

ПАТОМОРФОЛОГИЯ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ И МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Н. А. Лычева^{1,2}, И. И. Шахматов¹, В. И. Киселев¹, И. П. Бобров¹, А. В. Лепилов¹, А. Ю. Долгатов¹

¹ Кафедра судебной медицины имени профессора В. Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул

² Алтайский филиал ФГБУ НИИ физиологии и фундаментальной медицины, г. Барнаул

Аннотация: В статье описаны результаты изучения воздействия гипотермии на скелетную мускулатуру и микроциркуляторное русло крыс в эксперименте. Гипотермию моделировали путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду температурой 5 °С при температуре окружающего воздуха 7 °С. Показано, что наряду с повреждающим воздействием на мышечную ткань и микроциркуляторное русло гипотермия является мощным активатором активности тучных клеток и макрофагов. Внутритканевые тучные клетки и макрофаги являются важными факторами в процессе адаптации организма на воздействие гипотермии.

Ключевые слова: гипотермия, микроциркуляторное русло, тучные клетки, макрофаги

PATHOMORPHOLOGY OF SKELETAL MUSCULATOR AND MICROCIRCULATORY VASCULAR BED IN EXPERIMENTAL HYPOTHERMISM

Lychova N.A., Shakhmatov E.E., Kiselev V.E., Bobrov E.P., Lepilov A.V., Dolgatov A.U.

Abstract: The article describes the results of studying the effect of hypothermia on skeletal muscles and microcirculatory vascular bed of rats in the experiment. Hypothermia was modeled by placing animals in individual cells in water at the temperature of 5 °C, at an ambient temperature of 7 °C. It is shown that along with the damaging effect on muscle tissue and microcirculatory vascular bed, hypothermia is a powerful activator of the mast cells' and macrophages' activity. Interstitial mast cells and macrophages are important factors in the process of adaptation of the body to the effect of hypothermia.

Keywords: hypothermia, microcirculatory vascular bed, mast cells, macrophages

<http://dx.doi.org/10.19048/2411-8729-2017-3-2-12-16>

♦ ВВЕДЕНИЕ

Изучение закономерностей адаптации организма к факторам окружающей среды является фундаментальной задачей судебной медицины [1]. Гипотермия – это важнейший фактор, воздействующий на организм человека.

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные гибели людей на холоде, диагностика холодовой смерти и, соответственно, смертельной гипотермии продолжает оставаться актуальной. В настоящее время достаточно полно изучены многие аспекты вредного воздействия холодового фактора на организм человека, а также разработаны диагностические и дифференциально-диагностические критерии смерти от гипотермии, однако целостное представление по вопросу адаптации организма к холоду в судебно-медицинской науке и практике к настоящему моменту отсутствует [2]. Изучению данного вопроса могут способствовать целенаправленные экспериментальные исследования.

Известно, что локальное и общее переохлаждение организма часто способствует возникновению миодистрофий. Вместе с тем клинические наблюдения с использованием функциональных методов исследования только усугубляют расхождение во взглядах на роль холодового фактора в возникновении данного феномена [3]. Поэтому результаты экспериментальных морфологических исследований по изучению реакции мышечных волокон на гипотермию [4; 5], на наш взгляд, могут иметь научно-практическую ценность.

Система микроциркуляции (МЦ) – это одна из первых систем, которые вовлекаются в патологические процессы при различных воздействиях на организм [6]. Быстрота

и своеобразие ответа МЦ на экстремальные воздействия делают перспективным изучение этой системы для анализа закономерностей, происходящих в организме при переохлаждении [7]. Однако экспериментальных работ, посвященных изучению влияния гипотермии на МЦ, в литературе крайне мало.

По современным представлениям, тучные клетки (ТК) являются ключевым звеном воздействия на метаболические процессы при адаптации к стрессу и гипоксии [8–10]. В то же время исследованию значения ТК при гипотермии посвящены лишь единичные работы [11; 12]. Так, О. А. Бобр и соавт. (2006) наблюдали увеличение числа ТК в тканях крыс, подвергнутых гипотермии. Работ, посвященных морфологическим особенностям макрофагов при гипотермии, в литературе нами не обнаружено.

