

УДК 616-06+616-002+616-092

© Коллектив авторов, 2012.

ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ КРЫС В РАЗНЫЕ СРОКИ ФОРМИРОВАНИЯ СИНДРОМА ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

О.А. Мальченко, А.В. Кубышкин, Л.В. Анисимова, В.В. Шаланин, Ю.В.Мандрик

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», кафедра патологической физиологии (зав. – профессор А.В.Кубышкин), г. Симферополь.

CHANGES IN MUSCULAR TISSUE OF HIND LIMB OF RATS AT DIFFERENT TIMES OF ISCHEMIA-REPERFUSION SYNDROME FORMATION

O.A. Malchenko, A.V. Kubyshkin, L.V. Anysymova, V.V. Shalanin, Yu.V. Mandryk

SUMMARY

At experimental modeling of the ischemia- reperfusion syndrome on the Wistar rats the disappearance of transverse striation was demonstrated. Intracellular edema, expressed to the different degree signs of necrosis, inflammation with predominance of neutrophilic exudation were observed. Changes in muscular tissue completely and directly depended on the time of reperfusion, which is manifested by the expressed increase in the local nonspecific proteolytic enzymes of muscular tissue and by the exhaustion of the tissue inhibiting potential.

ЗМІНИ У М'ЯЗОВІЙ ТКАНИНІ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ ЩУРІВ В РІЗНІ ТЕРМІНИ ФОРМУВАННЯ СИНДРОМУ ИШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

О.А.Мальченко, А.В. Кубишкін, Л.В. Анісімова, В.В. Шаланін, Ю.В.Мандрик

РЕЗЮМЕ

При експериментальному моделюванні синдрому ішемії-реперфузії на білих щурах-самцях лінії Вистар в м'язовій тканині спостерігається зникнення поперечної посмугованості, внутрішньоклітинний набряк, різного ступеню ознаки некрозу та запальна реакція з переважанням в ексудаті нейтрофільних гранулоцитів. Ступінь прояву цих змін безпосередньо залежить від часу реперфузії, що проявляється суттєвим зростанням активності місцевих неспецифічних протеолітичних ферментів м'язової тканини і виснаженням її інгібіторного потенціалу.

Ключевые слова: синдром ишемии-реперфузии, мышечная ткань, воспаление, неспецифические протеиназы, ингибиторы неспецифических протеиназ.

В настоящее время в мире широко изучается развитие синдрома ишемии - реперфузии после реваскуляризации головного мозга, миокарда, внутренних органов, конечностей как при острой, так и при их хронической ишемии [3]. Синдром ишемии-реперфузии, лежит в основе многих патологических процессов таких, как стенокардия, инфаркт миокарда, инсульт, кишечная непроходимость, почечная недостаточность и в настоящее время является весьма актуальным. Механизм реперфузионного повреждения связан с нарушениями микроциркуляции, проявляющимися отёком эндотелия, лейкоцитарно-эндотелиальной адгезией, экстравазацией альбумина и нарушением релаксации артериол [4, 5]. Нарушение кровоснабжения и гипоксия в каком-либо участке ткани или органа обычно приводит к отмиранию клеток. Причем клетки гибнут именно с того момента, когда к ним вновь начинает поступать кислород. Основой этих патофизиологических процессов являются изменения клеточного метаболизма во время ишемии: истощение запаса макроэргических соединений во время ишемии, нарушение транспорта ионов и падение трансмембранного потенциала, активация процессов перекисного окисления липидов, ограниченного

протеолиза, стимуляция образования избытка свободных радикалов кислорода, вызывающих повреждение цитоплазматических структур. Эти патологические процессы являются следствием не только предшествовавшей ишемии, но и последующей реоксигенации, которая не только не останавливает их развитие, но и часто значительно активизирует [1, 7, 8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены на 60 белых крысах-самцах линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария. Вес животных находился в пределах 200-220 г. Реперфузионный синдром моделировали путем наложения резиновых жгутов на обе задние конечности животных на уровне паховой складки сроком на 6 часов под легким эфирным наркозом, используя модификацию В. З. Харченко (удостоверение на рационализаторское предложение № 1786, выданное Крымским государственным медицинским институтом 28.09.89 г.). Ширина пережатия тканей составляла 2-3 мм. Критерием состоятельности наложения жгута являлось отсутствие отека конечности и бледность их окраски. Ранее

