососудов, рассчитывали их численную плотность как среднее число в поле зрения (N_{Amf} и N_{Amv} соответственно), индекс васкуляризации (N_{Amv}/N_{Amf}), численную плотность внутримышечных ядер (N_{Ainuc}), индекс нуклеации (N_{Ainuc}/N_{Amf}). Результаты стереологического анализа мышц у экспериментальных животных сопоставляли с данными, полученными в аналогичных исследованиях мышц 3 интактных крыс. По результатам измерений минимального диаметра каждого мышечного волокна в выборке из 300 волокон от каждого животного оценивали распределение мышечных волокон по диаметру.

Результаты исследования. Через 7 сут после операции передняя большеберцовая мышца в области компрессионной борозды имела неоднородную структуру. В поверхностной и глубокой (прилежащей к большеберцовой кости) зонах обнаруживались как деструктивно-измененные, так и регенерирующие волокна (рис. 1, а, б), а в центральной зоне преобладали дистрофически измененные мышечные волокна (см. рис. 1, в).

В зонах деструкции были выражены признаки некроза и замещения передавленных участков мышечных волокон грануляционной тканью. Изредка обнаруживались врастающие в неё «мышечные почки», но диастазы между концами передавленных волокон не перекрывались. В поперечных срезах зона деструкции отличалась малыми диаметрами мышечных волокон, их округлёнными или деформированными контурами, отчетливо выраженным отёком, гипervasкуляризацией и повышенным количеством клеток в эндомизии. В нём, кроме фибробластов и макрофагов, встречались миобласты, а также перicyтоподобные клетки, которые располагались вблизи сосудов микроциркуляторного русла клетки и имели характерную перстневидную форму, но