Таким образом, целью исследования явилось изучение влияния гипотермии на морфологию скелетной мышечной ткани, микроциркуляторное русло, тучные клетки и макрофаги крыс в эксперименте.

♦ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 15 крысах линии Wistar. Гипотермию моделировали путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду температурой 5 °С при температуре окружающего воздуха 7 °С. Критерием прекращения воздействия служило достижение животными ректальной температуры 20–25 °С, что соответствовало глубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и в среднем составляло (40 ± 5) мин. В ходе эксперимента животные были разделены на две группы. Животные 1-й группы

Таблица 1

Морфометрические параметры мышечных волокон скелетной мускулатуры крысы в норме и при гипотермии

Параметры мышечных волокон	Норма (n=5)	Сразу после гипотермии (n=5)	Через 5 дней после гипотермии (n=5)
ПМВ	36,2 ± 2,2*	25,8 ± 1,9*	23,8 ± 1,0
Толщина (мкм)	30,8 ± 1,9*	50,4 ± 3,0*	51,6 ± 2,6
Диаметр (мкм)	34,1 ± 1,3*	66,4 ± 2,3*	94,9 ± 5,9*
Площадь поперечного сечения (мкм ²)	1039,6 ± 43,3*	2764,3 ± 270,3*	4156,7 ± 394,9*
Площадь ядра (мкм ²)	36,3 ± 2,9*	55,1 ± 2,0*	61,9 ± 4,9*

*Примечание: данные достоверны при $p < 0,05$.

Таблица 2

Морфометрические параметры микроциркуляторного русла, тучных клеток и макрофагов скелетной мускулатуры крысы в норме и при гипотермии

Параметры	Норма (n=5)	Сразу после гипотермии (n=5)	Через 5 дней после гипотермии (n=5)
ПМЦР	9,6 ± 1,7*	6,6 ± 0,7*	5,8 ± 0,7*
Индекс Керногена (ед.)	4,0 ± 0,5	4,4 ± 1,5*	1,6 ± 0,2*
Число макрофагов	3,6 ± 0,5	3,0 ± 0,2	3,6 ± 0,2
Площадь макрофагов (мкм ²)	116,2 ± 7,5*	142,9 ± 14,2*	188,2 ± 15,6*
Число тучных клеток	1,2 ± 0,2*	1,8 ± 0,4*	4,6 ± 0,4*
Площадь тучных клеток (мкм ²)	94,0 ± 20,7*	130,9 ± 16,9*	167,1 ± 13,4*
ИДТК (%)	26,8	30,7	83

*Примечание: данные достоверны при $p < 0,05$.

умерщвлялись сразу после прекращения охлаждения, животные 2-й группы – через 5 суток после прекращения охлаждения. Также морфологические исследования проводились у интактных животных, которые служили группой контроля.

Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине, забуференном по Лилли. Проводку материала осуществляли по изопропиловому спирту с помощью автомата проводки карусельного типа TISSUE-TEK VIPTM6 (Sakkura, Япония), заливали в парафин при помощи станции парафиновой заливки TISSUE-TEK TEC 5 (Sakkura, Япония). Гистологические срезы толщиной 4–7 мкм получали с использованием роторного микротомы Accu-Cut SRM (Sakkura, Япония) и окрашивали гематоксилином и эозином, на коллаген – по ван Гизону, на эластические волокна резорцин-фуксином – по Вейгерту и 1 % спиртовым раствором орсеина, на аргирофильные волокна – по Гомори, на нейтральные гликозаминогликаны Шифф-раствором – по Мак-Манусу и на кислые гликозаминогликаны 1 % раствором альцианового синего на 3 % уксусной кислоте (pH – 2,5) – по Сиддмену. Тучные клетки выявляли 0,1 % водным раствором толуидинового синего (pH – 3,9). Цифровые микрофотографии микропрепаратов получали с помощью микроскопа Zeiss Standard 20 (Германия) и цифровой видеокамеры VIDI CAM (Россия). Подсчет плотности распределения мышечных волокон (ПМВ), сосудов микроциркуляторного русла (ПМЦР), макрофагов (МФ) и тучных клеток проводили в пяти полях зрения при увеличении микроскопа ×400. Высчитывали индекс Керногана (отношение