проведенные исследования показали, что применение легкого эфирного наркоза не влияет на биохимические показатели сыворотки крови крыс. Было сформировано 4 экспериментальные и контрольная группа животных, по 12 особей в каждой. Первую группу составили животные с 6 часовой ишемией. Вторую группу - животные с реперфузией в течение шести часов, третью – двенадцати часов, четвертую – двадцати четырех часов. Исследование протеолитических ферментов и их ингибиторов проводили с использованием специфических субстратов на основе энзиматических методов [2]. Срезы для световой микроскопии готовились по стандартной методике. Изменения мышечной ткани расшифровывали в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Полученные результаты подвергали статистической обработке. За достоверную принималась разность средних значений при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Микроскопические исследования мышечной ткани ишемизированной конечности крыс в течение 6 часов без реперфузии, которые составили первую группу, выявили исчезновение поперечной исчерченности мышечной ткани (рис. 1).

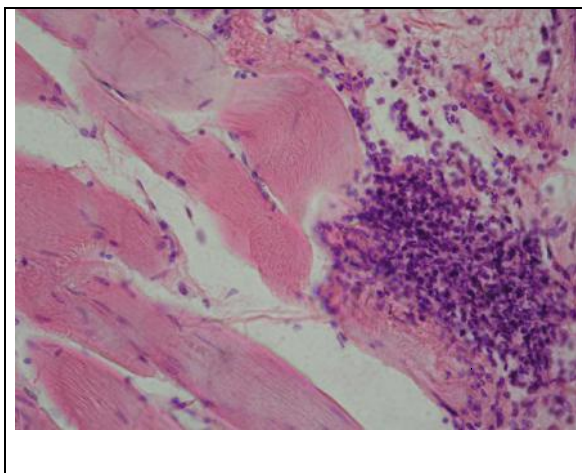


Рис.1. Исчезновение поперечной исчерченности мышечной ткани. Разрыв мышечных волокон. Гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 40$.

Также наблюдаются очаги некроза цитоплазмы части мышечных клеток с появлением разрывов мышечных волокон (рис.2). Появляются признаки внутриклеточного отека. Сосудистое русло заустевает. Отмечаются признаки отека мышечной ткани - пространства между отдельными клетками расширены за счет отечной жидкости.

Данные изменения сопровождались появлением дисбаланса в местной неспецифической протеиназ-ингибиторной системы мышечной ткани и характеризовались ростом активности неспецифических протеиназ и незначительным снижением их ингибиторов.

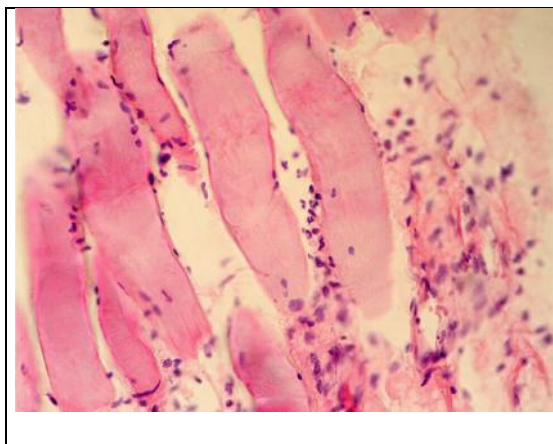


Рис.2. Запущение сосудов. Некроз миоцитов. Гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 40$.

Во второй группе экспериментальных животных микроскопические исследования мышечной ткани показали, что ее морфологическая картина неоднородна и мозаична. Имеются достаточно небольшие участки, где структура мышечных клеток практически не изменялась по сравнению с нормой, однако большая часть клеток имела выраженные в разной степени признаки некроза. Так, отмечается, исчезновение поперечной исчерченности, появление признаков внутриклеточного отека, очаговый глыбчатый распад и лизис цитоплазмы части клеток, а также распад и фрагментация самих мышечных волокон. Отмечаются признаки отека мышечной ткани - пространства между отдельными клетками расширены, порой значительно, за счет отечной жидкости.

