

УДК 616.748-005.4-036.11-089.811]-092.9
DOI 10.11603/bmbr.2706-6290.2020.2.11267

А. Т. Телев'як¹, П. Р. Сельський¹, І. М. Кліщ¹, Р. С. Вастьянов², О.Є. Кузів¹, А. С. Вольська¹,
Х. І. Курило¹, І. І. Боймиструк¹, Б. П. Сельський³

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України¹
Одеський національний медичний університет²
Тернопільська університетська лікарня³

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЗАДНІХ КІНЦІВОК ЩУРІВ ПРИ ГОСТРІЙ ІШЕМІЇ, ВИКЛИКАНІЙ НАКЛАДАННЯМ АРТЕРІАЛЬНОГО ТУРНІКЕТА

Ультраструктурні зміни скелетних м'язів задніх кінцівок щурів при гострій ішемії, викликаній накладанням артеріального турнікета

А. Т. Телев'як¹, П. Р. Сельський¹, І. М. Кліщ¹,
Р. С. Вастьянов², О. Є. Кузів¹, А. С. Вольська¹,
Х. І. Курило¹, І. І. Боймиструк¹, Б. П. Сельський³

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України¹
Одеський національний медичний університет²
Тернопільська університетська лікарня³

Резюме. Артеріальні турнікети широко застосовують у клінічній практиці при ангіо- та артропластиках, а при пораненнях кінцівки їх використання нерідко відбувається за життєвими показаннями. Відновлення кровопостачання кінцівки після зняття турнікета може викликати ішемічно-реперфузійні ураження як первинно ішемізованих тканин, так і у віддалених тканинах та органах. Проте на сьогодні потребують глибшого вивчення ультраструктурні зміни м'язів тканин на місцевому рівні при ішемії-реперфузії.

Мета дослідження – вивчити ультраструктурні зміни скелетних м'язів задніх кінцівок щурів при гострій ішемії та наступній реперфузії, викликаній накладанням артеріального турнікета.

Матеріали і методи. Проведено електронно-мікроскопічне дослідження скелетних м'язів задніх кінцівок 12 щурів за умов експериментальної гострої ішемії і наступної реперфузії. Гостру ішемію викликали шляхом накладання на задні кінцівки тварин гумових джгутів SWAT шириною 5–6 мм, на рівні пахвинної складки протягом 2 год під тіопентал-натрієвим знеболюванням, а реперфузію моделювали шляхом зняття турнікета. Дослідження зразків м'язової тканини проводилося на кафедрі гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України за допомогою електронного мікроскопа PEM-125K.

Результати. При електронній мікроскопії скелетних м'язів задніх кінцівок щурів виявляли набряк саркоплазми міосимпласта, гіпертрофію та набряк мітохондрій, нерівномірне їх розміщення зі зкупченням під сарколемою, ушкодження їх зовнішньої оболонки, част-

Ultrastructural changes of skeletal muscles of the hind limbs of rats with acute ischemia caused by arterial tourniquet application

A. T. Televiak¹, P. R. Selsky¹, I. M. Klishch¹,
R. S. Vastyanov², O. E. Kuziv¹, A. S. Volska¹,
Kh. I. Kurylo¹, I. I. Boymystruk¹, B. P. Selsky³

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University¹
Odesa National Medical University²
Ternopil University Hospital³

e-mail: totel@ukr.net

Summary. Arterial tourniquets are widely used in clinical practice for angio- and arthroplasty, and by the injury of the limbs their using is often occurring according to vital indications. Restoring the blood supply to the limb after the removal of the tourniquet can cause ischemic-reperfusion lesions of both the primary ischemic tissues and distant tissues and organs. However, the ultrastructural changes of soft tissues at the local level by the ischemia-reperfusion are in need of deeper study today.

The aim of the study – to establish the ultrastructural changes of skeletal muscles of the hind limbs of the rats with acute ischemia and subsequent reperfusion caused by the arterial tourniquet application.

Materials and Methods. The electron microscopic examination of the skeletal muscles of the hind limbs of 12 rats under experimental acute ischemia and subsequent reperfusion was performed. Acute ischemia was caused by application of SWAT rubber bands on the hind limbs of animals, 5–6 mm width, at the inguinal fold level within 2 hours under thiopental anesthesia, and reperfusion was modeled by removing the tourniquet. The examination of muscle tissue samples was carried out at the Department of Histology and Embryology I. Horbachevsky Ternopil National Medical University by using an electron microscope PEM-125K.

