

Т. Р. Ковригина

Гистохимическая активность некоторых ферментов в функционально различных мышцах после неонатального введения капсаицина

Целью исследования явилось выявление активности никотинадениндинуклеотидН – диафоразы (НАДН-диафоразы) в функционально различных мышцах голени деафферентированных белых крыс. Изучены икроножная, подошвенная и камбаловидная мышцы у 72 белых крыс с 14 до 180-суточного возраста. Типирование мышечных волокон проводилось по выраженности гистохимической активности НАДН – диафоразы. В результате исследования было установлено, что при нарушении чувствительной иннервации изменяются активность и сроки стабилизации топографии мышечных волокон с различной активностью ферментов.

Ключевые слова: деафферентация, мышечное волокно, никотинадениндинуклеотидН – диафораза.

T. R. Kovrigina

Histochemical Activity of Some Enzymes in Functionally Different Muscles after Neonatal Introduction of Capsaicin

The research objective was to define activity of nicotinadeninucleotideN – diaphorase (NADN-diaphorase) in functionally different muscles of the crus of deafferented white rats. The gastrocnemius, plantar and salens muscles of 72 white rats from 14 to 180-days old were studied. Typing of muscular fibers was carried out due to expressiveness of the histochemical activity of NADH – diaphorase. As the result of the research it was determined that at disturbance of a sensitive innervation the activity and terms of stabilization of topography of muscular fibers with the different activity of enzymes are changed.

Keywords: deafferentation, a muscular fiber, nicotinadeninucleotideN – diaphorase.

Введение

Изучение закономерностей постнатальной дифференцировки и формирования дефинитивного строения на различных уровнях организации живой материи остается актуальной и наиболее плодотворной целью научных исследований морфологического плана. Различные виды деафферентации в мышце вызывают в принципе однотипный процесс, сходный со структурными изменениями в других деафферентированных органах [3]. Гистохимически установлено снижение активности ферментов тканевого дыхания, особенно в красных мышечных волокнах. Гликолитические процессы в этих условиях проявляют большую устойчивость [4]. В последние годы в целях нарушения афферентного звена рефлекторной дуги применяется химическая деафферентация, позволяющая изучить различные органы и избежать небезразличной при трактовке результатов тяжелой хирургической травмы и осложнений. В качестве препарата применяется капсаицин, обладающий селективным цитолитическим действием на чувствительные нейроны [5]. Влияние капсаицина на становление гистохимического

спектра мышечных волокон функционально различных мышц в постнатальном онтогенезе изучено недостаточно.

Цель исследования: выявить становление активности никотинадениндинуклеотид Н-диафоразы (НАДН-диафоразы) в функционально различных мышцах голени интактных и деафферентированных белых крыс.

Материал и методы исследования

Исследование проведено на 72 белых беспородных крысах с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Крысы были разделены на две группы: контрольную (n=36) и подопытную (n=36). Деафферентация достигалась однократным внутрибрюшинным введением 2-суточным крысятам капсаицина (N-vanillylonamide, Sigma) из расчета 100 мг на 1кг массы, растворенного в наполнителе (твин-80, 96 % этиловый спирт, 0,9 % раствор NaCl) в соотношении 1:1:8), что приводит к гибели до 50 % чувствительных нейроцитов [6,8,9].

Подопытных и интактных животных выводили из эксперимента в 14-, 21-, 30-, 60-, 90- и 180-суточном возрасте. В каждом указанном возрасте

контрольной и подопытной групп крыс были исследованы по 6 самок. Объектом исследования служили медиальная головка быстрой окислительно-гликолитической икроножной мышцы, гликолитическая подошвенная, медленная окислительная камбаловидная мышцы.

Свежезамороженные мышцы в криостате разлагали на срезы толщиной 8 мкм. Типирование мышечных волокон (МВ) проводилось по результатам оценки гистохимической активности НАДН-диафоразы [производитель Bio-Optica, Milano]. Мышечные волокна по выраженности активности НАДН-диафоразы подразделяли на волокна с высокой, промежуточной и низкой активностью фермента.

Качественно оценивали топографию мышечных волокон с разной активностью фермента на поперечном сечении мышцы и процентное содержание типов мышечных волокон. Методом прямой морфометрии определяли диаметр мышечных волокон.