Клеточная воспалительная реакция представлена преимущественно сегментоядерными лейкоцитами и выражена в разных участках так же по-разному – то они практически отсутствуют, то их очень значительное количество (рис.3.).

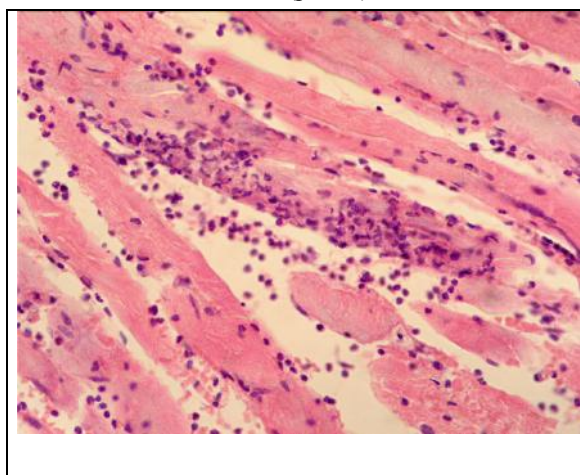


Рис.3. Скопление сегментоядерных нейтр. Гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 40$.

Имеется тенденция к скоплению нейтрофилов вокруг некротизированных клеток и периваскулярно. Данные изменения сопровождались развитием

дисбаланса неспецифической протеиназ-ингибиторной системы мышечной ткани, короткие проявлялись ростом активности неспецифических протеиназ и снижением их ингибиторов.

Также наблюдается выраженная реакция со стороны сосудистого русла - просветы сосудов паралитически расширены, заполнены эритроцитами. Имеются признаки умеренно выраженного периваскулярного отека, а так же наблюдается значительное количество петехиальных кровоизлияний (рис.4). В отдельных полях зрения кровоизлияния сливаются и начинают напоминать геморрагическую инфильтрацию. В просвете части сосудов отмечается наличие признаков сладжа, а так же видно достаточно значительное число фибриновых тромбов.

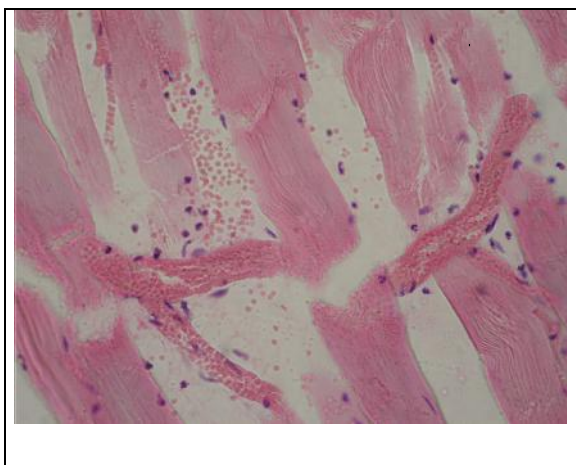


Рис.4. Периваскулярный отек, петехиальные кровоизлияния. Гематоксилин-эозин. Увеличение x40.

В третьей экспериментальной группе животных подвергшихся шестичасовой ишемии и реперфузии в течение 12 часов в мышечной ткани повсеместно отмечается потеря поперечной исчерченности мышечными клетками; значительное их количество имеет гомогенизованную просветленную цитоплазму, по сравнению с относительно сохранными клетками, и признаки отека. У достаточно большого числа клеток наблюдается фрагментация, распад и лизис цитоплазмы, что ведет к распаду и мышечных волокон, порой с формированием «булавовидных» утолщений на концах фрагментов (рис 5). Ядра в таких клетках либо отсутствуют, либо бледно окрашиваются и увеличены в размерах. Мышечные волокна раздвинуты отеочной жидкостью. Количество и размеры кровоизлияний практически не отличаются от таковых во второй группе. Однако значительное число сосудов, достаточно большого калибра, выглядят заустевшими, а капиллярное русло по-прежнему с резко выраженными признаками гиперемии. Также наблюдается увеличение проявлений отека тканей с дальнейшим разволокнением мышечных волокон (Рис.6).