Results and Discussion. Electron microscopy of the skeletal muscles of the hind limbs of rats revealed an edema of the sarcoplasm of the myosinoplasm, hypertrophy and edema of mitochondria, their uneven placement with accumulation under the sarcolemma, the damage of their outer membrane, a partial defragmentation and destruction

кова дефрагментація та деструкція мітохондріальних крист, аутолізис окремих мітохондрій, розволокнення міофіламентів міофібрил. Спостерігали зміни форми, розмірів та просторової орієнтації Z-дисків, саркомери не завжди чітко візуалізувалися, наявні ознаки розширення каналців саркоплазматичної сітки. Навколо ядер міофібрил спостерігали групи фагосом, ядра міосимпласта мали неправильну форму, були осміофільними і пікнотично зміненими. Ультраструктурні зміни спостерігались вже через 2 год після зняття турнікета і були найбільше вираженими через 1 добу. У пізньому реперфузійному періоді відбувся зворотний розвиток патологічних змін.

Висновки. Ультраструктурні порушення ушкодженої ішемією-реперфузією м'язової тканини задніх кінцівок щурів досягали максимального вираження у щурів через 1 добу після зняття турнікета, що підтверджує розвиток у експериментальних тварин ішемічно-реперфузійного синдрому. В пізньому реперфузійному періоді відбувся зворотний розвиток патологічних змін.

Ключові слова: гостра ішемія; реперфузія; скелетні м'язи; електронна мікроскопія; артеріальний турнікет.

ВСТУП

Артеріальні турнікети широко використовуються як у військовій, так і в цивільній медицині (зокрема при пораненні кінцівок, артро- та ангіопластиках) [1–3]. Відновлення кровопостачання кінцівки після зняття турнікета може викликати ішемічно-реперфузійні ураження як первинно ішемізованих тканин, так і у віддалених органах [4, 5]. Низку наукових публікацій присвячено вивченню морфологічних змін м'язових тканин при ішемії-реперфузії [6–8]. Проте ультраструктурні зміни у скелетних м'язах при ішемічно-реперфузійному синдромі потребують глибшого вивчення.

Метою дослідження було вивчити ультраструктурні зміни у скелетних м'язах задніх кінцівок щурів при гострій ішемії та наступній реперфузії, викликаній накладанням артеріального турнікета.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Проведено електронно-мікроскопічне дослідження чотириголового м'яза стегна задніх кінцівок 12 щурів за умов експериментальної гострої ішемії та наступної реперфузії. У контрольній групі було 3 інтактних тварини.

Дослідження проведені з дотриманням основних положень Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин, затверджених Указом МОЗ України № 753 від 12.08.1997 р., Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, які використовуються в експериментах та інших наукових цілях (1986), Указу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. «Про заходи з подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з вико-

of the mitochondrial cristae, an autolysis of some mitochondria, defibering of myofilaments of the myofibrils. Changes in the shape, size and spatial orientation of Z-disks were observed, sarcomeres were not always clearly visualized, there were the signs of dilation of the tubules of the sarcoplasmic reticulum. Groups of phagosomes were observed around the nuclei of myofibrils, the nuclei of the myosymplast had an irregular shape, were osmophilic and picnotically altered. Ultrastructural changes were observed already within two hours after the removal of the tourniquet and were most pronounced after one day after the removal of the tourniquet. In the late reperfusion period, there was a reverse development of pathological changes.

Conclusions. The ultrastructural disorders of lesioned by ischemia-reperfusion muscular tissue of the hind limbs reached maximal expression in rats one day after the removal of the tourniquet, what confirms the development in experimental animals of the ischemic-reperfusion syndrome. In the later reperfusion period, there was a reverse development of pathological changes.

Key words: acute ischemia; reperfusion; skeletal muscles; electron microscopy; arterial tourniquet.

ристанням експериментальних тварин» та Закону України № 3447–IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006).

Гостру ішемію викликали шляхом накладання на задні праві кінцівки тварин гумових джгутів SWAT (Stretch–Wrap–And–Tuck) шириною 5–6 мм на рівні пахвинної складки протягом 2 год під тіопентал-натрієвим знеболюванням. Реперфузію моделювали шляхом відновлення кровообігу в раніше ішемізованих кінцівках після зняття турнікета.

