

Т.Я.Раскалей
В.Б.Раскалей
Л.Б.Шобат
Г.О.Гаврилюк-Скиба

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця
Київ

Ключові слова: спинний мозок, хреботно-спинномозкова травма, АТФ-аза, ЛДГ, нейротрофічний контроль.

Надійшла: 23.08.2016

Прийнята: 06.09.2016

УДК 616.833-003.93:57.012.4:616.441-008.96

ГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТУПОЇ ТРАВМИ СПИННОГО МОЗКУ

Реферат. З метою надання морфологічної характеристики адаптаційних можливостей скелетної м'язової тканини за умов порушення нейротрофічного контролю з боку спинного мозку після хреботно-спинномозкової травми був проведений експеримент на 10 білих лабораторних щурах-самцях масою 120-140 г. Піддослідні тварини були поділені на 2 групи. Проводилось гістохімічне дослідження чотириголового і великогомілкового м'язів задніх кінцівок щурів. Доведено, що навіть при короткочасному порушенні іннервації скелетних м'язів, в них дуже швидко розпочинаються біохімічні руйнівні процеси.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 243-247.

© Т.Я.Раскалей, В.Б.Раскалей, Л.Б.Шобат, Г.О.Гаврилюк-Скиба, 2016

✉ t_darmogray@ukr.net

Raskaliei T.Ya., Raskaliei, V.B., Shobat L.B., Gavriliuk-Skiba G.O. Histochemical study of skeletal muscles in experimental spinal cord blunt injury.

ABSTRACT. Background. Investigation of causes, frequency, clinical manifestations of spinal cord injury is necessary for the correct medical treatment, proper transport to the hospital, effective rehabilitation of the patient. **Objective.** To provide morphological characteristics of the adaptive capacities of skeletal muscle tissue in a neurotrophic violations of the spinal cord control after spinal cord injury. **Methods.** Under the influence of thiopental anesthesia laminectomy was performed with the following blunt trauma of the spinal cord using a "Device for modeling of the blunt tram of the spinal cord". The experimental animals (10 white laboratory rats) were divided into 2 groups. Histochemical study of the quadriceps and tibial muscles of hind rat limbs was performed. **Results.** In 1 hour after blunt injury next changes were documented: in skeletal muscle – dilatation of interstitial space between myosinplasts by swelling; lack of active movement in the skeletal muscle of the lower extremities by blocking the conduction of nervous impulses in nerve fibers; histochemical changes manifested in the form of migration of PAS-positive component of the sarcolemma in the interstitial space by increasing the permeability of the sarcolemma, reducing the activity of ATPase, increased acid phosphatase and accumulation of lactate dehydrogenase in the sarcolemma, confirming manifestation of degenerative changes in the myosinplast. **Conclusion.** Even short-term violation of the innervation of skeletal muscles leads to quick disruption of biochemical processes.

Key words: spinal cord, vertebral-spinal trauma, ATPase, LDH, neurotrophic control.

Citation:

Raskaliei TYa, Raskaliei VB, Shobat LB, Gavriliuk-Skiba GO. [Histochemical study of skeletal muscles in experimental spinal cord blunt injury]. *Morphologia.* 2016;10(3):243-7. Ukrainian.

Вступ

Травматичне пошкодження хребтового каналу і спинного мозку вирізняється серед інших травматичних уражень людського тіла особливою тяжкістю клінічних проявів і наслідків. Високий відсоток ймовірності виникнення максимально тяжких наслідків, таких як: загибель травмованого, інвалідизація, дають підстави присвоїти травмі хребта і спинного мозку найвищий рівень небезпечності. Щорічно в Україні близько 2500 постраждалих отримують травми спинного мозку. 87% з них – це особи працездатного віку, 80-85% з них залишаються інвалідами I та II груп [1]. Хреботно-спинномозкова травма – це найпоширеніша причина смерті людей, віком від

5 до 44 років у країнах, що розвиваються. Рівень смертності серед даної групи пацієнтів дорівнює 17%. Щороку фіксується 19-88 випадків переломів хребта на 100000 осіб і 14-53 випадків травм спинного мозку на 1000000 [2].