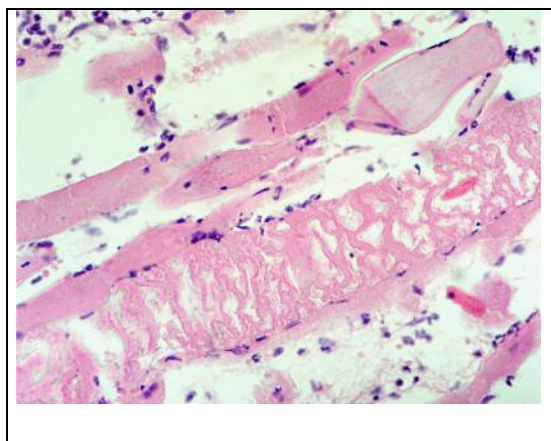


Рис.5. Распад мышечных волокон с формированием «булавовидных» утолщений на концах фрагментов. Гематоксилин-эозин. Увеличение x40.

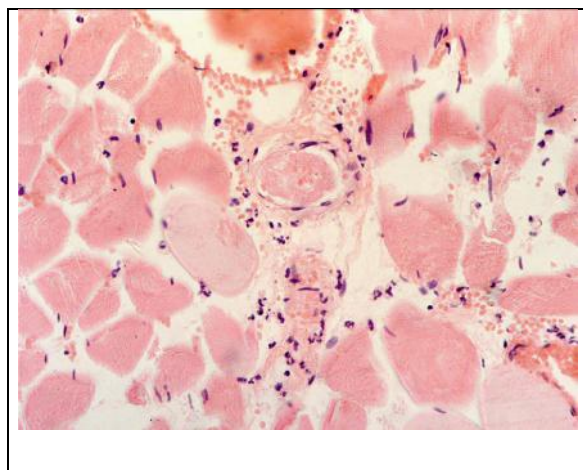


Рис. 6. Отека ткани разволокнением мышечных волокон. Гематоксилин-эозин. Увеличение x40.

Количество сосудов с фибриновыми тромбами в их просвете несколько снижается, однако остаётся достаточно большим. Воспалительная реакция, наоборот, усиливается. Экссудат носит гнойный характер, принимая характер флегмонозного воспаления, в то время как во второй группе клетки воспаления располагались преимущественно по ходу сосудов. Более выражен, по сравнению со второй группой, дисбаланс неспецифической протеиназ-ингибиторной системы мышечной ткани. Наблюдается дальнейший рост неспецифических протеиназ и снижение их ингибиторов.

В четвертой группе экспериментальных животных, подвергшихся шестичасовой ишемии с 24-часовой реперфузией, отмечается дальнейшее прогрессирование некротически-деструктивных изменений мышечной ткани. Мышечные волокна выглядят набухшими, цитоплазма в большинстве клеток гомогенизована, с фрагментацией и распадом на отдельные глыбки или же отмечается разволокнение, за счет выраженного отёка, междисковых пространств и тогда они выглядят в виде «перьев». Ядра мышечных клеток практически

повсеместно отсутствуют. Отмечается снижение и числа клеток-сателлитов. Увеличивается количество разрывов мышечных волокон (Рис.7). В данных зонах расходящиеся фрагменты волокон утолщаются и несколько сильнее прокрашиваются эозином. Степень межклеточного отека возрастает, а воспалительные изменения остаются практически на прежнем уровне; в экссудате по-прежнему преобладают нейтрофильные лейкоциты (Рис.8).

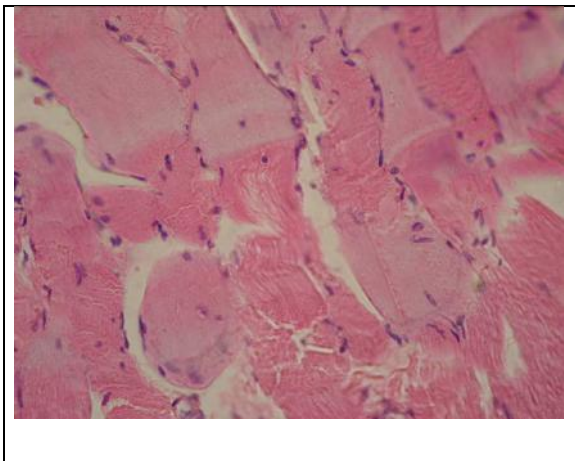


Рис.7. Мышечные волокна набухшие, цитоплазма гомогенизирована. Отёк междисковых пространств и тогда они выглядят в виде «перьев». Множественные разрывы мышечных волокон. Гематоксилин-эозин. Увеличение х40.