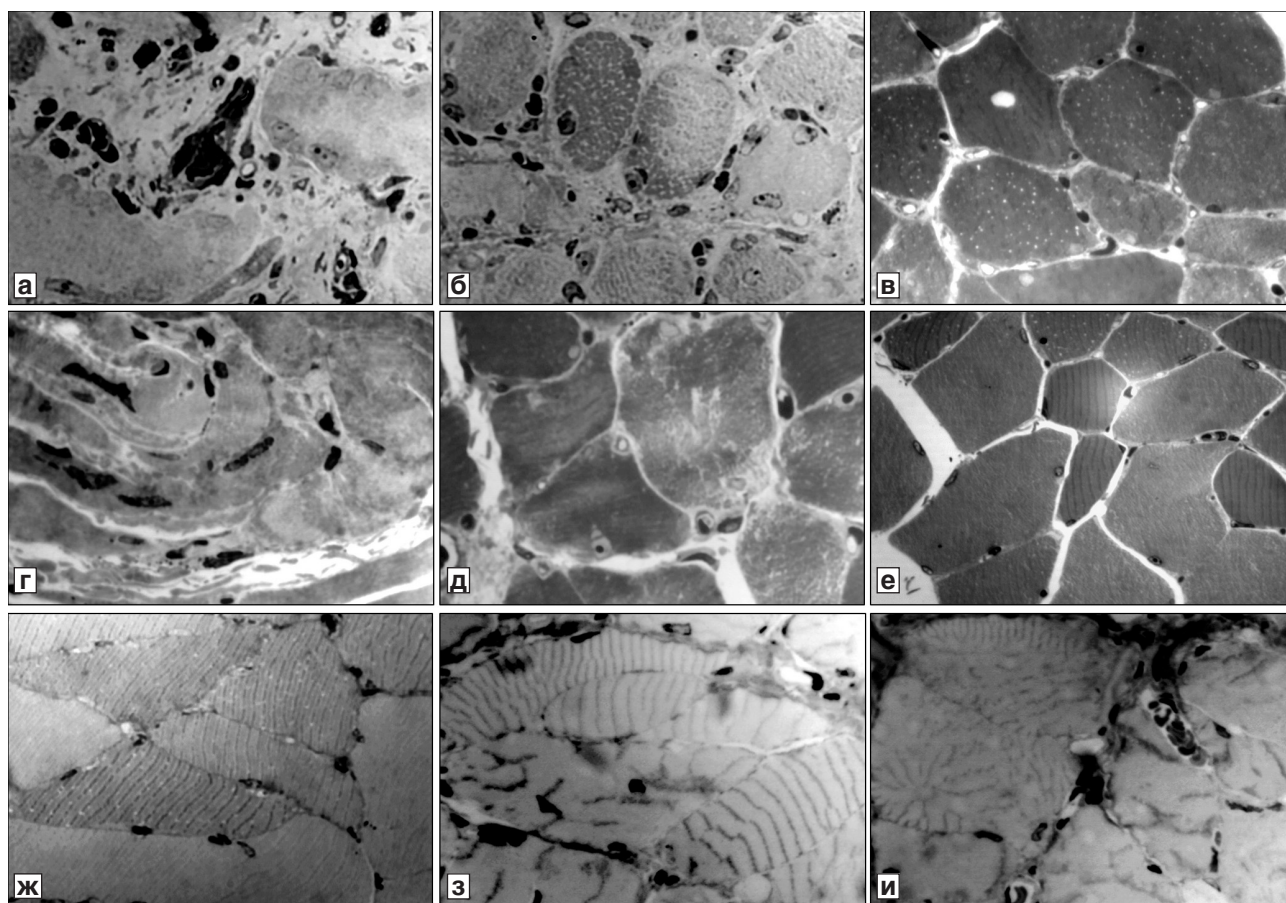


Рис. 1. Передняя большеберцовая мышца крысы после закрытого частичного раздавливания.

Срок от начала опыта: а–в — 7 сут; г–е — 21 сут; ж–и — 90 сут. Полутонкие срезы: продольные (а, г, ж) и поперечные (б, в, д, е, з, и). Окраска по Уикли. Об. 40, ок. 10

покинули типичные для сформированных капилляров позиции.

В мышечных волокнах увеличено количество ядер: по периферии саркоплазмы, в позиции мио- сателлитоцитов, а также внутри саркоплазмы; многие из них располагались тесными парами или группами. В некоторых регенерирующих мышечных волокнах выражен грубый миофибриллярный рисунок и даже восстановление поперечной исчерченности.

В зонах с преобладанием дистрофических изменений наблюдалось округление или спадение контуров мышечных волокон, вакуолизация саркоплазмы, расширение прослоек эндомизия с увеличением содержания фибробластов и коллагеновых волокон.

К 21-м суткам после операции происходило замещение грануляционной ткани регенерирующими мышечными волокнами; многие из них имели булавовидные вздутия, были гофрированы и деформированы (см. рис. 1, г). По-прежнему встречались мышечные волокна с эктопическими ядрами, которые имели округлую форму, светлую нуклеоплазму и хорошо выраженные увеличенные ядрышки. Аналогичными признаками обладали и многие периферически расположенные ядра. Нередки были мышечные волокна с усиленной базофилией саркоплазмы и грубым рисунком

миофибрилл, а также расщеплённые волокна (см. рис. 1, д, е).

Через 90 сут после операции зона повреждения определялась микроскопически по дезориентации мышечных волокон либо незначительным участкам замещения мышечных элементов соединительной тканью. Мышечные волокна отличались более плотным расположением, чем в предыдущий срок (см. рис. 1, ж), но в некоторых участках мышцы преобладали мелкие волокна с нарушенной (косопроходной) ориентацией (см. рис. 1, з) и дистрофически изменённые «дольчатые» волокна (см. рис. 1, з, и).

Стереологический анализ был проведён через 21 и 90 сут после операции. Через 21 сут объёмная доля мышечных волокон в регенерирующей мышце, по сравнению с таковой в интактной, снижена на 27,8%, микрососудов — увеличена в 2,3 раза, эндомизия — в 6,3 раза, а коллагеновых волокон — в 15,6 раза (табл. 1). Объёмная доля нейральных элементов во внутримышечных нервах не превышает 30%, что связано с валлеровской дегенерацией, эндоневральным отёком и аксональной атрофией в части нервных волокон. По сравнению с интактной мышцей численная плотность мышечных волокон была увеличена в 3,2 раза, микрососудов — в 1,3 и внутримышечных ядер — в 4,9 раза (табл. 2). Индекс васкуля-

Таблица 1

Объёмная доля компонентов интактной (контроль) передней большеберцовой мышцы и после закрытого частичного раздавливания ($\bar{x}$, %)

Группа крыс и срок от начала опыта	Исследованные компоненты				
	Мышечные волокна V_{Vmf}	Кровеносные сосуды V_{Vmv}	Эндомизий V_{Vend}	Коллаген в эндомизии V_{Vcol}	Нейральные элементы внутримышечных нервов (min — max) V_{Vneur}
Подопытная, 21 сут	67,6	4,6	27,8	15,6	16,4–28,3
Подопытная, 90 сут	86,6***	5,6	7,8***	6,6**	19,5–52,8*
Контроль	93,6	2	4,4	<1	68,3–79,2

Здесь и в табл. 2: различия статистически значимы по сравнению с показателями предыдущего срока опыта: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$; *** при $P < 0,001$.