Результаты

В 14-суточном возрасте изучаемые скелетные мышцы интактных животных, типированные по активности НАДН-диафоразы представлены гетерогенными по гистохимическим свойствам мышечными волокнами. В составе всех изученных мышц в этом возрасте преобладали волокна с промежуточной активностью фермента (в подошвенной – 71,60±1,73 %, в икроножной – 56,60±7,76 %, в камбаловидной – 82,20±0,82 %). Камбаловидная мышца отличалась низким процентом волокон с высокой активностью фермента и отсутствием волокон с низкой активностью НАДН-диафоразы. Максимальное процентное содержание волокон с низкой активностью фермента обнаружено в икроножной мышце (83,19±2,15 %).

Изменение спектра МВ, типированных по активности НАДН-диафоразы характеризовалось уменьшением доли волокон с высокой активностью фермента до 30-суточного возраста, а затем – стабилизировалось. Доля мышечных волокон с промежуточной активностью НАДН-диафоразы, максимальная в 14-суточном возрасте, уменьшалась до 60-суточного возраста в икроножной и подошвенных мышцах и в дальнейшем спектр МВ стабилизировался. В камбаловидной мышце процент волокон с промежуточной активностью НАДН-диафоразы возрастал до 60-суточного возраста, а затем стабилизировался. Процент мышечных волокон с низкой активностью фермента в икроножной и подошвенных мышцах возрастал.

Стабилизация показателя отмечена с 60-суточного возраста. В камбаловидной мышце во все исследуемые сроки не обнаруживались мышечные волокна с низкой активностью НАДН-диафоразы.

В возрасте 14 суток МВ с высокой активностью фермента располагались группами по 2–5 волокон в центральной части и в краевой зоне. В подошвенной мышце – небольшими группами (2–3 волокна), иногда изолированно и в центральной части и в краевой зоне. Во всех исследуемых мышцах в постнатальном онтогенезе отмечена смена группового расположения МВ с высокой активностью НАДН-диафоразы на преимущественно изолированное. Стабилизация топографии МВ отмечена в икроножной и подошвенной мышцах в 90-суточном возрасте, а в камбаловидной с 60-суточного.

В 14-суточном возрасте изученные мышцы с разной активностью НАДН-диафоразы различались и по диаметру мышечных волокон. Волокна с высокой гистохимической активностью НАДН-диафоразы имели меньший диаметр по сравнению с диаметром волокон с низкой и промежуточной активностью. В 14-суточном возрасте наименьший средний диаметр имела икроножная мышца (13,89±0,14 мкм), максимальный – камбаловидная (17,29±0,16 мкм), промежуточное положение занимала подошвенная мышца (14,75±0,18 мкм). Волокна с одинаковой гистохимической активностью из трех мышц имели наибольший диаметр в камбаловидной мышце. Такая закономерность прослеживалась на протяжении всего наблюдения.

Наибольшие темпы прироста характеризовали период с 14 по 30 сутки после рождения (56,54 %, 68,19% в подошвенной и камбаловидной соответственно). С 60 по 90 сутки темпы прироста уменьшались в подошвенной и камбаловидных мышцах, составляя 22,09 %, 20,12 % соответственно, и после 90 суток темпы прироста составили не более 4–6 % в месяц, что позволяет говорить об относительной стабилизации диаметра мышечного волокна. В икроножной мышце максимальные темпы прироста отмечены с 14 по 60-суточный возраст (132,76 %), а позднее отмечена стабилизация прироста среднего диаметра мышечного волокна (прирост составил 5,97–5,25 % в месяц).

Анализ темпов прироста диаметра разных по активности мышечных волокон выявил следующие закономерности независимо от активности НАДН-диафоразы: наибольший темпы прироста диаметра отмечены с 14 по 30 сутки после рождения, с 30 по 90 сутки темпы прироста замедлялись и после 90 суток – стабилизировались.

С 14 по 30 сутки наибольшие темпы прироста диаметра имели мышечные волокна подошвенной мышцы.

С 30 по 90 сутки более высокие темпы прироста имели волокна икроножной мышцы. Причем в сопоставимые сроки наибольшие темпы прироста характеризовали мышечные волокна, проявляющие наименьшую гистохимическую активность фермента, наименьшие темпы прироста диаметра характеризовали волокна, проявляющие наибольшую гистохимическую активность на НАДН-диафорузу.

