

СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ПРИ ТРАВМУВАННІ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА

У статті наведено результати ультраструктурних та біохімічних досліджень динаміки атрофії скелетних м'язів щурів при моделюванні великих дефектів периферичного нерва. На біохімічному рівні встановлено порушення обміну незамінних амінокислот на тлі загальної динаміки протеолізу в м'язах; на морфологічному рівні – деструкція м'язових волокон, саркомерів скоротливих міофібрил і зміни мікроциркуляторного русла м'язу. Результати досліджень показали прогресування атрофії м'язів гомілки щурів при проксимальній травмі сідничого нерва, на що впливають зміни мікроциркуляції та обмін незамінних амінокислот.

Ключові слова: скелетний м'яз, травма нерва, мікроциркуляція, амінокислоти.

ВСТУП

Скелетні м'язи відіграють ключову роль у створенні оптимальних умов для відновлення нормальної трофіки та функції травмованої кінцівки [2, 3, 5]. Репаративні можливості м'язової тканини суттєво відрізняються від аналогічних можливостей репаративного відновлення травмованих кісток і нервів. У зв'язку із цим саме функціональний стан скелетних м'язів є лімітуючим фактором ефективного відновлення та реабілітації хворих ортопедо-травматологічного профілю [8,12].

Відновлення скелетних м'язів залежить від їх структурно-функціональних особливостей і визначається закономірностями тканинного обміну, і, в першу чергу, характером енергозабезпечення [10, 11]. В скелетних м'язах метаболічні процеси знаходяться під жорстким нейротрофічним контролем та контролем системних і локальних чинників, але в умовах травматичного ушкодження нерва відмічається значна пластичність метаболізму м'язових елементів [9]. При денервації в скелетних м'язах відбуваються процеси розладу енергетичних шляхів обміну, в тому числі резервних шляхів енергетичного обміну (цикл Корі, аланіновий цикл, тощо), що призводить до реакцій переокислення білків та ліпідів, і, як наслідок, розлади протеїнового обміну в м'язовій тканині. Імовірно важливим є не тільки факт денервації а і безпосередній вплив самої травми на стан м'язової тканини, крім того, існує думка, що медіатори, що залишаються в дистальному кінці ушкодженого нерва впливають на підтримання обмінних процесів у м'язах, тому метою нашої ро-

боти було вивчення порівняльної оцінки денерваційних змін, атрофії та відновлення метаболічного профілю в м'язах гомілок щурів при різній локалізації місця травми сідничого нерва: на значній відстані та безпосередньо біля м'язу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальне дослідження було проведено на білих щурах-самцях лінії WKY (200–215г), що утримувались при контрольованих умовах температури ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), вологості ($55,0 \pm 5,0\%$) і світлового періоду. Тварини мали вільний доступ до стандартного гранульованого комбінованого корму і питної води. Моделювання великого дефекту периферичного нерва здійснювали на задній кінцівці щура. Доступ до сідничого нерва виконували в середньо-верхній третині задньої кінцівки щура, розсікали шкіру та м'які тканини, виділяли сідничний нерв, на рівні верхньої або нижньої третини нерва видаляли фрагмент довжиною 1 см. Рану зрошували розчином антибіотиків (Біцилін–3, “Arterium”, Україна) і зашивали.

Премедикацію дослідних тварин здійснювали шляхом введення тіопенталу натрію (і.р., 50 мг/кг). Експериментальні маніпуляції проводили відповідно до правил “Regulations on the animal use of in research biomedical research”, “European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes”, “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Через 30 діб після проведеної операції щурів повторного наркотизували тіопенталом натрію та здійснювали видалення і підготовку скелетних м'язів гомілки щурів для ультраструктурного та біохімічного дослідження. Для електронномікроскопічного дослідження фрагменти м'язів фіксували 2,5% розчином глутарового альдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією у 1% забуференому розчині чотирьохокису осмію. Зневоднення проводили у спиртах зростаючої концентрації (70%, 80%, 90%, 100%) та ацетоні. Досліджувані зразки просочували та заливали у суміш епон-аралдит згідно загальноприйнятої методики. Для прицільної орієнтації напівтонкі зрізи профарбовували толудіновим синім, після чого на

ультратомі Reihart (Австрія) виготовляли ультратонкі зрізи. Контрастування проводили 2% розчином ураніацетату та цитратом свинцю. Ультратонкі зрізи досліджували та фотографували під електронним мікроскопом Tescan Mira 3 LMU (Чехія) при збільшеннях в 6–40 тисяч.