Наявність спинномозкової травми, в залежності від об'єму та локалізації враженої ділянки, може призвести до загибелі постраждалого, довічної втрати функцій, зниження якості життя. Пошкодження спинного мозку особливо небезпечне своїми наслідками, а саме: порушенням функцій нервової системи, як центральної, так і периферичної, дихальної та серцево-судинної [3]. Переломи хребта з пошкодженням спинного мозку і спинномозкових корінців виникають за

умов безпосередньої дії механічної сили (прямі пошкодження), при падінні з висоти (кататравма), при надмірному згинанні хребта (непрямі пошкодження), при пірнанні вниз головою. Безпосереднє пошкодження тканин є фактором, ініціюючим запуск низки гістохімічних процесів, спрямованих як на відновлення, так і на поглиблення деструктивних процесів у тканинах. Дослідження біохімічних змін при неврологічній патології є темою не новою, проте актуальною і нерозкритою досі [4]. Різноманітність патоморфологічних змін при хребетно-спинномозковій травмі обумовлена одночасним ураженням кісткової, нервової, сполучної і опосередковано м'язової тканин [5]. Слід зазначити, що міжтканинна взаємодія на органному і системному рівнях є запорукою відновлення гомеостазу, в разі порушення його рівноваги за умов травми [6]. Прогнозування структурно-функціонального відновлення скелетних м'язів за умов хребетно-спинномозкової травми потребує системного підходу до розгляду цієї проблеми, адже вивчення і оцінка адаптаційних можливостей м'язової скелетної тканини за умов нейротрофічного контролю з боку спинного мозку ґрунтується на знанні фізіологічної регенеративної спроможності скелетного м'язу [7]. Вивчення причини виникнення, частоти, клінічних проявів, характеру перебігу, закономірностей змін проявів наслідків хребетно-спинномозкової травми необхідне для коректного надання медичної допомоги, правильного транспортування на до госпітального етапі, планування лікування, реабілітаційних заходів задля підвищення ймовірності відновлення пошкодженого спинного мозку, хребтового стовпа, м'язів і скорочення реабілітаційного періоду від пошкодження до одужання.

Усе вищезазначене свідчить про актуальність вивчення процесів репаративної регенерації у скелетних м'язах за умов тупої травми спинного мозку.

Мета дослідження

Морфологічна характеристика адаптаційних можливостей скелетної м'язової тканини за умов порушення нейротрофічного контролю з боку спинного мозку після хребетно-спинномозкової травми.

Отримані дані можуть бути використані в клініках нейрохірургії, на кафедрах нейрохірургії медичних вищих навчальних закладів та медичної академії післядипломної освіти, а також в науково-дослідних лабораторіях.

Матеріали і методи

Аби мати змогу вивчити гістохімічні зміни у скелетній мускулатурі за умов порушення нейротрофічного контролю з боку спинного мозку, нами був здійснений експеримент на лабораторних тваринах за відомою методикою моделювання хребетно-спинномозкової травми [8]. Дослідження проводилось на 10 білих лабораторних

щурах-самцях масою 120-140 г, які перебували на стандартному раціоні харчування віварію НМУ імені О.О. Богомольця. Під тіопенталовим наркозом була проведена ламінектомія з наступним тупим травмуванням спинного мозку з використанням «Пристрою для моделювання тупої травми спинного мозку» [9]. Були визначені групи піддослідних тварин: після нанесення тупої травми і контрольна – ламінектомовані без травмування спинного мозку. Проводилось гістохімічне дослідження чотириголового і великогомілкового м'язів задніх кінцівок щурів, які отримують іннервацію від сегментів спинного мозку нижче рівня пошкодження в термін - 1 доба після травмування. Гістологічні зрізи м'язової тканини виготовлялись з використанням кріостату. Гістологічна обробка матеріалу проводилась за допомогою забарвлення зрізів гематоксилін-еозином, за методом ван Гізона. Нейтральні мукополісахариди виявлялись за допомогою ШИК-реакції. Кисла й лужна фосфатази виявлялись методом Гоморі. Активність аденозинтрифосфатази виявлялась за методом Вахштейна і Мейзеля. Для отримання порівняльних результатів всі гістохімічні реакції проводились з незмінними термінами фіксації й інкубації матеріалу. Мікрофотографування препаратів проводилось на апараті «OLIMPUS».

Результати та їх обговорення

Термін забору матеріалу (1 година після травмування) відповідав гострому періоду травми. Тупа травма спинного мозку через 1 годину макроскопічно проявлялась лише ознаками набряку. Виявлені були функціональні порушення у вигляді відсутності довільних рухів м'язів нижніх кінцівок.