Під час експерименту тварин поділили на 4 дослідні групи. Модель раннього постішемічного періоду було представлено групами тварин із реперфузійними змінами через 2 год та 1 добу після зняття турнікета, а модель пізнього періоду – групами тварин із реперфузією через 7 та 14 діб (по 3 щури у кожній групі). Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації під тіопентал-натрієвим знеболюванням.

Електронно-мікроскопічне дослідження проводили на кафедрі гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Збір матеріалу (зразків ішемізованої м'язової тканини задніх правих кінцівок) проводили відповідно до загальноприйнятої методики [9]. Фіксацію матеріалу здійснювали в 2,5 % свіжоприготовленому розчині глютаральдегіду протягом години на фосфатному буфері Міллоніга (рН 7,3–7,4). Матеріал, фіксований упродовж 60 хв, промивали у буферному розчині протягом 20–30 хв. Дофіксацію зразків здійснювали упродовж години 1 % розчином оксиду осмію (OsO_4) на буфері Міллоніга. Дегідратацію проводили в спиртах наростаючої концентрації.

Заливку досліджуваного матеріалу здійснювали сумішшю епоксидних смол.

На ультрамікротомі LKB-3 (Швеція) виготовлялися ультратонкі зрізи, які забарвлювалися 1 % водним розчином ураніл ацетату та контрастувалися цитратом свинцю за методом Рейнольдса. Отримані препарати вивчали і фотографували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

При аналізі фотографій електронної мікроскопії скелетних м'язів задніх кінцівок інтактних щурів – ультраструктура міосимпласта без ушкоджень, саркомери добре візуалізувалися і були правильною форми, чітко спостерігалися А-диски та Z-диски, які мали паралельне просторове розміщення. Мітохондрії – округлої форми, звичайної електронної щільності (рис. 1).

Через 2 год ішемічно-реперфузійного ушкодження тканин задніх кінцівок щурів при субмікроскопічному дослідженні відмічалася гетерогенність ультраструктурної будови міосимпласта. В м'язових волокнах наявний набряк саркоплазми, гострі деструктивні зміни міофібрил, гіпертрофія та набряк мітохондрій, нерівномірне їх розміщення зі скупченням під сарколемою, ушкодження їх зовнішньої оболонки, часткова дефрагментація та деструкція мітохондріальних крист, поява в мітохондріях ділянок зі зниженою електронною щільністю. У деяких міофібрилах виявлялося розволокнення міофіламентів, саркомери не завжди чітко візуалізувалися. Відмічено також помірно виражені зміни форми і розмірів Z-дисків та ознаки розширення каналців саркоплазматичної сітки (рис. 2).

Через 1 добу після декомпресії стегнової артерії задніх кінцівок щурів при електронно-мікроскопічному дослідженні дистрофічні зміни в м'язовій тканині були найбільш вираженими. Субмікроскопічно виявлено виражений набряк м'язових волокон та просвітлення саркоплазми. Мітохондрії були значно набрякли, подекуди набували полігональної форми, спостерігалася деструкція їх зовнішньої мембрани і мітохондріальних крист та аутолізис окремих мітохондрій (рис. 3). Міофібрили м'язових волокон фрагментовані, Z-диски візуалізувалися нечітко або подекуди не виявлялися взагалі, втрачали свою паралельну орієнтацію, що вказує на порушення просторового розміщення білків саркомера. Подекуди спостерігали розволокнення міофіламентів, у саркоплазмі деяких міофібрил виявляли дрібні осмофільні включення.

Навколо ядер міофібрил помітно групи лізосом (фагосом), що вказує на процес їх аутолізу (рис. 4). Виявлено виражені зміни ядер міосимпласта, які мали неправильну форму, були осміофільними і пікнотично зміненими.

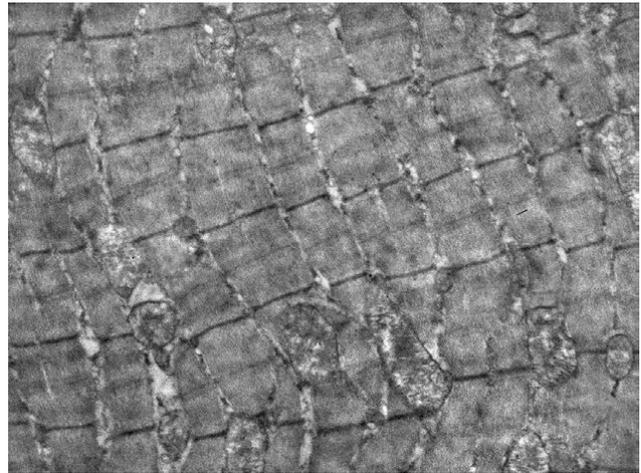


Рис. 1. Ультраструктура м'язової тканини. Контрольна група. $\times 15\ 000$.