Неравномерный рост мышечных волокон с различной гистохимической активностью НАДН-диафоразы сопровождался углублением по диаметру. К 90 суткам в волокнах с крайним типом реакции разница в диаметре достигала 66 % (подошвенная мышца), «однотипные» волокна в камбаловидной мышце были всегда больше по диаметру.

В целом за период наблюдения в подошвенной и икроножной мышце отмечалось увеличение доли МВ с низкой активностью НАДН-диафоразы при одновременном уменьшении доли мышечных волокон с промежуточной активностью фермента.

Наиболее глубокая трансформация спектра мышечных волокон, типированных по активности НАДН-диафоразы отмечалась в подошвенной мышце. В камбаловидной мышце волокна с низкой активностью фермента не выявлялись на протяжении всего наблюдения.

Таким образом, во всех исследуемых мышцах с возрастом отмечена смена группового расположения МВ с высокой активностью НАДН-диафоразы на преимущественно изолированное. Стабилизация топографии мышечных волокон отмечена в икроножной и подошвенной с 90-суточного возраста, а в камбаловидной с 60-суточного возраста.

В подошвенной и в белой части икроножной мышцы расстояние между мышечными волокнами с высокой активностью фермента составляло от 1 до 4 диаметров и с возрастом практически не изменялось. В камбаловидной мышце расстояние между волокнами с высокой активностью НАДН-диафоразы и в красной части икроножной мышцы также с возрастом практически не изменяется, но расстояние между волокнами с высокой активностью фермента составляло в среднем 2 диаметра.

В целом постнатальная дифференцировка скелетных мышц характеризовалась в подошвенной и икроножной мышцах увеличением доли мышечных волокон с низкой активностью НАДН-диафоразы при одновременном уменьшении доли волокон с промежуточной активностью фермента. В камбаловидной мышце спектр мышечных волокон практически не изменялся. Состав мышечных волокон, типированных по активности НАДН-диафоразы во всех трех мышцах стабилизировался к 60-суточному возрасту. Во всех трех мышцах выявлена устойчивая тенденция к незначительному снижению доли волокон с высокой активностью НАДН-диафоразы.

Дифференцировка МВ по активности НАДН-диафоразы деафферентированных животных характеризовалась той же направленностью, что и в контрольном исследовании. Отмечено изменение топографии и процентного соотношения МВ по активности ферментов.

У деафферентированных животных в 14-суточном возрасте по сравнению с интактными обнаружено меньшее количество МВ с промежуточной активностью фермента. В камбаловидной мышце выявлены волокна с низкой активностью фермента, не характерные для нормы (таблица 1, 2, 3).

Таблица 1. Процентное содержание мышечных волокон типированных по активности НАДН-диафоразы в икроножной мышце

Мышцы		Возраст (сутки)					
		14	21	30	60	90	180
+++*	Норма	25,33±2,20	22,16±1,16	21,37±1,76	20,74±2,11	20,32±2,26	21,80±1,27
	Деафф	16,51±0,88	18,49±1,99	26,09±2,77	24,56±1,72	20,79±2,48	18,01±1,91
++	Норма	56,80±7,76	59,20±4,30	52,60±1,53	37,78±2,02	35,44±3,10	25,43±1,71
	Деафф	42,34±2,27	39,81±1,58	32,49±1,94	28,79±1,86	19,73±1,37	17,38±1,38
+	Норма	17,87±6,34	18,64±4,27	26,03±1,88	41,48±1,30	44,24±3,29	52,68±1,58
	деафф	41,15±2,68	41,70±3,29	41,42±2,01	46,65±2,01	59,48±1,54	64,61±1,98

* – выраженность активности фермента: +++ – высокая, ++ – промежуточная, + – низкая.

