

Т. Р. Ковригина

Дифференцировка функционально различных скелетных мышц голени после неонатальной химической деафферентации

Целью исследования явилось выявление активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) 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 СДГ. 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, сукцинатдегидрогеназа.

T.R.Kovrigina

Differentiation of Functionally Different Skeletal Muscles of the Crus after Neonatal Chemical Deafferentation

The research objective was to define activity of succinate dehydrogenase (SDG) 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 SDG. 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, succinate dehydrogenase.

Введение

Анализ результатов различных видов деафферентации показал, что в мышце развивается в принципе однотипный процесс, сходный со структурными изменениями в других деафферентированных органах [3]. При деафферентации задней конечности белой крысы путем иссечения чувствительных спинномозговых узлов отмечается: гиперемия, отек мышцы, постепенное нарастание воспалительной реакции, нарастание инфильтрации лейкоцитами, появление небольших очагов денервации мышечного волокна [4]. Капсаицин, обладающий селективным цитолитическим действием на чувствительные нейроны, позволяет изучить различные органы в условиях химической деафферентации и избежать небезразличной при трактовке результатов тяжелой хирургической травмы и осложнений. Влияние капсаицина на становление гистохимического спектра мышечных волокон функционально различных мышц в постнатальном онтогенезе изучено недостаточно.

Цель исследования: выявить становление активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) 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 1 кг 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.

Свежемороженые мышцы в криостате разлагали на срезы толщиной 8 мкм. Типирование

мышечных волокон (МВ) проводилось по результатам оценки гистохимической активности СДГ [5]. Мышечные волокна по выраженности активности СДГ 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 СДГ представлены гетерогенными по гистохимическим свойствам мышечными волокнами. В икроножной и подошвенной мышцах преобладали волокна с низкой активностью СДГ ($83,19 \pm 2,15$ % и $77,42 \pm 3,04$ % соответственно). Камбаловидная мышца отличалась от икроножной и подошвенной мышц большим процентом волокон с высокой и промежуточной активностью СДГ ($15,59 \pm 2,25$ и $65,04 \pm 4,43$ %). В этом возрасте в подошвенной мышце не выявлялись мышечные волокна с высокой активностью фермента.

С 14-х суток постнатальной жизни отмечено увеличение доли волокон с высокой активностью СДГ в икроножной и подошвенной мышцах до 60-суточного возраста и затем стабилизация, тогда как в камбаловидной мышце их доля практически не изменялась на протяжении исследования. Доля мышечных волокон с низкой активностью СДГ наибольшая в 14-суточном возрасте во всех изученных мышцах уменьшалась до 30-суточного возраста и затем стабилизировалась. В камбаловидной мышце мышечные волокна с низкой активностью СДГ начиная с 30-х суток постнатального развития не выявлялись. Стабилизация процента мышечных волокон с промежуточной активностью СДГ наблюдалась в икроножной мышце с 21-суточного возраста, а в камбаловидной – с 30-суточного.

Темпы перестройки спектра МВ уменьшались к 30-суточному возрасту и в дальнейшем типовой состав мышечных волокон практически не изменялся. С возрастом в подошвенной и белой части икроножной мышцы групповое расположение МВ с высокой активностью СДГ меняется на преимущественно изолированное. В камбаловидной и красной части икроножной мышцы

сохраняется групповое расположение МВ с высокой активностью фермента, но количество волокон в группе уменьшалось с 3–4 до 2.

В 14-суточном возрасте изученные мышцы с разной активностью СДГ различались и по диаметру мышечных волокон. Мышечные волокна с высокой активностью всегда меньше по диаметру ($10,72 \pm 0,44$ мкм и $14,12 \pm 0,14$ мкм в икроножной и камбаловидной соответственно), чем волокна с промежуточной ($12,73 \pm 0,22$; $11,62 \pm 0,19$ и $15,28 \pm 0,09$ мкм в подошвенной, икроножной и камбаловидной) и низкой ($13,46 \pm 0,09$; $11,60 \pm 0,09$ и $14,78 \pm 0,21$ мкм в подошвенной, икроножной и камбаловидной мышцах) активностью ферментов. Камбаловидная мышца отличалась наибольшим диаметром среди волокон с одинаковой гистохимической активностью.

Различие в диаметре между мышечными волокнами с различной выраженностью активности СДГ в различных скелетных мышцах, выявляемое у интактных животных в ранние сроки с возрастом нивелировалось, и, начиная с 90-х суток в сопоставимые сроки, мышечные волокна с одинаковой активностью СДГ независимо от исследуемой мышцы, имели равный диаметр.

Во всех исследуемых мышцах наибольший темп прироста диаметра МВ отмечался до 60-суточного возраста. С 60- по 90-суточный возраст темпы роста замедляются, и, начиная с 90-х суток после рождения, отмечена относительная стабилизация темпов роста. Вероятно, разница в среднем диаметре мышечного волокна, оцениваемая в мышце в целом, в более поздние сроки определяется различным соотношением типов мышечных волокон, имеющих разный диаметр самого волокна. При этом мышечное волокно с низкой выраженностью активности СДГ имеет самый большой диаметр, а мышечное волокно с высокой активностью СДГ – самый малый.