Таблица 2

Численные первичные и вторичные стереологические параметры интактной (контроль) передней большеберцовой мышцы и после закрытого частичного раздавливания ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группа крыс и срок от начала опыта	Численная плотность			Индексы	
	Мышечных волокон N_{Amf}	Кровеносных сосудов N_{Amv}	Внутримышечных ядер N_{Ainuc}	Васкуляризации N_{Amv}/N_{Amf}	Нуклеации N_{Ainuc}/N_{Amf}
Подопытная, 21 сут	73±4	38,8±2,5	68±3	0,53	0,93
Подопытная, 90 сут	67±4	50,1±2,6**	68±3	0,74*	0,67
Контроль	22,8±0,7	29,2±0,8	14,2±0,4	1,28	0,62

Примечание. Жирный шрифт — отсутствие статистически значимого различия показателей в контрольной группе.

ризации был уменьшен на 58,6%, а индекс нуклеации увеличен на 33,3%.

Через 90 сут после операции по сравнению с предыдущим сроком опыта уменьшались объёмная доля эндоневрия (в 3,8 раза) и содержание коллагеновых волокон (на 57,7%). При этом увеличивались объёмная доля (на 21,7%) и численная плотность микрососудов (на 31,6%), значительно (на 39,6%) возрастал и индекс васкуляризации мышцы, однако, по сравнению с интактной мышцей этот параметр был снижен на 42%. Несмотря на значимое увеличение объёмной доли нейральных элементов по сравнению с таковой в предыдущем сроке, показатель не достигал уровня в интактной мышце. Не имел значимых отличий от значения в интактной мышце индекс нуклеации, что свидетельствует о затухании регенерационного процесса.

При анализе распределения мышечных волокон по диаметру (рис. 2) установлено, что через 21 сут после операции гистограмма была резко смещена влево по сравнению с гистограммой интактной мышцы, её главный пик располагался в диапазоне 0,1–10 мкм. Через 90 сут после операции вариативность диаметров мышечных волокон была сопоставима с таковой в интактной мышце, но распределение имело бимодальный характер.

Обсуждение полученных данных. Для разработки методов лечения травм скелетных мышц необходимы клинически адекватные биологические модели повреждений. С этой точки зрения модель закрытого частичного раздавливания представляет практический интерес. В качестве объекта исследования выбрана передняя большеберцовая мышца крыс, имеющая преимуществен-

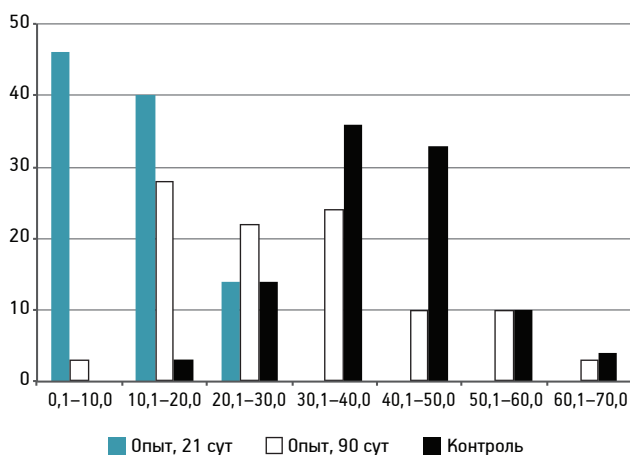


Рис. 2. Гистограмма распределения волокон по диаметру в передней большеберцовой мышце крыс через 21 и 90 сут после закрытого частичного раздавливания и в контроле (интактная мышца).

По оси абсцисс — размерный диапазон (мкм), по оси ординат — доля волокон данного размерного диапазона (%)

но продольную ориентацию мышечных волокон, что облегчает задачи стереологического анализа. Применение хирургического инструмента с шириной бранши, равной $1/3$ длинника передней большеберцовой мышцы крысы, позволило стандартизовать степень и локализацию зоны повреждения.

Как показали результаты выполненного исследования, повреждение вызывало полный либо частичный некроз мышечных волокон, а также их дистрофические изменения на фоне редуцированного кровоснабжения и частичной денервации.

По данным выполненного количественного исследования, в мышце, регенерирующей после закрытого частичного раздавливания, даже при спонтанном заживлении происходит значительное увеличение объёмной доли мышечных волокон (до 92,5% от соответствующего параметра интактной мышцы), а также существенное уменьшение долей эндоневрия и коллагеновых волокон. Судя по изменениям характера распределения по диаметру, большинство мышечных волокон укрупняются, но даже через 90 сут после повреждения в регенерирующей мышце увеличено представительство волокон малого диаметра (20 мкм и менее) в результате стойкой атрофии части волокон, а также гиперпластического регенераторного ответа, включающего расщепление и новообразование мионов, многие из которых приобретали не свойственную нормальной мышце ориентацию. Известно, что эти мелкие волокна на ультраструктурном уровне характеризуются хаотичным расположением миофибрилл и субсарколеммальными скоплениями митохондрий [15]. Кроме того, в конце опыта обнаружены скопления дистрофически изменённых («дольчатых») мышечных волокон, связанных с нарушениями оксидативного метаболизма и сократительной функции при денервации [15].