толщины стенки сосуда к ширине просвета), который показывает, во сколько раз толщина стенки сосуда меньше просвета сосуда. Морфометрию осуществляли в морфометрических программах UTHSCSA Image Tool 3.0 (разработанной в University of the Texas Health Science Center of San Antonio, Texas, США) и Image J.

Статистическую обработку материала проводили при помощи статистического пакета Statistica 6.0. Если при проверке статистических гипотез распределение данных было нормальным, то применяли методы параметрической статистики (t-test Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критериям нормального распределения (критерий Шапиро – Уилка $W = 0,89$, $p < 0,01$), то применяли методы непараметрической статистики: тест Колмогорова – Смирнова или U-тест Манна – Уитни. Данные считали достоверными при $p < 0,05$.

♦ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что у крыс контрольной группы (без воздействия гипотермией) поперечнополосатые мышцы не были подвержены морфологическим изменениям (рис. 1, а). На продольных срезах отчетливо была видна поперечная исчерченность мышечных волокон (МВ). ПМВ в пяти полях зрения при увеличении ×400 составила (36,2 ± 2,2). Ширина МВ составила (30,8 ± 1,9) мкм, диаметр – (34,1 ± 1,3) мкм, площадь поперечного сечения – (1039,6 ± 43,3) мкм² (табл. 1). Палочковидные или овальные ядра располагались по периферии мышечных клеток. Средняя площадь ядра была равна (36,3 ± 2,9) мкм². В эндомизии, между МВ, в незначительном количестве располагались тонкие аргирофильные волокна. Явления воспаления отсутство-

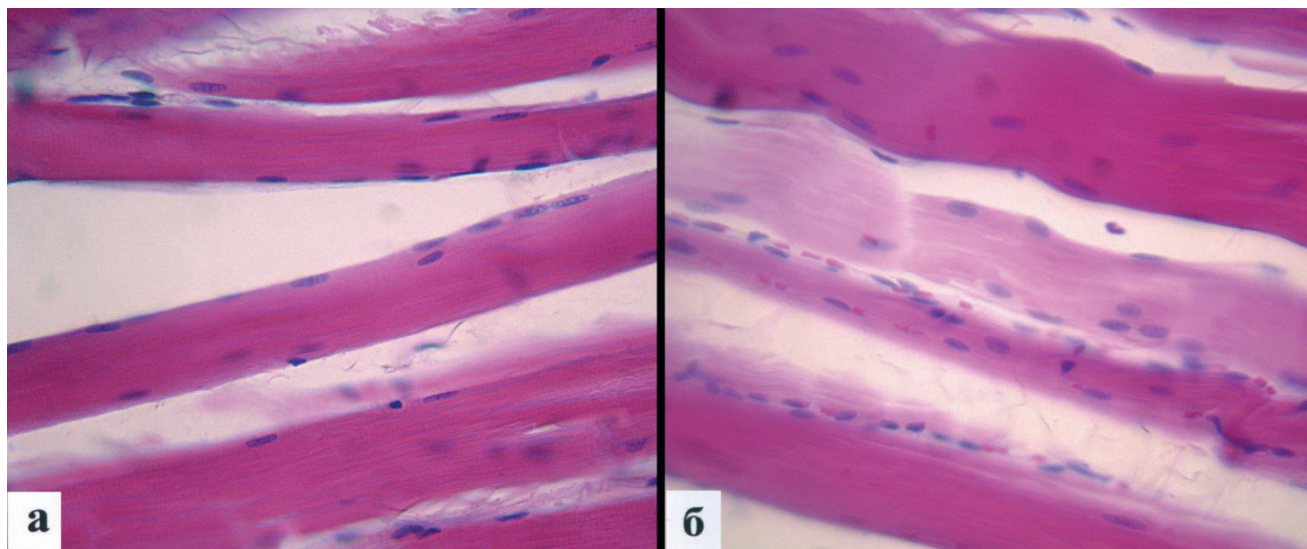


Рис. 1: а – поперечнополосатая скелетная мускулатура обычного гистологического строения у крысы контрольной группы; б – дистрофические изменения и миоцитоллиз мышечного волокна у крысы на 5-й день после воздействия глубокой гипотермии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