Морфометричний аналіз проводили на електронограмах і напівтонких зрізів за допомогою мікроскопу Olympus BX 51 (Японія) і програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1). Для кількісної оцінки гіпотрофічного процесу при експериментальній денервації м'язів були обрані наступні морфометричні показники: 1) площа поперечного перерізу м'язових волокон, як показника їх набряку та дистрофії; 2) кількість ядер м'язових волокон (міоядер); 3) площа ядер м'язових волокон, як маркер метаболічних (синтетичних) змін; 4) площа поперечного перерізу структурних елементів мікроциркуляторного русла (МЦР), як показника змін регіонарної мікроциркуляції.

Амінокислотний (АК) склад білків визначали за методом, що описаний в роботі Moor S. (1951) [6]. Гідроліз білків здійснювали 6н соляною кислотою при температурі 110°C впродовж 2 годин. Порівняння отриманих результатів здійснювали за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Рівень статистичної значущості був встановлений на рівні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З літературних даних відомо, що ушкодження периферичних нервів викликають зміни гемодинаміки в скелетних м'язах [1], що відображається на зміні компонентів мікроциркуляторного русла (МЦР). Просторова організація МЦР скелетних м'язів визначає активність обмінних процесів і залежить від ступеню ушкодження нерва та іннервованого ним м'язу. Реакція мікросудин в зоні ушкодження є однією із найбільш ранніх і має безпосереднє відношення до розвитку запалення, атрофії і регенерації м'яза. При цьому результат ефективної регенерації периферичного нерва та іннервації м'яза-ефектора відбуваються в умовах відновлення васкуляризації, оскільки при низькій або порушеній регіонарній гемодинаміці атрофія м'язів і навколишніх тканин прогресує, а процеси регенерації за таких умов блокуються.

В проведених дослідженнях встановлено залежність МЦР від локалізації травми. Спостерігали різко виражену дилатацію мікросудин денервованих м'язів, особливо гемокапілярів та посткапілярних венул (табл. 1). Площа поперечного перерізу судин МЦР не мала суттєвої різниці при різній локалізації ушкодження периферичного

нерва, проте встановлено збільшення просвіту артеріол при дистальній травмі нерва на 14% і відповідну тенденцію в гемокапілярах і венулах. Порушення мікроциркуляції при високих ушкодженнях нерва можуть бути пов'язані із розвитком лактат-ацидозу та інтоксикації продуктами проміжного обміну ушкодженого м'яза, що прискорює структурно-метаболічні зміни м'язових волокон та їх атрофію. При цьому збільшення регіонарної перфузії при дистальній травмі може бути викликано впливом запальної реакції як відповідь на близьку до м'язу травму.

Таблиця 1

Морфометричні показники мікроциркуляторного русла скелетного м'язу після травматичного пошкодження нерва

Група	Площа поперечного перерізу судин мікроциркуляторного русла, мкм ²		
	Артеріола	Капіляр	Венула
Контроль	527,1±75,8	188,3±28,6	343,5±51,1
Дистальна невротомія	601,3±53,0*	247,6±32,6*	935,4±66,4*
Проксимальна невротомія	571,5±41,3	228,5±16,5*	812,6±75,6*

Умовні позначення: * – достовірно до показників контрольної групи ($p < 0,05$).

За результатами біохімічних досліджень встановлено особливості дистрофічних змін в м'язах у відповідь на різну локалізацію травматичного ушкодження периферичних нервів (табл. 2). Загальний вміст білка (амінокислот) при дистальній травмі зменшився на 15,7%, а при проксимальній відповідно на 34,8%, тобто при високих ушкодженнях динаміка протеолізу в денервованих кінцівках прогресує майже в 2 рази більше. При цьому при дистальній травмі зменшувався пул вільних амінокислот в середньому в 4,2 рази, що

Таблиця 2

Зміни рівня амінокислот в скелетних м'язах кінцівки щура при ушкодженні периферичного нерва, мкг/г

Показник	Контроль	Дистальна травма	Проксимальна травма
Загальний рівень зв'язаних амінокислот	305,5±2,6	257,4±6,2*	199,2±2,5*,**
Загальний рівень вільних амінокислот	5546,1±4,9	1327,1±3,2*	5683,5±3,2**
Вміст зв'язаних незамінних амінокислот	105,8±1,8	105,5±2,9	105,5±2,4
Вміст вільних незамінних амінокислот	904,1±2,2	324,7±2,8*	1486,6±3,2*,**

Примітка: * – достовірно до контролю ($p < 0,05$), ** – достовірно до показників при дистальній травмі ($p < 0,05$).