При порівняльному аналізі морфологічної структури чотириголового та великогомілкового м'язів нижніх кінцівок, які отримують іннервацію від сегментів спинного мозку, що розташовані нижче місця травмування, піддослідної та контрольної груп тварин було виявлено наступні зміни. Дослідження скелетної м'язової та сполучної тканин щурів через 1 годину після тупої травми спинного мозку виявило, що структура скелетної м'язової тканини є диференційованою і мікроскопічно відповідає контролю. Проте, виявлено периферійне ущільнення саркоплазми, розширення простору між м'язовими волокнами без збільшення вмісту волокнистих структур і клітин пухкої сполучної тканини ендомізію, ймовірно за рахунок набряку (Рис.1).

Гістохімічні методи дослідження показали, що в ранньому після травматичному періоді відбувалось зменшення ШИК-позитивних властивостей саркоплазми і накопиченням ШИК-позитивних речовин в ендомізії. Цей факт можливо розцінювати як результат виходу за межі міосимпластів різних фракцій білків у наслідок підвищеної проникності сарколеми [10] (Рис.2).

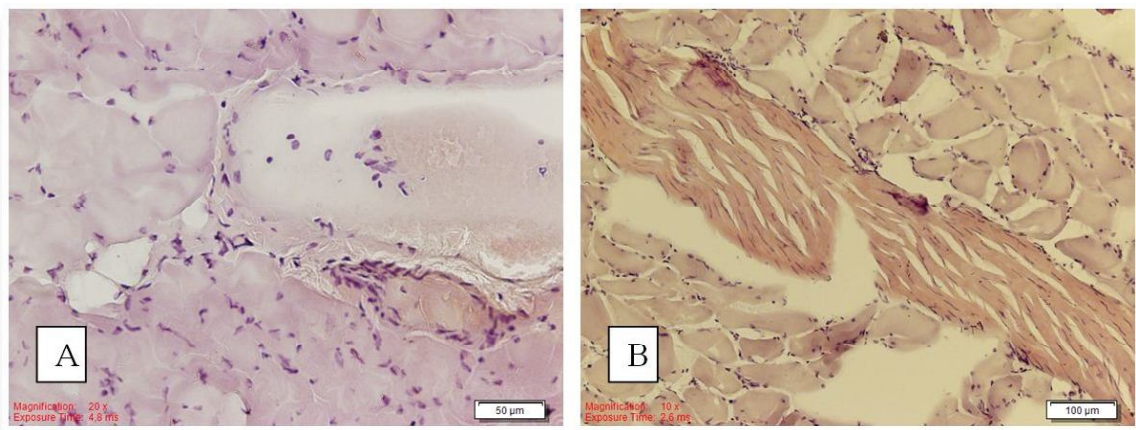


Рис. 1. А – поперечний зріз великогомілкового м'язу стегна щура контрольної групи. Забарвлення: гематоксилін-еозин. В - поперечний зріз великогомілкового м'язу стегна щура експериментальної групи. Тупа травма спинного мозку. 1 година після травмування. Забарвлення гематоксиліном та еозиним. А - $\times 100$, В - $\times 200$.

Виявляючи в цьому ж терміні після травмування спинного мозку в скелетних м'язах нижньої кінцівки щура лужну фосфатазу й АТФ-азу, які як відомо, є ферментами активного транспор-

ту метаболітів через біологічні мембрани, нами було виявлено значне зменшення активності АТФ-ази [11] (Рис.3).