Таблица 2. Процентное содержание мышечных волокон типированных по активности НАДН-диафоразы в подошвенной мышце

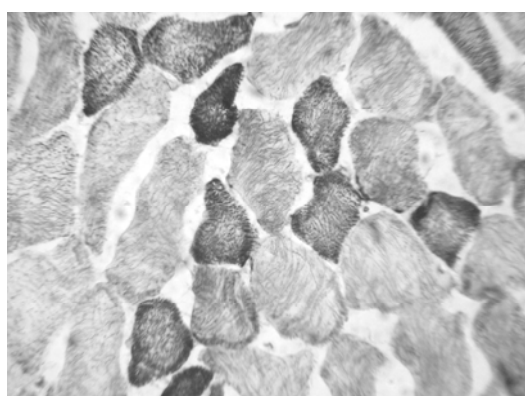
Мышцы		Возраст (сутки)					
		14	21	30	60	90	180
+++	Норма	26,53±2,36	24,77±1,94	24,62±1,08	24,69±1,84	24,41±1,69	21,57±2,22
	Деафф	29,16±1,99	30,30±1,86	28,31±1,94	26,89±1,33	20,37±2,33	16,47±1,06
++	Норма	71,60±1,73	57,08±2,26	35,96±1,80	32,72±1,26	32,14±1,57	22,00±1,49
	Деафф	47,73±2,25	44,52±1,92	33,38±1,22	31,23±1,99	30,47±1,68	24,68±1,59
+	Норма	1,87±2,05	18,15±2,69	39,42±1,70	42,59±2,11	43,45±2,35	56,43±2,76
	деафф	23,11±2,45	25,18±1,99	38,31±1,31	41,88±2,55	49,16±2,32	58,85±2,14

* – выраженность активности фермента: +++ – высокая, ++ – промежуточная, + – низкая.

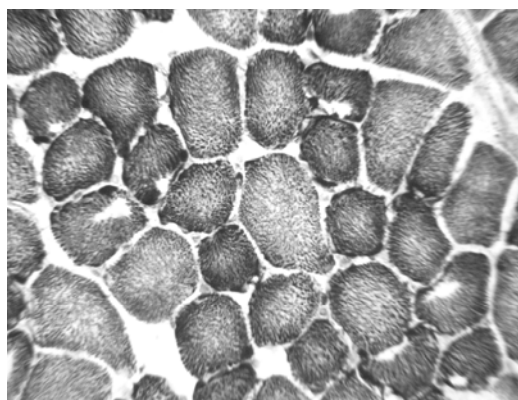
Таблица 3. Процентное содержание мышечных волокон типированных по активности НАДН-диафоразы в камбаловидной мышце

Мышцы		Возраст (сутки)					
		14	21	30	60	90	180
+++	Норма	17,80±0,82	17,15±1,26	14,85±1,15	12,75±0,68	12,66±1,32	11,67±2,73
	Деафф	23,70±2,25	21,63±1,41	15,82±0,73	14,66±1,09	13,99±1,89	13,06±2,35
++	Норма	82,20±0,82	82,85±1,26	85,15±3,89	87,25±2,39	87,34±1,78	88,33±3,79
	Деафф	69,16±3,19	75,69±2,47	84,18±0,73	85,34±1,09	86,01±1,89	86,94±2,35
+	Норма	–	–	–	–	–	–
	деафф	7,14±2,16	2,68±1,23	–	–	–	–

* – выраженность активности фермента: +++ – высокая, ++ – промежуточная, + – низкая.



а



б

Рис. 2. Микрофото. Гистохимический метод выявления активности никотинамиддинуклеотидН-диафоразы в мышечных волокнах. Групповое расположение МВ с высокой активностью НАДН-диафоразы.

а. Икроножная мышца. Возраст 180 суток. Интактное животное.

б. Икроножная мышца после химической деафферентации. Возраст 60 суток

Диаметр МВ, типированных по активности НАДН-диафоразы в этом возрасте в икроножной и подошвенной мышцах был достоверно выше ($p < 0,05$), чем у интактных крыс. В камбаловидной мышце обнаружено увеличение диаметра волокон с высокой активностью фермента $17,14 \pm 0,19$ мкм (контроль $15,83 \pm 0,21$ мкм). МВ с промежуточной активностью практически не различались с интактными животными.

Диаметр МВ с высокой и промежуточной активностью НАДН-диафоразы во всех исследуемых мышцах превышал значения интактных животных с 14- до 21-суточного возраста и с 60-суточного возраста до конца исследования

(рис. 2). Диаметр МВ с низкой активностью фермента в подошвенной мышце был выше контрольных значений с 60-суточного возраста, а в икроножной – во все сроки исследования.