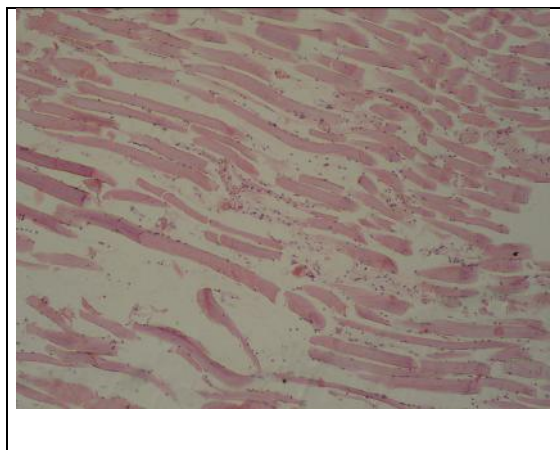


Рис.8. Межклеточного отек. Множественные нейтрофильные лейкоциты. Гематоксилин-эозин. Увеличение х10.

Дисбаланс протеиназ-ингибиторной системы в данной группе животных проявляется максимально выраженным дефицитом активности ингибиторов неспецифических протеиназ мышечной ткани.

Гиперемия капиллярного русла по-прежнему резко выражена, хотя, на первый взгляд, расширение капиллярного русла связано в большей степени с увеличением количества плазмы в их просветах, чем с увеличением количества клеток крови. Более крупные сосуды, на разных участках, выглядят то запустевшими, то – полнокровными.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при экспериментальном синдроме ишемии-реперфузии в мышечной ткани имеет место исчезновение поперечной исчерченности, внутриклеточный отек, выраженные в разной степени признаки некроза, воспалительная реакция с преобладанием в экссудате нейтрофильных гранулоцитов. Степень выраженности данных изменений напрямую зависит от времени реперфузии, что проявляется истощением ингибиторного потенциала неспецифических протеиназ мышечной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальное моделирование синдрома ишемии-реперфузии выявило некротически-деструктивные изменения мышечной ткани, степень выраженности которых нарастает в зависимости от времени развития реперфузии.
2. Выявленные морфологические изменения мышечной ткани сопровождаются дисбалансом местной неспецифической протеиназ-ингибиторной системы, который проявляется ростом активности неспецифических протеиназ и угнетением локальных антипротеиназ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белевитин А.Б., Шанин В.Ю., Цыган В.Н. Ишемически-реперфузионные повреждения клеток тканей и всего организма. // Клинико-патологический журнал. – 2007. - N 1-2. – С. 3-11.
2. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (Методичні рекомендації) / Кубышкін А.В., Харченко В.З., Семенець П.Ф., Алиев Л.Л., Фомочкіна І.І., Анисимова Л.В. - Київ 2010-28с.
3. Holmberg A., Sandhagen B., Bergqvist D. Hemorheologic variables in critical limb ischemia before and after infrainguinal reconstruction // J Vase Surg. -2000.-V. 31.- P. 691-695.
4. Narula J., Nicol P.D, O'Donnell S.O. Documentation of experimental myocardial reperfusion injury by pre- and postreperfusion antimyosin antibody imaging // Circulation. 1990. - V. 82, Suppl III. - P.288 A.
5. Sabido F, Milazzo V.J, Hobson R.W.II, Duran W.N. Skeletal muscle ischemia-reperfusion injury: a review of endothelial cell-leukocyte interaction // J Invest Surg. 1994. - V.7. - P. 39-47.
6. Schoots I.G. Local intravascular coagulation and fibrin deposition on intestinal ischemia-reperfusion in rats / Schoots I.G., Levi M., Roossink E.H. et al. // Surgery. 2003. - Vol. 133, №4. -P.411-419.
7. Sternbergh W.Ch.III, Sobel M., Makhoul R.G. Heparinoides with low anticoagulation activity diminishes postischemic endothelial cells dysfunction // J Vase Surg. 1995. - V.21, №3. -P. 477-483.
8. Wu Z.K., Jivainen T., Pehkonen et al. Ischemie preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization. // Circulation. – 2002. – Vol. 106. –P.3091-3096.