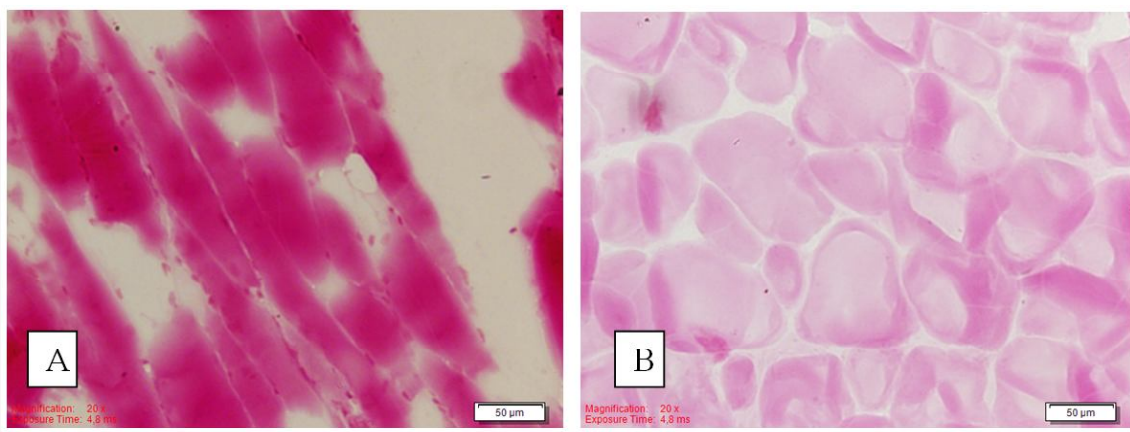


Рис. 2. А – поперечний зріз великогомілкового м'язу стегна щура контрольної групи. В - поперечний зріз великогомілкового м'язу стегна щура експериментальної групи. Тупа травма спинного мозку. 1 година після травмування. ШИК-реакція. $\times 200$.

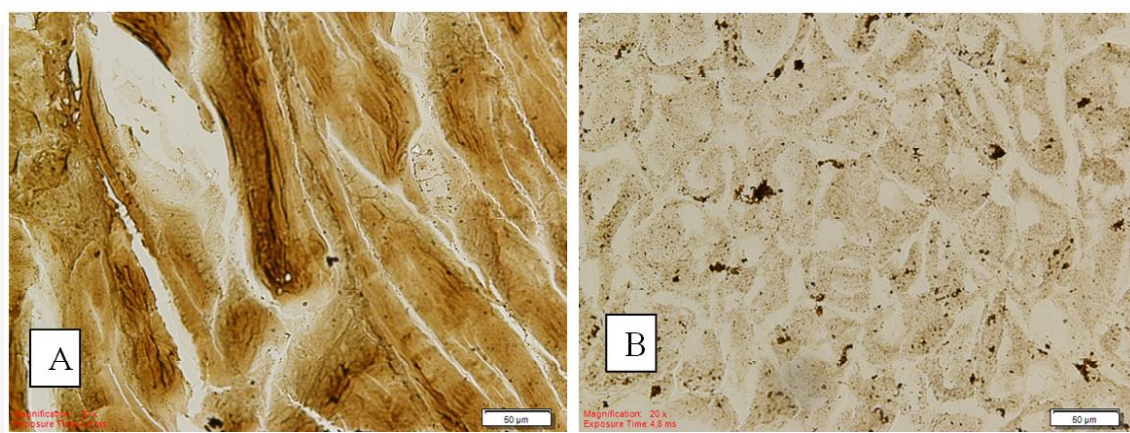


Рис. 3. А – поперечний зріз великогомілкового м'язу стегна щура контрольної групи. В - поперечний зріз великогомілкового м'язу стегна щура експериментальної групи. Тупа травма спинного мозку. 1 година після травмування. Виявлення АТФ-ази за методом Вахштейна і Мейзеля. $\times 200$.

Разом з цим, в саркоплазмі міосимпластів виявлено збільшення активності кислій фосфатази. Остання локалізується в лізосомах (виконую-

чи роль маркерного їх фермента) і ядрах, і бере участь в якості однієї з лізосомальних гідролаз у процесах дегенерації [12] (Рис. 4).