може бути пов'язано із їх залученням до синтезу білка, що підтверджується змінами перерозподілу незамінних амінокислот. При дистальній травмі зменшувався рівень вільних амінокислот (валін, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, метіонін, лізин і треонін) в 3 рази, а при проксимальній збільшувався порівняно із контрольним показником в 1,6 разів. Ці данні свідчать про те, що при високих ушкодженнях нерва в денервованому м'язі динаміка атрофічних змін (за рівнем розпаду м'язових білків, протеолізу) прогресує в більшій мірі, ніж при дистальній травмі.

Електронномікроскопічні дослідження дозволили оцінити структурні та кількісні зміни м'язових волокон. В першу чергу встановлено зменшення діаметру м'язових волокон при проксимальній травмі на 18,4%, що спричинено їх атрофією та деструкцією скоротливих білкових елементів (актин-міозинових комплексів) і елімінацією саркомерів. На ультраструктурному рівні встановлено дезорганізацію або збільшення довжини саркомерів в 1,6 разів, а при дистальній травмі відмічено часткове збереження структурної організації м'язових волокон та саркомерів, в деяких ділянках відмічено їх перескорочення (на 39,1%), можливо за рахунок набряку від впливу близької травми (рис. 1; табл. 3).

При високій невротомії атрофія денервованого м'язу супроводжувалась пікнозом ядер м'язових волокон (рис. 1), зменшенням їх метаболічної активності, що відображено у зменшенні площі і кількості. Навколо м'язових волокон відмічено збільшення інтерстиційного простору, дезорганізацію стромальних елементів перимізію, особливо на поперечному зрізі досліджуваних м'язів.

Таблиця 3

Морфометричні зміни скелетних м'язів при травмуванні периферичного нерва

Площа поперечного перерізу м'язових волокон, мкм ²		
1	Контроль	3204,6±238,4
2	Дистальна невротомія	4139,8±381,5*
3	Проксимальна невротомія	2615,8±534,5*
Кількість ядер на м'язове волокно		
1	Контроль	3,03±0,38
2	Дистальна невротомія	2,37±0,27*
3	Проксимальна невротомія	2,43±0,26*
Площа ядер м'язових волокон, мкм ²		
1	Контроль	17,00±0,90
2	Дистальна невротомія	14,51±1,12
3	Проксимальна невротомія	14,13±1,19
Довжина саркомера, мкм		
1	Контроль	1,74±0,06
2	Дистальна невротомія	1,06±0,03*
3	Проксимальна невротомія	2,83±0,14*,**

Примітка: * – достовірно порівняно і контролем (p<0,05); ** – достовірно порівняно з дистальною травмою (p<0,05).