В целом постнатальная дифференцировка скелетной мышцы характеризовалась увеличением доли волокон с высокой и промежуточной активностью СДГ и уменьшением доли волокон с низкой активностью СДГ.

Дифференцировка МВ по активности СДГ и 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 выявлен больший процент МВ с промежуточной активностью СДГ в икроножной и подошвенной мышцах. В подошвенной мышце не вы-

явлены МВ с высокой активностью фермента. Камбаловидная мышца отличалась меньшим процентом волокон с высокой и промежуточной активностью (табл. 1, 2, 3).

Таблица 1. Процентное содержание мышечных волокон, типированных по активности СДГ в икроножной мышце

Мышцы		Возраст (сутки)					
		14	21	30	60	90	180
+++*	Норма	3,89±0,56	10,08±3,43	18,29±3,19	24,41±1,96	27,51±2,66	27,24±1,48
	Деафф	9,37±2,50	13,94±1,20	15,04±1,01	16,40±1,18	16,73±2,11	17,32±3,67
++	Норма	12,92±2,21	35,56±4,99	40,37±4,13	36,93±2,31	31,36±2,15	34,32±1,83
	Деафф	40,76±4,09	36,83±3,11	34,52±2,92	33,28±1,72	32,27±2,71	36,13±3,72
+	Норма	83,19±2,15	54,36±4,49	41,34±3,46	38,66±1,90	41,14±1,97	38,44±1,59
	деафф	49,87±5,02	49,23±3,18	50,44±3,20	50,32±1,43	51,00±3,96	46,55±3,85

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

Таблица 2. Процентное содержание мышечных волокон типированных по активности СДГ в подошвенной мышце

Мышцы		Возраст (сутки)					
		14	21	30	60	90	180
+++	Норма	–	2,54±1,20	16,92±1,40	25,13±1,02	18,88±1,55	19,20±1,45
	Деафф	–	7,76±1,91	14,60±1,20	16,66±1,06	18,22±2,52	18,83±1,25
++	Норма	22,39±3,08	26,67±3,63	34,69±2,26	29,02±2,30	25,69±1,63	24,43±1,87
	Деафф	32,25±1,86	24,74±1,10	24,52±1,82	23,08±1,75	25,94±1,73	38,58±2,25
+	Норма	77,61±3,04	70,79±5,18	48,39±2,05	45,85±2,55	55,43±2,43	56,37±2,22
	деафф	67,75±1,86	67,50±1,59	60,88±1,86	60,26±1,63	55,84±2,14	42,59±2,64

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

Таблица 3. Процентное содержание мышечных волокон, типированных по активности СДГ в камбаловидной мышце

Мышцы		Возраст (сутки)					
		14	21	30	60	90	180
+++	Норма	15,59±2,55	11,30±0,96	17,50±1,59	18,14±1,36	12,63±0,79	12,48±6,75
	Деафф	4,38±2,24	13,35±1,72	19,01±1,52	23,64±1,27	16,04±1,20	16,69±53,74
++	Норма	65,04±4,43	76,46±1,51	82,50±1,94	81,86±1,36	87,37±0,94	87,52±6,75
	Деафф	19,03±2,34	86,65±1,55	81,16±1,55	76,36±1,27	83,96±1,20	83,31±2,74
+	Норма	19,37±2,36	12,24±1,73	–	–	–	–
	деафф	76,59±1,64	–	–	–	–	–

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

В период с 14 по 180-суточный возраст в икроножной и подошвенной мышцах не отмечено изменений в сроках стабилизации процента волокон, типированных по активности СДГ с высокой активностью фермента (60 суток). Однако в икроножной мышце с 30-суточного возраста отмечен больший процент МВ с низкой активностью фермента, а в подошвенной – до 90-суточного возраста. Особенностью дифференцировки камбаловидной мышцы является отсутствие с 21-суточного возраста мышечных волокон

с низкой активностью СДГ (контроль – 30-е сутки). Сроки стабилизации процента МВ с низкой активностью фермента соответствовали контрольным значениям. У деафферентированных животных отмечено изменение сроков стабилизации процента волокон с промежуточной активностью фермента в подошвенной и икроножной мышцах – 30-суточный возраст (контроль – 21-е сутки), в камбаловидной – 60-е сутки (контроль – 30-е сутки).