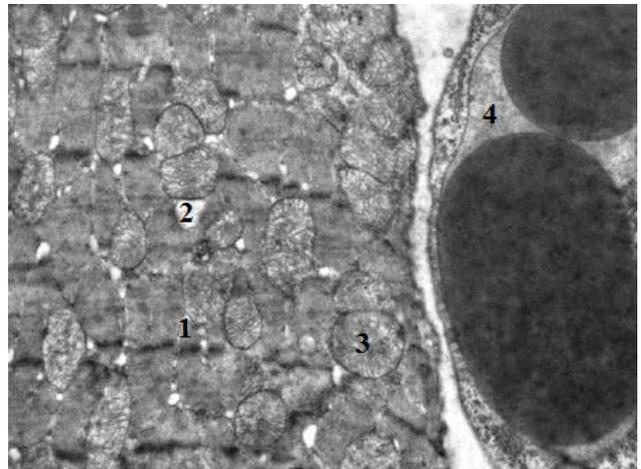


Рис. 2. Ультраструктура міосимпласта та гемокапіляра скелетного м'яза стегнової ділянки. Реперфузія через 2 год. $\times 13\ 000$. Примітка. 1 – порушення паралельної орієнтації Z-дисків; 2 – кавеола в саркоплазмі міосимпласта; 3 – набрякла мітохондрія; 4 – просвіт гемоканіляра.

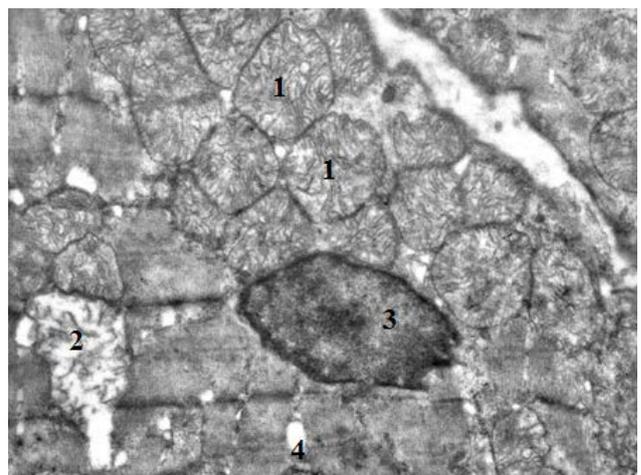


Рис. 3. Ультраструктура міосимпласта скелетного м'яза стегнової ділянки. Реперфузія через 1 добу. $\times 15\ 000$. Примітка. 1 – набрякли гіпертрофовані полігональної форми мітохондрії; 2 – лізис мітохондрії; 3 – пікнотичне осміофільне ядро міосимпласта; 4 – кавеола.

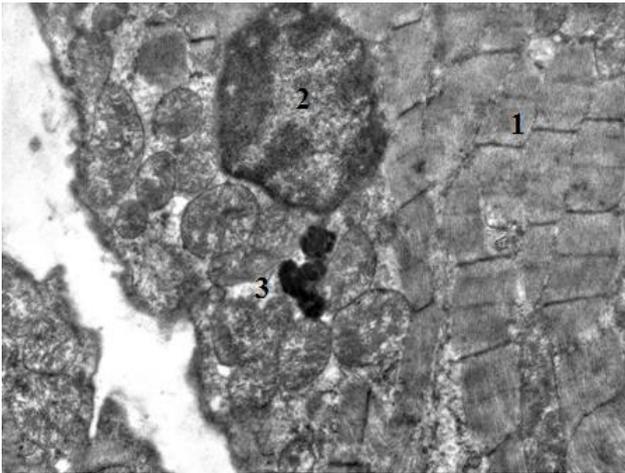


Рис. 4. Ультраструктура міосимпласта скелетного м'яза стегнової ділянки. Реперфузія через 1 добу. $\times 15\ 000$. Примітка. 1 – порушення паралельної орієнтації Z-дисків; 2 – осміофільне ядро міосимпласта; 3 – група фагосом у саркоплазмі.

