

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РЕПЕРFUЗИОННОГО СИНДРОМА

© Л. В. Анисимова,¹ А. В. Кубышкин, Л. Л. Алиев, Е. Ю. Бессалова, В. З. Харченко

Медицинская академия им. С. И. Георгиевского Крымского федерального
университета им. В. И. Вернадского, Симферополь, 95007;

¹электронный адрес: anisanisl@mail.ru

Анализ патоморфологических изменений, происходящих в мышечной ткани после реперфузии ранее ишемизированной конечности крыс, позволил выделить три фазы развития экспериментального реперфузионного синдрома (РС) — ишемическую, начальную реперфузионную и позднюю реперфузионную. Морфологические изменения скелетных мышц в первой фазе характеризуются наличием дистрофически-некротических процессов, что отражает компенсаторно-приспособительные реакции организма к гипоксии. В третьей фазе наблюдается прогрессирование морфологических нарушений, развивающихся в период ишемии в мышцах, что говорит о выраженности эндогенной интоксикации организма продуктами нарушенного метаболизма и определяет необратимость деструктивных процессов и вероятность развития полиорганной недостаточности. Исходя из характера патоморфологических изменений можно предположить, что наиболее эффективными будут терапевтические мероприятия, проводимые в первой фазе, а также в первые часы второй фазы РС для повышения толерантности скелетных мышц к ишемическому повреждению. С учетом прямой зависимости между выраженностью патоморфологических изменений и дисбалансом протеиназ-ингибиторной системы обоснованно использование препаратов ингибиторов протеиназ для коррекции развития РС и уменьшения деструктивных изменений в первой и второй фазах. При пролонгировании реперфузии с учетом степени выявленных патологических изменений проведение терапевтических мероприятий становится неэффективным.

Ключевые слова: реперфузионный синдром, мышцы.

Принятые сокращения: РС — реперфузионный синдром.

Известно, что скелетная мускулатура имеет высокую метаболическую активность, в связи с чем обладает высокой чувствительностью к ишемическим и реперфузионным повреждениям (Гапонова и др., 2015). В результате повреждения мышечной ткани, которое может встречаться при различных ситуациях, таких как травмы, первичный тромбоз, артериальная эмболия, длительное наложение жгута, часто развивается реперфузионный синдром (РС) (Тимербулатов и др., 2010; Корейба и др., 2013). При этом повреждение мышечной ткани следует рассматривать не только как локальный процесс, но и как пусковой механизм для развития системных изменений (Defraigne, Pincemail, 1998; Song et al., 2015). Развитие реперфузионных поражений органов при восстановлении кровотока в мышечной ткани происходит в результате поступления в общий кровоток продуктов нарушенного метаболизма и некролиза тканей, образовавшихся как в период ишемии, так и при реперфузии (Carden, Granger, 2000; Кашибадзе, Накашидзе, 2009; Гринев, Гринев, 2010; Halestrap, 2010; Абросимов и др., 2015). В то же время, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению воздействия реперфузии на организм человека и животных (Маршалов и др., 2008; Mansour et al., 2012; Марченко и др., 2013; Гапонова и др., 2015; Калинин и др., 2015), до сих пор нет детальной характеристики особенностей патоморфологической картины скелетных мышц, перенес-

ших реперфузию после ишемии. На сегодняшний день не определена этапность развития повреждений, которая могла бы позволить максимально обоснованно разработать подходы к диагностике, профилактике и лечению полиорганных осложнений, инициатором которых считается РС.

Целью настоящей работы являлся анализ патоморфологических изменений, происходящих в мышечной ткани после реперфузии ранее ишемизированной конечности крыс.

Материал и методика

Экспериментальные исследования проведены на 59 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180—210 г с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС) и Хельсинкской декларации.

Реперфузионный синдром моделировали путем наложения резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки сроком на 6 ч. Ширина пережатия тканей составила 2—3 мм. Показателями правильности наложения жгута являлись отсутствие отека конечностей и бледность их окраски. Эвтаназию животных осуществляли под тиопенталовым наркозом через

6 ч (1-я группа) после наложения жгутов и через 6, 12 и 24 ч после реперфузии (2—4-я группы соответственно).

Для гистологического исследования фрагменты мышцы размерами около 1 см³ фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, затем обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в парафин. Приготовленные с помощью микротомы срезы толщиной 2—4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике.