У деафферентированных животных изменяется динамика прироста диаметра мышечных волокон с различной активностью фермента. Во всех мышцах изменяется динамика прироста диаметра волокон, типированных по активности НАДН-диафоразы. Отмечено превышение темпов прироста диаметра в икроножной мышце с 60- до 90-суточного возраста, в подошвенной – с 30- до 60-суточного возраста, в камбаловидной мышце более высокие темпы прироста волокон с высокой

активностью фермента отмечены с 14- до 90-суточного возраста, а с промежуточной активностью – с 30- до 90-суточного возраста.

Обсуждение результатов

В результате проведенного исследования было установлено, что при нарушении чувствительной иннервации, как и у интактных животных сохраняется стадийность и сопряженность развития некоторых показателей.

С 14 по 30 сутки постнатальной жизни: выявлена дифференцировка МВ по активности НАДН-диафоразы.

Необычным является более медленное, чем у интактных животных формирование МВ с преимущественно аэробным типом окисления; больший диаметр одноименных МВ во все сроки исследования. Камбаловидная мышца, в отличие от икроножной и подошвенной более однородна по составу МВ, типированных по активности НАДН-диафоразы (7), с 21-суточного возраста больший диаметр, чем в контроле. Число МВ после рождения в постнатальном периоде не изменяется. Увеличивается их диаметр и изменяется группировка уже существующих волокон, что согласуется с данными полученными Timson B. F. (12).

Больший диаметр МВ, вероятно можно объяснить гибелью чувствительных нейроцитов в ганг-

лиях крестцовых спинномозговых нервов, вызывающих в ткани-мишени развитие изменений, комплекс которых называют нейродистрофическим процессом (2, 3, 4), проявлением которого в мышцах является отек, а МВ набухают, поперечная исчерченность сохраняется (4). Возможно, следствием изменений в ткани-мишени является ускоренное развитие нейромышечных синапсов, размеры которых связаны с диаметром МВ (10).

Замедляется смена группового расположения МВ с высокой активностью НАДН-диафоразы во всех исследуемых мышцах. Следствием деафферентации является ускорение прироста диаметра МВ с различной активностью фермента с 30 до 90-суточного возраста (в контрольных исследованиях с 30 по 60 сутки).

Таким образом, следствием деафферентации в изученных мышцах является изменение активности ферментов тканевого дыхания, сроков стабилизации топографии МВ с различной активностью, что указывает на изменение метаболического профиля, что возможно связано с тем, что химическая деафферентация, осуществляемая введением капсаицина приводит к гибели преимущественно афферентных нейронов спинномозговых узлов (11) и повреждению эфферентной части рефлекторной дуги вследствие «дефицита афферентации».

Библиографический список

1. Валлиулин, В. В., Девятаев, А. М., Зизевский, С. А. Гипотериоз ослабляет развитие денервационных изменений в быстрой и медленной скелетных мышцах морской свинки [Текст] / В. В. Валлиулин, А. М. Девятаев, С. А. Зизевский // Морфология, 2009, Т.136, №4. – С. 27
2. Волкова, О. В. Нейродистрофические процессы (морфологические аспекты) [Текст] / О. В. Волкова – М.: Медицина, 1978. – С. 256
3. Данилов, Р. К. Гистогенетические основы нервно-мышечных взаимоотношений [Текст] / Р. К. Данилов – С.-Пб., 1996. – 132 с.
4. Данилова, Л. Я., Симеонова, Н. К. Влияние деафферентации на некоторые показатели энергетического обмена и реакции термогенеза в скелетных мышцах [Текст] / Л. Я. Данилова, Н. К. Симелнова // Патол., физиол. и Экспер. терапия. – 1978, №6. – С. 56–59
5. Махорт, Н. А. Капсаицин – физиологически активное вещество [Текст] / Н. А. Махорт // Эксперим. и клинич. фармакология – 1993. – №1. – С. 67–69
6. Порсева, В. В. Возрастные преобразования ядер спинного мозга и спинномозговых ганглиев в норме и в условиях химической деафферентации: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Ярославль, 2006
7. Рехачева, И. П. Возрастные особенности активности некоторых ферментов в развивающихся мышечных волокнах [Текст] / И. П. Рехачева // Арх. анат., 1980, Т.78, вып. 5. – С. 50–57
8. Румянцева, Т. А. Влияние химической денервации на нейроциты экстра- и интрамуральных ганглиев в постнатальном онтогенезе белой крысы: Автореф. докт. мед. наук. – С.-Пб., 2002. – 42 с.
9. Шилкин, В. В., Румянцева, Т. А., Ковригина, Т. Р., Филимонов, В. И. Влияние введения капсаицина на нейроциты спинномозговых ганглиев белой крысы [Текст] / В. В. Шилкин, Т. А. Румянцева, Т. Р. Ковригина, В. И. Филимонов // Рос. морфол. ведомости, 1999, №1 – 2. – С. 167–168
10. Шилкин, В. В., Филимонов, В. И. Зависят ли размеры нейромышечного синапса от диаметра мышечного волокна [Текст] / В. В. Шилкин, В. И. Филимонов // Российские морфологические ведомости, 1996. – №2 (5). – С.135–139
11. Bevan, S., Szolcsanyi, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications // Trends in Pharmacological sciences. – 1990. – V. 11, № 8. – P. 330–333
12. Timson, B. F., Dudenhoefter, G. A. Skeletal muscle fiber number rat from youth to adulthood // J. Anat. – 1990., V. 173. – P. 33–36