При електронно-мікроскопічному дослідженні через 7 діб експериментальної ішемії-реперфузії, окрім деструктивних явищ, виявляли також і ознаки відновлення ультраструктури міосимпластів. Все ще спостерігалася фрагментація м'язових волокон, в яких були помірно набряклі мітохондрії. Ядра міосимпласта зміненої форми зі збільшенням кількості еухроматину. Відмічалася наявність дрібних осмофільних включень у саркоплазмі окремих міофібрил. В ендомізю часто виявляли лімфоцити. Проте порівняно з експериментальними тваринами попереднього періоду, відмічалися ознаки відновлення структури Z-дисків міофібрил – вони контурувалися більш чітко.

Через 14 діб ішемічно-реперфузійного ураження ультраструктура ушкоджених клітин значною мірою відновлювалася. Відмічався незначний набряк саркоплазми м'язових волокон зі збереженням структури внутрішньоклітинних органел. У м'язовій тканині спостерігали помірно збільшення кількості піноцитозних міхурців і кавеол (рис. 5).

У щурів пізнього реперфузійного періоду субмікроскопічні зміни міосимпластів значно зменшувалися, проте порівняно з групою контрольних тварин, навіть через 14 діб реперфузійного ураження все ще зберігалися помірно виражені зміни.

Результати експерименту можуть слугувати основою для подальших досліджень ультраструктурного ремоделювання скелетних м'язів кінцівок при різних видах компресійної травми та її поєднанні з іншими патологічними станами (крововтрата різного ступеня, краніоскелетна травма, опіки, дегідратація тощо), а також для оцінки ефективності застосування медикаментозної корекції ішемічно-реперфузійних ушкоджень м'яких тканин кінцівки.

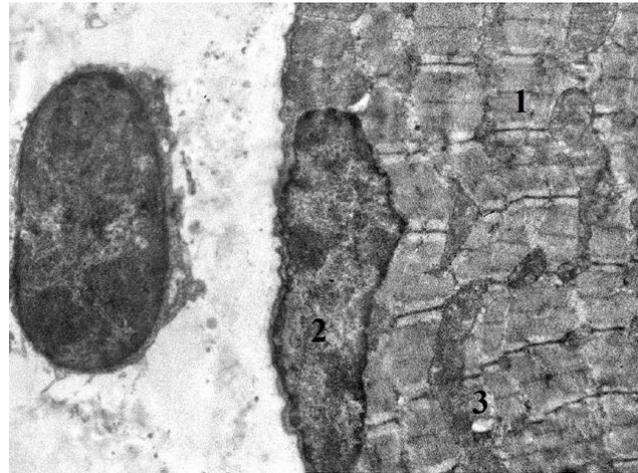


Рис. 5. Ультраструктура міосимпласта скелетного м'яза стегнової ділянки. Реперфузія через 14 діб. $\times 13\ 000$. Примітка. 1 – відновлення паралельної орієнтації Z-дисків; 2 – ядро міосимпласта; 3 – кавеола.

ВИСНОВКИ

1. Ультраструктурні порушення міосимпластів ішемізованої м'язової тканини задніх кінцівок щурів спостерігалися вже через 2 год після зняття турнікета і досягали максимального вираження у тварин через 1 добу реперфузії, що підтверджує розвиток у них ішемічно-реперфузійного синдрому.

2. При електронній мікроскопії у щурів раннього періоду експериментальної ішемії-реперфузії в скелетних м'язах виявлено набряк саркоплазми міосимпласта, гіпертрофію та набряк мітохондрій, нерівномірне їх розміщення зі скупченням під сарколемою, ушкодження їх зовнішньої оболонки, часткова дефрагментація та деструкція мітохондріальних крист, аутолізис окремих мітохондрій, розволокнення міофіламентів міофібрил, зміни форми, розмірів та просторової орієнтації Z-дисків, порушення візуалізації саркомерів, ознаки розширення каналців саркоплазматичної сітки, появу навколо ядер міофібрил груп фагосом, зміни форми та електронної щільності ядер міосимпласта.