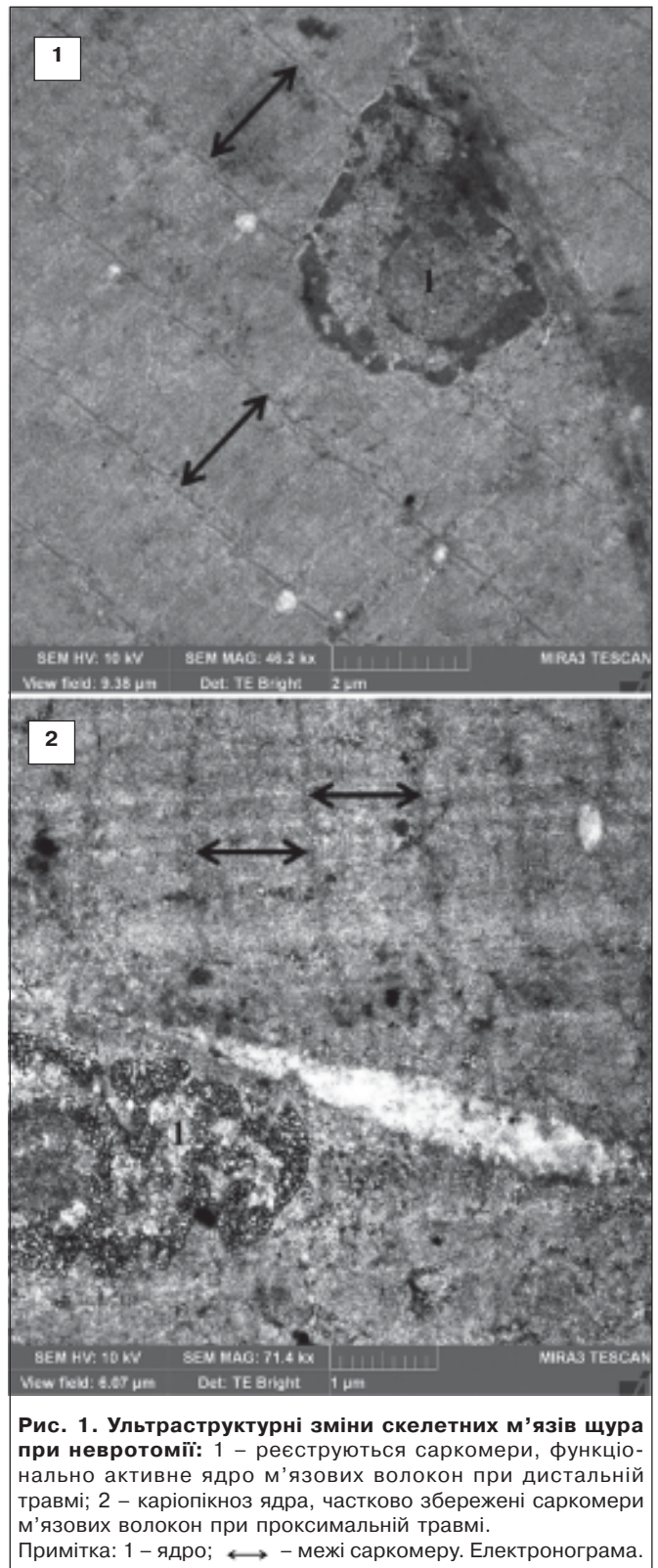


Рис. 1. Ультраструктурні зміни скелетних м'язів щура при невротомії: 1 – реєструються саркомери, функціонально активне ядро м'язових волокон при дистальній травмі; 2 – каріопікноз ядра, частково збережені саркомери м'язових волокон при проксимальній травмі. Примітка: 1 – ядро; ↔ – межі саркомеру. Електроннограма.

Таким чином, структурні зміни м'язу і динаміка протеолізу є основними маркерами гіпотрофічних процесів при тривалій денервації. Результати експериментальних досліджень показали, що при дистальній і проксимальній травмі периферичного нерва відбувається протеоліз, динаміка якого прогресує при високій невротомії. Перерозподіл пулу незамінних амінокислот є дуже важливою з точки зору розуміння розвитку атро-

фічного процесу та зовнішньої підтримки відновних процесів у м'язах [4,7]. Реакція тканин на травму в безпосередній близькості до м'язу впливає позитивно на процеси підтримання його життєдіяльності порівняно з м'язами, де травма нерва відбулась на певній відстані від м'язу. Разом із тим відновлення регіонарної гемодинаміки є важливим чинником у підтримці денервованого м'язу як в період запальної реакції на травму так і в період регенерації травматично ушкодженого нерва.

ВИСНОВКИ

1. Динаміка атрофічних змін скелетних м'язів визначається локалізацією ушкодження периферичного нерва і прогресує при високих ушкодженнях. На морфологічному рівні зміни м'язової тканини реєструвалися у вигляді деструкції м'язових волокон і змін мікроциркуляторного русла; на біохімічному рівні – у зменшенні рівня загального білка м'язу, змін амінокислотного обміну.

2. Метаболічні зміни амінокислотного обміну денервованих м'язів полягають у перерозподілі вмісту замінних і незамінних амінокислот та виведенню останніх із м'язового протеїногенного пулу при високих ушкодженнях нерва, що можуть бути використано для розробки підходу для зовнішньої підтримки та стимуляції м'язів до відновлення.

3. В тривало денервованому м'язі встановлено зміни функціонування мікроциркуляторного русла, різку дилатацію капілярної та посткапілярної ланки при високих ушкодженнях нерва і збільшенні просвіту артеріол при дистальній травмі, що свідчить про покращення мікроциркуляції, і може бути пов'язано з неспецифічною реакцією м'язів на безпосередньо близький осередок травми.