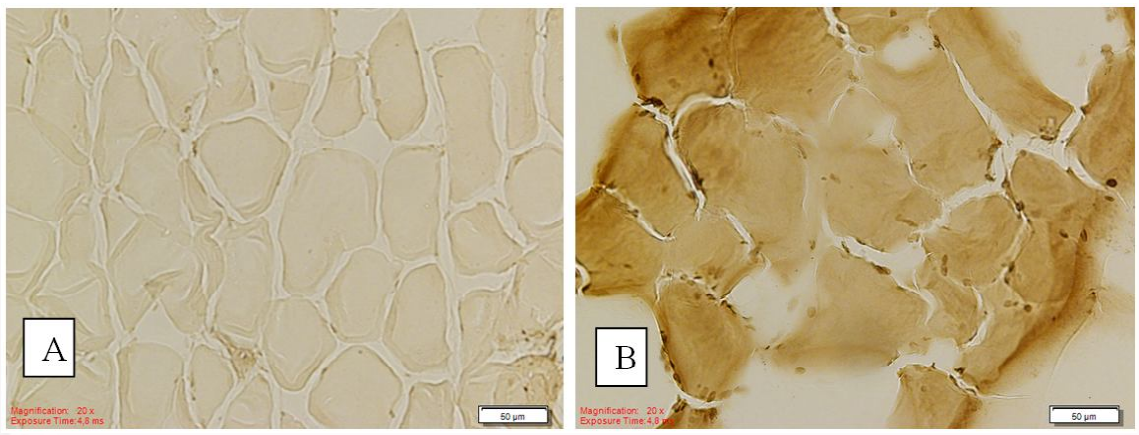


Рис. 4. А – поперечний зріз великомілкового м'язу стегна щура контрольної групи. В - поперечний зріз великомілкового м'язу стегна щура експериментальної групи. Тупа травма спинного мозку. 1 година після травмування. Виявлення кислій фосфатази за методом Гоморі. ×200.

Значні біохімічні зміни стосувались збільшенням рівня ЛДГ в саркоплазмі і перимізії. ЛДГ бере участь в обміні глюкози шляхом каналізації перетворення молочної кислоти в пірови-

ноградну [13]. Брак кисню призводить до блокування процесів аеробного гліколізу з наступним накопиченням ЛДГ в цитоплазмі і руйнуванням клітинних структур (Рис.5).

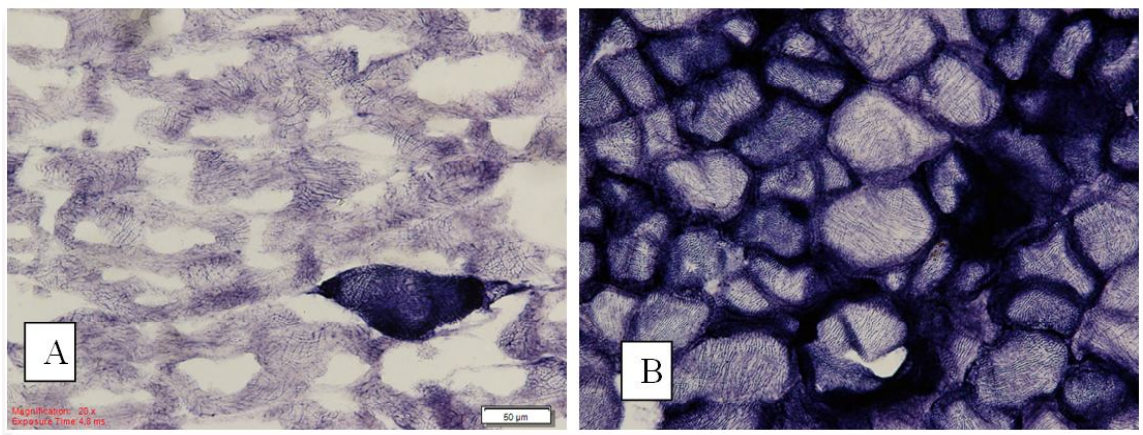


Рис. 5. А – поперечний зріз великомілкового м'язу стегна щура контрольної групи. В - поперечний зріз великомілкового м'язу стегна щура експериментальної групи. Тупа травма спинного мозку. 1 година після травмування. Реакція на виявлення ЛДГ. ×200.

Висновки

Експериментальне дослідження порушення нейротрофічного контролю скелетних м'язів нижніх кінцівок, які отримують інервацію від сегментів спинного мозку, що розташовані нижче місця нанесення тупої травми через 1 годину після травмування дали змогу виявити наступне: зміни тканьової організації скелетної мускулатури проявились розширенням інтерстиційного простору між міосимпластами за рахунок набряку; фізіологічні зміни проявились відсутністю активних рухів у скелетних м'язах

нижніх кінцівок за рахунок блокування провідності нервових волокон; гістохімічні зміни проявились у вигляді міграції ШИК-позитивних компонентів із сарколеми в інтерстиційний простір за рахунок підвищення проникності сарколеми, зменшення активності АТФ-ази, що засвідчує порушення транспортної функції мембран, підвищення рівня кислій фосфатази і накопичення ЛДГ у сарколемі є проявом дегенеративних змін у міосимпластах. Отже, все вищезазначене засвідчує швидкий початок біохімічних руйнівних процесів у скелетних

м'язах при нетривалому порушенні їх інервації.