Материал для электронной микроскопии фиксировали 2,5%-ным раствором глутаральдегида (Merck, Германия) в течение 2 ч при 4 °С. После промывки образцов в 1 М фосфатном буфере (pH 7.4) их дофиксировали в 1,3%-ном растворе тетраоксида осмия (OsO₄) в течение 1 ч при 4 °С. После обезвоживания в спиртах восходящей концентрации (этанол) материал заключали в Эпон. Полутонкие срезы (1 мкм) изготавливали на ультратоме Reichert и после окраски метиленовым синим изучали с помощью светового микроскопа. Ультратонкие срезы (30—60 нм), изготовленные на том же ультратоме, после контрастирования по Рейнольдс изучали с помощью электронного микроскопа Jem 1010 (JEOL).

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением методов вариационной статистики с вычислением средних величин (М), оценкой вероятности расхождений (m), оценкой достоверности изменений с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты

В мышечной ткани крыс после 6 ч ишемии конечностей были обнаружены умеренно выраженные микроциркуляторные изменения. В ходе гистологических исследований было отмечено исчезновение поперечной исчерченности мышечной ткани с очагами некроза цитоплазмы части мышечных клеток и с появлением разрывов мышечных волокон. Наблюдали признаки тканевого отека. При этом сосудистое русло запусеивается, а на этом фоне отмечаются признаки отека мышечной ткани: пространства между отдельными клетками расширены за счет отека жидкости (рис. 1, а). Электронно-микроскопические исследования мышечной ткани ишемизированной в течение 6 ч конечности крыс выявили минимальные структурные повреждения (рис. 2, а). Отмечаются признаки отека мышечной ткани, за счет которого пространства между отдельными миофибриллами расширены. Между миофибриллами наблюдается большое число гетерогенных по размеру митохондрий с просветленным матриксом, что отражает компенсаторно-приспособительные реакции к гипоксии. Ультраструктура эндотелия стенки капилляров сохранена, но присутствует умеренный периваскулярный и интерстициальный отек. В ядре эндотелиоцитов наблюдается неравномерная конденсация хроматина вблизи кариолеммы. Цитоплазма эндотелиоцитов сильно просветлена. Просвет сосуда заполнен аморфными массами. Периваскулярно расположены сегментоядерные лейкоциты. На некоторых участках отмечалось повреждение митондрий по вакуолярно-литическому типу.

Исследования мышечной ткани крыс после 6 ч реперфузии выявили неоднородность и мозаичность морфологической картины. Большая часть клеток имела выра-

женные в разной степени признаки некроза: исчезновение поперечной исчерченности, появление признаков внутриклеточного отека, очаговый глыбчатый распад и лизис цитоплазмы части клеток, а также распад и фрагментация самих мышечных волокон. Клеточная воспалительная реакция представлена преимущественно сегментоядерными лейкоцитами, которые выявляются в виде скопления вокруг некротизированных клеток и периваскулярно. Имелись признаки умеренно выраженного межмышечного периваскулярного отека и значительное количество петехиальных кровоизлияний (рис. 1, б).

Электронно-микроскопические исследования мышечной ткани животных данной группы выявили набухание митохондрий, деформацию их крист вплоть до полной деструкции, релаксацию миофибрилл. На некоторых участках наблюдаются гигантские митохондрии, образующиеся за счет слияния мембран соседних митохондрий (рис. 2, б). В просвете некоторых митохондрий отмечается накопление плотных осмиофильных преципитатов, что свидетельствует о необратимом повреждении митохондриальных мембран. На отдельных участках происходят разволокнение и разрыв миофибрилл за счет выраженного отека. Также наблюдается миолиз.