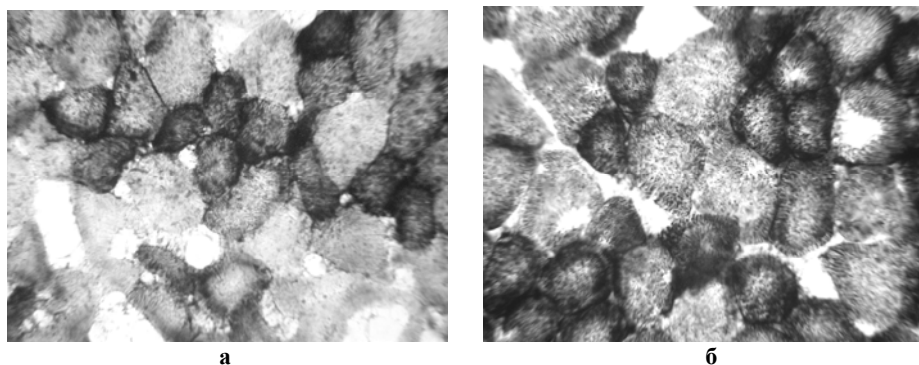


Рис. 1. Микрофото. Гистохимический метод выявления активности сукцинатдегидрогеназы в мышечных волокнах. Возраст 60 суток. а. Икроножная мышца интактное животное; б. Икроножная мышца после химической деафферентации

Для деафферентированных животных характерна более поздняя смена группового расположения МВ с высокой активностью СДГ на преимущественно изолированное в белой части икроножной мышцы в 180-суточном возрасте (контроль – 60-е сутки), в подошвенной и камбаловидной – в 90-суточном возрасте (контроль – 60-е сутки). Топография МВ с высокой активностью ферментов аналогична норме.

В 14-суточном возрасте у деафферентированных животных диаметр МВ с различной активностью СДГ в икроножной мышце был достоверно выше ($12,94 \pm 0,26$ мкм), чем у интактных крыс. В подошвенной мышце диаметр МВ с промежуточной активностью был достоверно ниже, а с низкой активностью не различался. В камбаловидной мышце существенных различий в диаметре МВ с различной активностью СДГ не обнаружено.

Диаметр МВ с высокой и промежуточной активностью СДГ во всех мышцах превышал значения контрольных исследований, но в икроножной мышце он был достоверно выше до 90-суточного возраста, а в подошвенной с 30-суточного возраста, в камбаловидной – с 21-суточного. Диаметр МВ с низкой активностью фермента в икроножной мышце во все сроки исследования ($p < 0,05$) превышал значения интактных животных (рис. 1), а в подошвенной – с 21-суточного возраста.

У деафферентированных животных изменяются динамика прироста диаметра мышечных волокон с различной активностью фермента. Во всех мышцах до 60-суточного возраста отмечены более высокие темпы прироста диаметра волокон с высокой промежуточной и низкой активностью СДГ.

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-е по 30-е сутки постнатальной жизни: выявлена дифференцировка МВ по активности СДГ.

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, отличающаяся от икроножной и подошвенной особенностью гистохимического спектра МВ; она более однородна по составу МВ, типированных по активности СДГ (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 V. F. (12).

Большой диаметр МВ, вероятно можно объяснить гибелью чувствительных нейроцитов в ганглиях 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 СДГ 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-е по 60-е сутки).

Таким образом, следствием деафферентации в изученных мышцах является изменение актив-

ности 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 вве-

дением 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. Женевская, Р. П. Нервно-трофическая регуляция пластической активности мышечной ткани [Текст] / Р. П. Женевская – М.: Наука, 1974. – 239 с.
5. Пирс, Э. Гистохимия / [Текст] Э. Пирс – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 962 с.
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 нейроны 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. [Текст] / В. В. Шилкин, Т. А. Румянцева, Т. Р. Ковригина, В. И. Филимонов – Влияние введения капсаицина на нейроны спинномозговых ганглиев белой крысы // 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

Bibliograficheskiy spisok

1. Valliulin, V. V., Devjataev, A. M., Zizevskij, S. A. Gipoterioz oslabljaet razvitie denervacionnyh izmenenij v bystroj i medlennoj skeletnyh myshchah morskoj svinki [Tekst] / V. V. Valliulin, 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-myshhechnyh vzaimootnoshenij [Tekst] / R. K. Danilov – S.-Pb., 1996. – 132 s.
4. Zhenevskaja, R. P. Nervno-troficheskaja reguljacija plasticheskoj aktivnosti myshechnoj tkani [Tekst] / R. P. Zhenevskaja – M.: Nauka, 1974. – 239 s.
5. Pirs, Je. Gistohimija / [Tekst] Je. Pirs – M.: Izd-vo inostrannoj literatury, 1962. – 962 s.
6. Porseva, V. V. Vostrastnye 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. Vostrastnye osobennosti aktivnosti nekotoryh fermentov v razvivajushhhsja myshechnyh voloknah [Tekst] / I. P. Rehacheva // Arh. anat.,

- 1980, T.78, vyp. 5. – S. 50–57
8. Rumjanceva, T. A. Vlijanie himicheskoy denervacii na nejrocity jekstra- i intramural'nyh gangliev v postnatal'nom ontogeneze belo j kryse: Avtoref... dokt. med. nauk. – S.-Pb., 2002. – 42 s.
9. Shilkin, V. V., Rumjanceva, T. A., Kovrigina, T. R., Filimonov, V. I. [Tekst] / V. V. Shilkin, T. A. Rumjanceva, T. R. Kovrigina, V. I. Filimonov – Vlijanie vvedenija kapsaicina na nejrocity spinnomozgovyh gangliev belo j krysy // 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 ve-domosti, 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