Перспективи подальших розробок

Вивченням даного питання на сьогодні в Україні серед низки профілюючих науково-дослідних і учбових закладів займається кафедра гістології та ембріології НМУ ім. О.О. Богомольця (завідувач кафедри член-кореспондент НАМН України д.м.н., професор Чайковський Ю.Б.). Невирішеним залишається питання, що

стосується методів прискорення процесів регенерації периферійної і центральної нервової системи. Виходячи з цього є доцільним продовження наукових досліджень по розробці методів стимуляції регенерації спинного мозку, спинномозкових вузлів, спинномозкових нервів за умов тупої травми спинного мозку за допомогою детального вивчення мікроскопічних та субмікроскопічних змін.

Літературні джерела References

1. Polischuk NE, Korzh NA, Phischenko BYa, authors; Polischuk NE, editor. [Damage to the spine and spinal cord (the mechanisms, clinical features, diagnosis, treatment)]. Kyiv: Knyha plus; 2001. 388 p. Russian.
2. Vernon L, author. Spinal Cord Medicine: Principles and Practice. New York: Demos Medical Publishing; 2002. 201 p.
3. Rindenko VG, Zavelya MS, Chernov OL, authors; Rindenko VG, editor. [Vertebral-spinal trauma. Premedical stage: a manual for self-study]. Kharkiv; 2007. 234 p. Ukrainian.
4. Tsymbaliuk VI, Nevodnik VI, Salkov NN. [Secondary changes in the spinal cord under the influence of prolonged compression trauma of the spine and spinal cord in the cervical region]. Ukrainskyi neirokhirurgichnyi zhurnal. 2013;4:45-55. Ukrainian.
5. Vasilyeva EM, Bakanov MI. [Biochemical changes in neurological pathology]. Biomed Khim. 2005;51(6):581-602.
6. Arun PA. Surgical management of spinal cord injury: controversies and consensus. Hoboken, New Jersey: Wiley-Bleekwel; 2007. 272 p.
7. Geisler FH. Recovery of motor function after spinal-cord injury: a randomized, placebo-controlled trial with GM-I ganglioside. N Engl J Med. 1991 Jun 27;324(26):1829-38.

8. Bispo dos Santos G, Cristante AF, Macron RM, Inácio de Souza F, Pessoa de Barros Filho TE, Damascene ML. Spinal Cord injury experimental model and motion evaluation protocol in Wistar rats. Acta Ortop Bras. 2011;19(2):87-91.

9. Raskaley TYa, Chaikovskiyu YuB, Raskaley VB, Kozak HI, inventors; National O.Bohomolets medical university, assignee. [Device for simulation of blunt spinal cord injury]. Ukrainian patent UA 97693. 2015 March 25. Int. Cl. A61B8/00. Ukrainian.

10. Hubskiy YuI. [Biological chemistry: textbook]. Kyiv, Ternopil: Ukrmedkniga; 2000. 508 p. Ukrainian.

11. Boikiv DP, Bondarchuk TI, Ivankiv OL, Kobilinska LI, Konik UV, Makarenko TM, Sklyarov OYa, Tomashevskaya MF, authors; Sklyarov OYa, editor. [Clinical biochemistry]. Kyiv: Meditsina; 2006. 387 p. Ukrainian.

12. Sklyarov O, Solski Ya, Velikiy M, Fartushok N, Bondarchuk T, Duma D, authors. [Biochemistry of enzymes. Enzymodiagnosics. Enzymopatology. Enzyme therapy.]. Lviv: Quart; 2008. 289 p. Ukrainian.

13. Hubskiy YuI. [Biological chemistry: textbook]. Kyiv-Vinnitsya: Nova knyha; 2009. 508 p. Ukrainian.

Раскалей Т.Я., Раскалей В.Б., Шобат Л.Б., Гаврилюк-Скиба Г.А. Гистохимическое исследование скелетных мышц в условиях экспериментальной тупой травмы спинного мозга.

Реферат. С целью предоставления морфологической характеристики адаптационных возможностей скелетной мышечной ткани в условиях нарушения нейротрофического контроля со стороны спинного мозга после позвоночно-спинномозговой травмы был проведен эксперимент на 10 белых лабораторных крысах-самцах массой 120-140 г. Подопытные животные были разделены на 2 группы. Проводилось гистохимическое исследование четырехглавой и большеберцовой мышц задней конечности крыс. Доказано, что даже при кратковременном нарушении иннервации скелетных мышц, в них очень быстро начинаются биохимические разрушительные процессы.

Ключевые слова: спинной мозг, позвоночно-спинномозговая травма, АТФ-аза, ЛДГ, нейротрофический контроль.