В экспериментальной группе животных, подвергшихся ишемии в течение 6 ч и реперфузии в течение 12 ч, в мышечной ткани повсеместно отмечается потеря мышечными клетками поперечной исчерченности; значительное их количество имеет гомогенизированную просветленную цитоплазму по сравнению с относительно сохранными клетками и признаки отека. Наблюдаются фрагментация, распад и лизис цитоплазмы с распадом и мышечных волокон и формированием «булавовидных» утолщений на концах фрагментов (рис. 1, в). Расстояния между мышечными волокнами увеличены за счет накопления отека жидкости. Значительное число сосудов выглядят запустевшими, а капиллярное русло имеет резко выраженные признаки гиперемии. На электронограммах мышечной ткани третьей экспериментальной группы определяются ярко выраженные признаки повреждения мышц, разволокнистость миофибрилл, потеря структуры митохондрий. Имеют место разрывы сарколеммы и вакуолизация миофибрилл, отложения аморфного материала, по-видимому кальция, в митохондриях, разрушение их крист, конденсация хроматина и появление областей гетерохроматина в немногочисленных ядрах миоцитов и эндотелиоцитов. В строме наблюдаются значительный отек и большое количество полиморфноядерных лейкоцитов. При этом часть миофибрилл сохраняет относительно нормальную структуру. В ядре таких клеток встречается конденсация хроматина на ядерной мембране, имеется большое количество остроконечных инвагинатов, что свидетельствует о выраженном цитоплазматическом отеке (рис. 2, в).

У животных, подвергшихся 6 ч ишемии с реперфузией в течение 24 ч, отмечается дальнейшее прогрессирование некротически-деструктивных изменений мышечной ткани: мышечные волокна выглядят набухшими, цитоплазма гомогенизирована, с фрагментацией и распадом на отдельные глыбки; или же отмечается разволокнение за счет выраженного отека междисковых пространств, и тогда они выглядят в виде «перьев». Ядра мышечных клеток повсеместно отсутствуют. Отмечается снижение и числа клеток-сателлитов. Увеличивается количество разрывов мышечных волокон (рис. 1, г). Степень межклеточного отека возрастает, а воспалительные изменения оста-