3. У пізньому реперфузійному періоді через 7 та 14 діб відбувався зворотний розвиток патологічних змін. У цей період ультраструктура міосимпласта значною мірою відновлювалася, проте зберігався незначний набряк саркоплазми м'язових волокон зі збереженням структури внутрішньоклітинних органел та помірно збільшення кількості піноцитозних міхурців і кавеол, що свідчить про те, що через 14 діб реперфузії повного відновлення ультраструктури скелетних м'язів все ще не відбувалося.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Хоменко І. П. Клінічно-організаційні особливості надання травматологічної допомоги пораненим із дефектами м'яких тканин при вогнепальних та мінно-вибухових ушкодженнях кінцівок / І. П. Хоменко, С. О. Король, Б. В. Матвійчук // Травма. – 2018. – Т. 19, № 5. – С. 125–129.
2. Wu Q.-F. Tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury during total knee arthroplasty / Q.-F. Wu, D.-X. Wang // J. Anesth. Perioper. Med. – 2018. – Vol. 5, No. 1. – P. 41–47.
3. New effective tourniquets for potential use in the military environment: A serving soldier study / A. Beaven, R. Briard, M. Ballard, P. Parker // Military Medicine. – 2017. – Vol. 182, No. 7. – P. 1929–1932.
4. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury / M.-Y. Wu, G.-T. Yiang, W.-T. Liao, A. P.-Y. Tsai // Cell Physiol. Biochem. – 2018. – Vol. 46. – P. 1650–1667.
5. Tsunoda K. The effect of air tourniquet on interleukin-6 levels in total knee arthroplasty / K. Tsunoda, M. Sonohata, H. Kugisaki // The Open Orthopaedics Journal. – 2017. – Vol. 11, No. 1. – P. 20–28.
6. Ischemia/reperfusion / T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz, R. J. Korthuis // Compr. Physiol. – 2016. – Vol. 7, No. 1. – P. 113–170. .
7. Tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury: the comparison of antioxidative effects of small-dose propofol and ketamine / K. Omer, G. Nermin, A. Ali, A. Mehmet [et al.] // Brazil. J. of Anesthesiol. – 2017. – Vol. 67, No. 3. – P. 246–250.
8. Телев'як А. Т. Порівняльний аналіз структурних порушень м'язів задніх кінцівок та біохімічних показників сироватки крові щурів при гострій ішемії / А. Т. Телев'як, Т. О. Вересюк, П. Р. Сельський // Вісник наукових досліджень. – 2018. – № 3. – С. 114–120.
9. Горальський Л. П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир : Полісся, 2011. – 288 с.

REFERENCES

1. Khomenko IP, Korol SO, Matviichuk BV. [Clinical and organizational features of providing trauma care to the wounded with soft tissue defects in gunshot and explosive injuries of the extremities]. *Travma*. 2018;19(5): 125-9. Ukrainian.
2. Wu QF, Wang DX. Tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury during total knee arthroplasty. *J Anesth Perioper Med*. 2018;5(1): 41-7. DOI: 10.1155/2018/8087598.
3. Beaven A, Briard R, Ballard M, Parker P. New effective tourniquets for potential use in the military environment: a serving soldier study. *Military Medicine*. 2017;182(7): 1929-32. DOI: 10.7205/MILMED-D-16-00298.
4. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 46: 1650-67. DOI: 10.1159/000489241.
5. Tsunoda K, Sonohata M, Kugisaki H. The effect of air tourniquet on interleukin-6 levels in total knee arthroplasty. *The Open Orthop J*. 2017;11(1): 20-8. DOI: 10.2174/1874325001711010020.
6. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*. 2016;7(1): 113-70. DOI: 10.1002/cphy.c160006.
7. Omer K, Nermin G, Ali A, Mehmet A, Unal D, Sezen KS, et al. Tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury: the comparison of antioxidative effects of small-dose propofol and ketamine. *Brazil. J. of Anesthesiol.*, 2017;67(3): 246-50. DOI: 10.1016/j.bjane.2015.09.005.
8. Televiak AT, Veresiuk TO, Selsky PR. [Comparative analysis of structural disorders of the muscles of the hind limbs and biochemical parameters of the serum of rats in acute ischemia]. *Visnyk nauk doslid*. 2018;3: 114-20. Ukrainian. DOI: 10.11603/2415-8798.2018.3.9247.
9. Horalskyi LP, Khomych VT, Kononskyi OI. Histological techniques and methods of morphological studies in normal and pathological conditions. [Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології] *Zhytomyr: Polissia*; 2011. Ukrainian.

Отримано 04.05.20