Известно, что разработка методов лечения разрывов мышц сфокусирована на стимуляции миогенеза и редуцировании фиброза [13]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что при закрытом частичном раздавливании для морфофункционального восстановления мышцы более критичен фактор неполной реиннервации, что должно быть учтено при разработке адекватных терапевтических воздействий.

Выводы. Итак, регенерат передней большеберцовой мышцы крыс в зоне компрессионной борозды после закрытого частичного раздавливания характеризуется преобладанием мышечных элементов, восстановлением вариативности диаметров мышечных волокон, существенным уменьшением фиброза и увеличением васкуляризации эндоневрия, однако вплоть до 90 сут после

повреждения сохраняется разветвлённая структура и миопатические изменения регенерирующих мышечных волокон в результате незавершённого реиннервационного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булякова Н.В. и Азарова В.С. Возрастные особенности регенерации мышц при травме, воздействии He-Ne лазера и аллопластике мышечной ткани от животного того же возраста. *Морфология*, 2013, т. 143, № 3, с. 45–49.
2. Данилов Р.К. Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб., Изд-во ВмедА им. С.М. Кирова, 2008.
3. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. *Вопр. реконструкт. пластич. хир.*, 2003, №4, с. 34–36.
4. Щудло М.М., Ступина Т.А., Щудло Н.А. Количественный анализ метахромазии суставного хряща в телепатологии. *Известия Челябинского НЦ (УРО РАН)*, 2004, № 25 (Спец. вып.), с. 17–22.
5. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М., Мир, 1975.
6. Bassaglia Y., Gautron J. Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 1995, v. 16, № 4, p. 420–429.
7. Charge S.B., Rudnicki M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.*, 2004, v. 84, p. 209–238.
8. Crassous B., Richard-Bulteau H., Deldicque L. et al. Lack of effects of creatine on the regeneration of soleus muscle after injury in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2009, v. 41, № 9, p. 1761–1769.
9. Díaz-Flores L., Gutiérrez R., Madrid J.F. et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol. Histopathol.*, 2009, v. 24, № 7, p. 909–969.
10. Fink E., Fortin D., Serrurier B. et al. Recovery of contractile and metabolic phenotypes in regenerating slow muscle after notexin-induced or crush injury. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 2003, v. 24, № 7, p. 421–429.
11. Harry L.E., Sandison A., Paleolog E.M. et al. Comparison of the healing of open tibial fractures covered with either muscle or fasciocutaneous tissue in a murine model. *J. Orthop Res.*, 2008, v. 26, № 9, p. 1238–1244.
12. Kirkendall D.T. and Garrett W.E. Jr. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2002, v. 403 (Suppl.), p. S81–S89.
13. Negishi S., Li Y., Usas A. et al. The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries. *Am. J. Sports Med.*, 2005, v. 33, № 12, p. 1816–1824.
14. Ontell M. Muscle satellite cells: a validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation. *Anat. Rec.*, 1974, v. 178, p. 211–228.
15. Tsuburaya R., Suzuki T., Saiki K. et al. Lobulated fibers in a patient with 46-year history of limb-girdle muscle weakness. *Neuropathology*, 2011, v. 31, l. 4, p. 455–457.

Поступила в редакцию 15.11.2013
Поступила после доработки 15.03.2014

HISTOMORPHOMETRIC CHARACTERISTIC OF SKELETAL MUSCLE REGENERATING AFTER A CLOSED PARTIAL CRUSH INJURY

N.A. Shchudlo, M.M. Shchudlo and N.A. Kononovich

To evaluate the degree of skeletal muscle regeneration in 15 adult Wistar rats, the closed partial crush injury of anterior tibial muscle was modeled. The study was performed using the methods of light microscopy and computer-assisted morphometry of semithin sections. The continuity of the crushed muscle fibres (MF) was restored by day 21 after the injury. After 90 days endomysial fibrosis was substantially reduced and its vascularity increased; the variability of MF diameters was restored, however the branched structure and myopathic changes of the regenerated tissue persisted and were presumably associated with an incomplete reinnervation of the damaged intramuscular nerves.

Key words: *skeletal muscle, regeneration, injury, morphometry, rat*

Clinical-and-Experimental Laboratory of Reconstructive-and-Restorative Microsurgery and Surgery of the Hand, G.A. Ilizarov Russian Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopedics, Kurgan