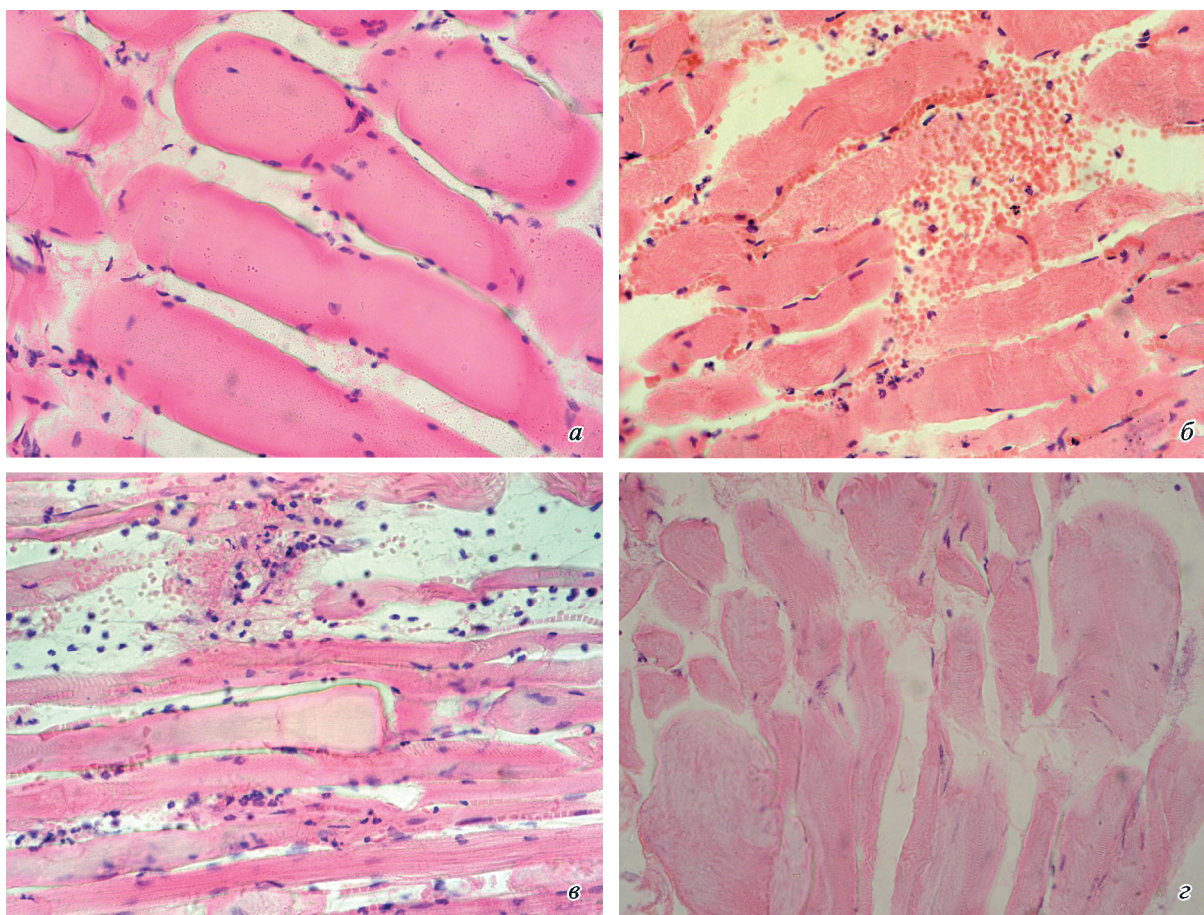


Рис. 1. Гистологическая картина мышц крыс после ишемии и реперфузии.

a — 6 ч ишемии, *б* — 6 ч реперфузии, *в* — 12 ч реперфузии, *г* — 24 ч реперфузии. Об.: *a–в* — 25×, *г* — 40×.

ются практически на прежнем уровне; в экссудате по-прежнему преобладают нейтрофильные лейкоциты. Гиперемия капиллярного русла резко выражена. При ультраструктурных исследованиях мышечной ткани у животных с реперфузионным синдромом длительностью 24 ч отмечается дальнейшее прогрессирование некротически-деструктивных изменений мышечной ткани. Наблюдается усугубление явлений миолиза, вакуолизации и деструкции миобрилл. Структура Z-дисков нарушена. Между миофибриллами выявляется скопление аморфных электронно-плотных масс. Практически повсеместно наблюдаются отек и разрушение митохондрий, отложения аморфного материала, по-видимому кальция, в матриксе митохондрий (рис. 2, *г*), образование гигантских митохондрий за счет разрушения и слияния мембран соседних митохондрий. Наблюдаются признаки повреждения митохондрий по вакуолярнолитическому типу. Происходит разволокнение миофибрилл за счет отека жидкости. Выявляются признаки отека субсарколеммного пространства, некоторое расширение саркоплазматического ретикулума и Т-системы миоцитов, изменение структуры саркомеров (непараллельный ход волокон, зоны саркомера определяются плохо). Отмечается значительное число гетерогенных конденсированных или набухших митохондрий с полностью разрушенными кристами. Наличие контрактурных повреждений свидетельствует о кальциевой перегрузке миоцитов и гиперактивации симпатической нервной системы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при экспериментальном РС в мышечной ткани имеют место значительные морфологические изменения, степень выраженности которых напрямую зависит от длительности реперфузии.

Обсуждение

Сопоставляя полученные результаты патоморфологической картины изменений скелетных мышц при экспериментальном реперфузионном синдроме и состоянии местного неспецифического протеиназ-ингибиторного потенциала, исследованного нами ранее (Мальченко и др., 2014), а также учитывая данные литературы (Маршалов и др., 2008; Цой, Мойсюк, 2013), в развитии РС можно выделить три фазы: первая, или ишемическая, вторая, или начальная реперфузионная (первые 6 ч реперфузии), третья, или поздняя реперфузионная (более 12 ч реперфузии). Выявленные морфологические изменения скелетных мышц в первой ишемической фазе характеризуются наличием дистрофически-некротических процессов в виде исчезновения поперечной исчерченности с очагами некроза цитоплазмы части миоцитов, а также большого числа гетерогенных митохондрий, что отражает компенсаторно-приспособительные реакции организма к гипоксии (Halestrap, 2010). Во второй фазе значительно увеличивается количество миоцитов с утраченной