Bibliograficheskij spisok

1. Valliulin, V. V., Devjataev, A. M., Zizevskij, S. A. Gipoterioz oslabljaet razvitie denervacionnyh izmenenij v bystroj i medlennoj skeletnyh myshchah morskoy svinki [Tekst] / V. V. Vallilulin, A. M. Devjataev, S. A. Zizevskij // Morfologija, 2009, T.136, №4. – S. 27
2. Volkova, O. V. Nejrodistoficheskie processy (morfologicheskie aspekty) [Tekst] / O. V. Volkova – M.: Medicina, 1978. – S. 256
3. Danilov, R. K. Gistogeneticheskie osnovy nervno-myshechnyh vzaimootnoshenij [Tekst] / R. K. Danilov – S.-Pb., 1996. – 132 s.
4. Danilova, L. Ja., Simeonova, N. K. Vlijanie deafferentacii na nekotorye pokazateli jenergetiche-skogo obmena i reakcii termogeneza v skeletnyh myshchah [Tekst] / L. Ja. Danilova, N. K. Simelnova // Patol., fiziol. i jeksper. terapija. – 1978, №6. – S. 56–59
5. Mahort, N. A. Kapsaicin – fiziologicheskij aktivnoe veshhestvo [Tekst] / N. A. Mahort // Jeksperim. I klinich. farmakologija – 1993. – № 1. – S. 67–69
6. Porseva, V. V. Vozrastnye preobrazovanija jader spinного mozga i spinnomozgovyh gangliev v norme i v uslovijah himicheskoy deafferentacii: Avtoref. diss.... kand. med. nauk. Jaroslavl', 2006
7. Rehacheva, I. P. Vozrastnye osobennosti aktivnosti nekotoryh fermentov v razvivajushhihsja myshechnyh voloknah [Tekst] / I. P. Rehacheva // Arh. anat, 1980, T.78, vyp. 5. – S. 50–57
8. Rumjanceva, T. A. Vlijanie himicheskoy denervacii na nejrocitnyh jekstra- i intramural'nyh gangliev v postnatal'nom ontogeneze beloj kryse: Avtoref... dokt. med. nauk. – S.-Pb., 2002. – 42 s.
9. Shilkin, V. V., Rumjanceva, T. A., Kovrigina, T. R., Filimonov, V. I. Vlijanie vvedenija kapsaicina na nejrocitnyh spinnomozgovyh gangliev beloj krysy [Tekst] / V. V. Shilkin, T. A. Rumjanceva, T. R. Kovrigina, V. I. Filimonov // Ros. morfol. vedomosti, 1999, № 1 – 2. – S. 167–168
10. Shilkin, V. V., Filimonov, V. I. Zavisjat li razmery nejromyshechnogo sinapsa ot diametra myshechnogo volokna [Tekst] / V. V. Shilkin, V. I. Filimonov // Rossijskie morfologicheskie vedomosti, 1996. – №2 (5). – S.135–139
11. Bevan, S., Szolcsanyi, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications // Trends in Pharmacological sciences. – 1990. – V. 11, № 8. – R. 330–333
12. Timson, B. F., Dudenhoefter, G. A. Skeletal muscle fiber number rat from youth to adulthood // J. Anat. – 1990., V. 173. – P. 33–36