ЛІТЕРАТУРА

1. Серов А.М. Сочетанные повреждения артерий, нервов и сухожилий предплечья // Вестник хирургии. – 2004. – № 1. – С. 115 – 119.
2. Ashley Z. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year // Am. J. Physiol. – 2007. – Vol. 292. – P. 440 – 441.
3. Boahene K.D. Principles and biomechanics of muscle tendon unit transfer: application in temporalis muscle tendon transposition for smile improvement in facial paralysis // Laryngoscope. – 2013. – Vol. 123(2). – P. 350-355.
4. Bergantin L.B., Figueiredo L.B., Godinho R.O. The lumbrical muscle: a novel in situ system to evaluate adult skeletal muscle proteolysis and anticatabolic drugs for therapeutic purposes // J. Appl. Physiol. – 2011. – Vol. 111(6). – P. 1710-1718.
5. Bersaneti JA, Viterbo F, Jorge J, Denadai R. Muscle reinnervation in one or two stages?: experimental study in rats with end-to-side nerve graft // Acta Cir Bras. – 2012. – Vol. 27(12). – P. 841-847.
6. Moor S. The chromatographie of aminoacids on sulfonated polystyrene resins / S. Moor, W.H. Stein // J. Biol. Nhem. –

1951. – Vol. 192. – P. 2830-2839.

7. Porter C., Cotter M., Diaz E.C., Jennings K., Herndon D.N., Børsheim E. Amino acid infusion fails to stimulate skeletal muscle protein synthesis up to 1 year after injury in children with severe burns // J. Trauma Acute Care Surg. – 2013. – Vol. 74(6). – P. 1480-1485.
8. Ruijs A. Median and ulnar nerve injuries: A meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair / A. Ruijs, J. Jaquet, S. Kalmijn et al. // Plast. Reconstr. Surg. – 2005. – Vol. 116 (2). – P. 484-494.
9. Stipp-Brambilla EJ, Viterbo F, Labbé D, Garbino JA, Bernardelli MM. Double muscle innervation using end-to-side neurorrhaphy in rats // Sao Paulo Med J. – 2012. – Vol. 130(6). – P. 373-379.
10. Swartz KR, Boland M, Fee DB. External neurolysis may result in early return of function in some muscle groups following brachial plexus surgery // Clin Neurol Neurosurg. – 2012. – Vol. 114(6). – P. 768-775.
11. Ting J.Y., Dehdary A. Acute severe non-traumatic muscle injury following reperfusion surgery for acute aortic occlusion: case report // Int. J. Emerg. Med. – 2011. – Vol. 4(1). – P. 20.
12. Vural M., Arslanta A. Delayed radial nerve palsy due to entrapment of the nerve in the callus of a distal third humerus fracture // Turkish neurosurgery. – 2008. – Vol. 18(2). – P. 194-196.

Страфун С. С., Гайович В. В., Макаренко О. М., Савосько С. І.

Клиника микрохирургии и хирургии кисти, ГУ «Институт травматологии и ортопедии АМН Украины», Киев, Украина

Структурно-метаболические изменения скелетных мышц при травме периферического нерва

В статье приведены результаты ультраструктурных и биохимических исследований динамики атрофии скелетных мышц крыс при моделировании больших дефектов периферического нерва. На биохимическом уровне установлено нарушение обмена незаменимых аминокислот на фоне общей динамики протеолиза в мышцах; на морфологическом уровне – деструкция мышечных волокон, саркомеров сократительных миофибрилл и изменения микроциркуляторного русла мышцы. Результаты исследований показали прогрессирования атрофии мышц голени крыс при проксимальной травме седалищного нервов, на что влияют изменения микроциркуляции и обмен незаменимых аминокислот.

Ключевые слова: скелетная мышца, травма нерва, микроциркуляция, аминокислоты.

Strafun S., Gayovich V., Makarenko O., Savosko S.

Clinic of microsurgery and reconstructive surgery of the hand, Institute of Traumatology and Orthopedics NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Structural and metabolic changes in skeletal muscle after peripheral nerve injury

The article presented results of ultrastructural and biochemical markers skeletal muscle atrophy after modeling large peripheral nerve defects in rats. At the biochemical level we set metabolism disruption of essential amino acids in overall dynamics of proteolysis in muscle; at the morphological level – destruction of muscle fibers, myofibrils sarcomeres and microcirculation. The results showed progression of atrophy of the shin muscles in rats with sciatic nerve proximal injury, the affected on microcirculation and exchange of essential amino acids.

Key words: skeletal muscle, nerve injury, microcirculation, amino acids.