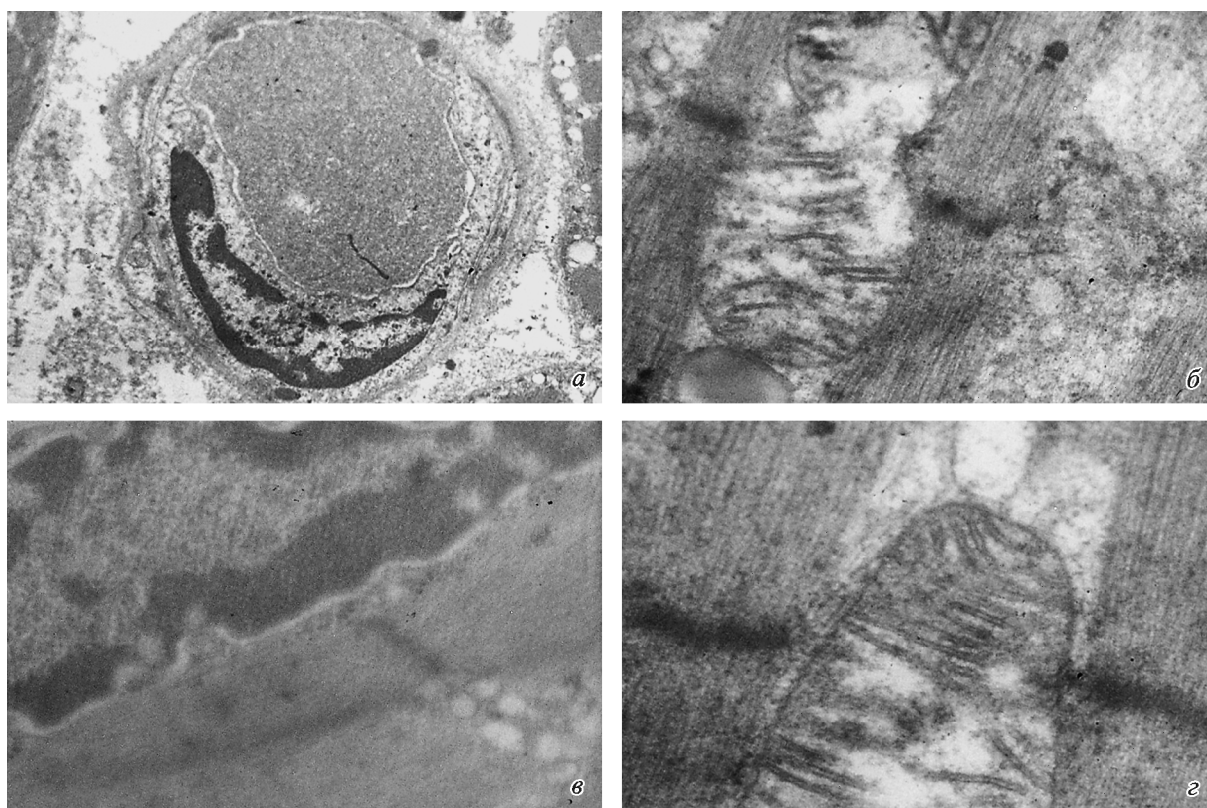


Рис. 2. Ультраструктурная организация миоцитов крыс после ишемии и реперфузии.

a — 6 ч ишемии, *б* — 6 ч реперфузии, *в* — 12 ч реперфузии, *г* — 24 ч реперфузии. Увел.: *a* — 6000 $\times$, *б* — 20 000 $\times$, *в* — 18 600 $\times$, *г* — 26 000 $\times$.

поперечной исчерченностью и гомогенизированной просветленной цитоплазмой, а также с измененной структурой митохондрий. В третьей фазе наблюдается дальнейшее прогрессирование морфологических нарушений, развивающихся в период ишемии в мышечной ткани на фоне истощения ингибиторов неспецифических протеиназ (Мальченко и др., 2014). Эти изменения указывают на высокий уровень эндогенной интоксикации организма продуктами нарушенного метаболизма и определяют необратимость деструктивных процессов и вероятность развития полиорганной недостаточности (Маршалов и др., 2008; Гринев, Гринев, 2010; Halestrap, 2010; Цой, Мойсюк, 2013).

Таким образом, представленные экспериментальные исследования мышечной ткани при моделировании РС показали, что при его развитии морфологическая картина сопровождается системным, резко выраженным нарушением микроциркуляции с развитием дегенеративных и деструктивных процессов в мышечной ткани, нарастающих с увеличением продолжительности постишемического периода. Следует также отметить, что при экспериментальном реперфузионном синдроме в мышечной ткани выраженность изменений напрямую коррелирует с истощением ингибиторного потенциала неспецифических протеиназ мышечной ткани (Цой, Мойсюк, 2013). Судя по характеру патоморфологических изменений и состояния протеиназ-ингибиторной системы, можно предположить, что проводить терапевтические мероприятия оптимально в первую ишемическую фазу, т. е. воспользоваться феноменом фармакологического preconditionирования для повышения толерантности скелетных мышц к ишемическому повреждению, а также в первые

часы второй фазы — ранней реперфузионной (Колесник и др., 2012; Цой, Мойсюк, 2013). С учетом прямой зависимости между выраженностью патоморфологических повреждений и дисбалансом протеиназ-ингибиторной системы вполне обоснованно включение препаратов ингибиторов протеиназ для коррекции развития реперфузионного синдрома и уменьшения деструктивных изменений в ишемической и ранней реперфузионной фазах. В дальнейшем, при пролонгировании реперфузии, с учетом степени выявленных патологических изменений проведение терапевтических мероприятий становится неэффективным.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках базовой части государственного задания по проекту № 3884, гранта Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского «АММУР-2015» (в Институт цитологии РАН) и проекта сети академической мобильности РНИЭМ.

Список литературы

- Абросимов Д. А., Яковлева Е. И., Бугрова М. Л. 2015. Количественный анализ мозгового натрийуретического пептида кардиомиоцитов крыс в раннем постреперфузионном периоде. Цитология. 57 (4) : 305—308. (Abrosimov D. A., Yakovleva E. I., Bugrova M. L. 2015. Quantitative analysis of brain natriuretic peptide of cardiac muscle cells in early postreperfusion period in rats. Tsitologiya. 57 (4) : 305—308.)
- Гапонова Т. И., Кобеляцкий Ю. Ю., Панченко Г. В. 2015. Роль корвитина и латрена в профилактике и терапии реперфузионного синдрома при реконструктивных операциях у паци-

ентов с хронической ишемией нижних конечностей. Медицина неотложных состояний. 2 : 120—124. (Haponova T. I., Kobeliatskiy Yu. Yu., Panchenko H. V. 2015. Role of corvutin and latren in the prevention and treatment for reperfusion syndrome in reconstructive surgeries in patients with chronic lower limb ischemia. Emergency Medicine. 2 : 120—124.)

Гринев М. В., Гринев К. М. 2010. Цитокин-ассоциированные нарушения микроциркуляции (ишемически-реперфузионный синдром) в генезе критических состояний. Хирургия. Журн. им. Н. И. Пирогова. 12 : 70—76. (Grinev M. V., Grinev K. M. 2010. The role of ischemic-reperfusion syndrome in critical state pathology. N. I. Pirogov J. Surgery. 12 : 70—76.)

Калинин Р. Е., Пищенко А. С., Сучков И. А. 2015. Реперфузионное повреждение тканей в хирургии артерий нижних конечностей. Новости хирургии. 23 (3) : 348—352. (Kalinin R. E., Pshennikov A. S., Suchkov I. A. 2015. Reperfusion injury of tissues in lower limb arterial reconstructive surgery. Surgery News. 23 (3) : 348—352.)

Кашибадзе К. Н., Накашидзе И. М. 2009. Оксидантно-антиоксидантные процессы в тканях при ишемическом и реперфузионном повреждениях тонкого кишечника. Патол. физиол. эксперим. терап. 2 : 19—22. (Kashibadze K. N., Nakashidze I. M. 2009. The oxidant-antioxidant processes in tissues in ischemic and reperfusion injury of the small intestine. Pathol. Physiol. Exp. Therap. 2 : 19—22.)

Колесник И. М., Ефременкова Д. А., Молчанова О. В., Трофимов К. С., Папуашвили М. М. 2012. Перспектива применения фармакологического preconditionирования в хирургии. Научные ведомости Белгород. гос. ун-та. Серия: Медицина. Фармация. 17 (4) : 13—19. (Kolesnik I. M., Efremenkova D. A., Molchanova O. V., Trofimov K. S., Papuashvili M. M. 2012. The perspective of pharmacological preconditioning in surgery. Belgorod State Univ. Sci. Bull. and Medicine. Pharmacy. 17 (4) : 13—19.)

Корейба К. А., Ключкин И. В., Максимов А. В., Фатыхов Р. И., Насруллаев М. Н. 2013. Реперфузионный синдром при сосудистой реконструкции у больных с синдромом диабетической стопы. Вестн. совр. клин. мед. 5 : 67—70. (Koreyba K. A., Klyushkin I. V., Maksimov A. V., Fatykhov R. I., Nasrullayev M. N. 2013. Reperfusion syndrome at vascular reconstruction at patients with the syndrome of diabetic foot. Bull. Contemp. Clin. Med. 5 : 67—70.)

Мальченко О. А., Анисимова Л. В., Кубышкин А. В., Харченко В. З. 2014. Состояние неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и мышечной ткани крыс при экспериментальном реперфузионном синдроме. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2 : 30—36. (Malchenko O. A., Anisimova L. V., Kubyshkin A. V., Kharchenko V. Z. 2014. The state of nonspecific proteinases and their inhibitors in

blood serum and muscular tissue of rats under experimental reperfusion injury. Actual Problems of Transport Medicine. 2 : 30—36.)

Марченко А. В., Чикинев Ю. В., Любарский М. С., Ким И. Н., Дирксен П. В. 2013. Влияние лимфостимулирующих инъекций на течение реперфузионного синдрома, возникшего после хирургической реваскуляризации нижней конечности. Вестн. эксперим. клин. хирургии. 6 (1) : 33—38. (Marchenko A. V., Chikinev Yu. V., Liubarskii M. S., Kim I. N., Dirksen P. V. 2013. Influence of lymphostimulating injections on the course of reperfusion syndrome arose after surgical lower extremity vessels revascularization. Bull. Exp. Clin. Surgery. 6 (1) : 33—38.)

Маршалов Д. В., Петренко А. П., Глушах И. А. 2008. Реперфузионный синдром: понятие, определение, классификация. Патология кровообращения и кардиохирургия. 3 : 67—72. (Marshalov D. V., Petrenko A. P., Glushach I. A. 2008. Reperfusion syndrome: concept, definition, classification. Circulation Pathol. Cardiac Surgery. 3 : 67—72.)

Тимербулатов Ш. В., Тимербулатов М. В., Султанбаев А. У. 2010. Реперфузионный синдром в абдоминальной хирургии. Мед. вестн. Башкортостана. 5 : 145—151. (Timerbulatov Sh. V., Timerbulatov M. V., Sultanbaev A. U. 2010. Bashkortostan Med. J. 5 : 145—151.)

Цой Д. Л., Мойсюк Я. Г. 2013. Профилактика и лечение ишемически-реперфузионных повреждений при трансплантации печени — возможный путь к расширению донорского пула. Вестн. трансплантол. и искусственных органов. 15 (3) : 102—114. (Tsoy D. L., Moisyuk Ya. G. 2013. Prevention and treatment of ischemia-reperfusion injury in liver transplantation-possible way to expand the donor pool. Russ. J. Transplantol. Artificial Organs. 15 (3) : 102—114.)

Carden D. L., Granger D. N. 2000. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. J. Pathol. 190 : 255—266.

Defraigne J. O., Pincemail J. 1998. Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. Physiopathology and prevention. Acta Chir. Belg. 98 : 176—186.

Halestrap A. P. 2010. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. Biochem. Soc. Trans. 38 : 841—860.

Mansour Z., Charles A. L., Bouitbir J., Pottecher J., Kindo M., Mazzucotelli J.-P., Zoll J., Geny B. 2012. Remote and local ischemic preconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. J. Vasc. Surg. 56 : 774—782.

Song S. Q., Gan H. L., Zhang J. Q., Feng L., Sun J. C., Wang S. X. 2015. Post-conditioning through lower limb ischemia-reperfusion can alleviate lung ischemia-reperfusion injury. Int. J. Clin. Exp. Med. 8 : 14 953—14 961.

Поступила 9 VI 2016

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES OF THE SKELETAL MUSCLES UNDER FORMATION OF THE REPERFUSION SYNDROME

L. V. Anisimova,¹ A. V. Kubyshkin, L. L. Aliev, Ye. Yu. Bessalova, V. Z. Kharchenko

V. I. Vernadsky Crimean Federal University
Medical Academy named after S. I. Georgievsky, Simferopol, 95007;
¹ e-mail: anisanisl@mail.ru

Analysis of pathomorphological changes which taking place in muscle tissue after reperfusion of previously ischemic rats limbs allowed to identify three phases of the experimental reperfusion syndrome (RS): the first or ischemic, the second or initial reperfusional, the third or late reperfusional. Morphological changes of the skeletal muscles in the first stage are characterized by presence of dystrophic-necrotic processes and reflect the compensatory-adaptive reaction of the organism to hypoxia. In the third stage one can see the progress of morphological damages, which develop during the ischemic period against a background of exhaustion of proteinase inhibitors. This indicates the intensity of endogenous intoxication of the organism with the products of disturbed metabolism and determines the irreversibility of destructive processes and probability of multiple organ failure. Proceeding from the character of the pathomorphological changes and the state of proteinase-in-