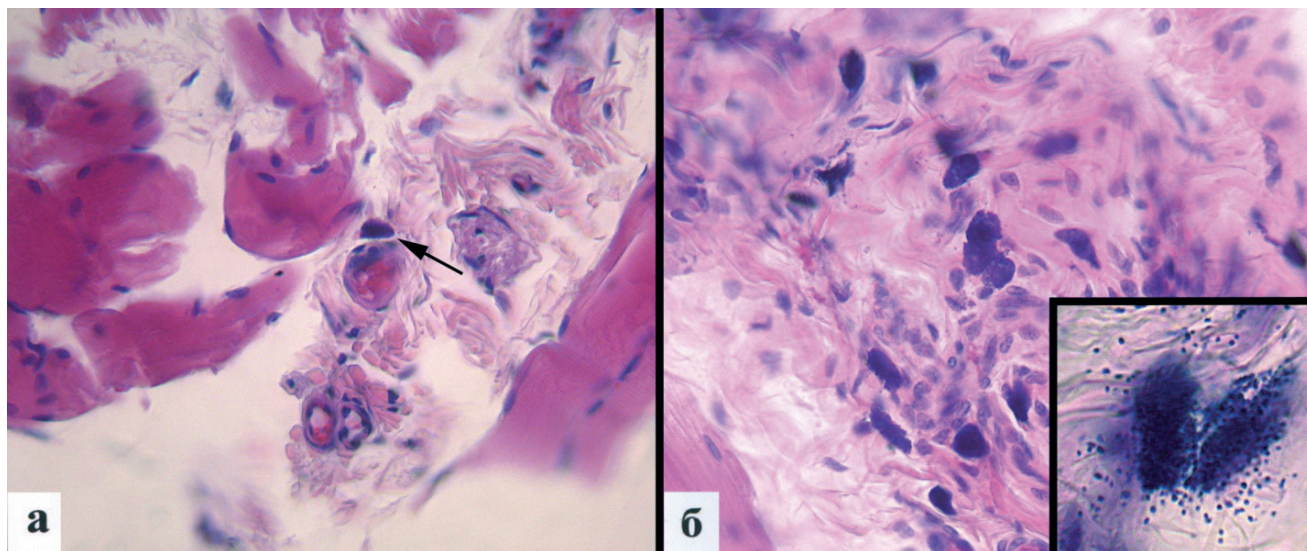


Рис. 2: а – единичная тучная клетка в мышечной ткани крысы контрольной группы (показана стрелкой); б – большое количество тучных клеток в мышце крысы на 5-й день после воздействия глубокой гипотермии (в рамке, в правом углу, тучные клетки в состоянии дегрануляции). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

вали, в мышечной ткани отмечались лишь единичные лимфоциты и плазматические клетки.

Сосуды у крыс контрольной группы имели округлую форму, содержали небольшое количество эритроцитов. ПМЦР в пяти полях зрения при увеличении $\times 400$ составила $(9,6 \pm 1,7)$. Индекс Керногана составил $(4,0 \pm 0,5)$ (табл. 2). По ходу сосудов располагались МФ и ТК (рис. 2, а). МФ имели круглую или овальную форму и были расположены единично или группами по 2–5 клеток. Среднее количество МФ составило $(3,6 \pm 0,5)$, площадь МФ составила $(116,2 \pm 7,5)$ мкм². ТК имели округлую или вытянутую форму, количество их варьировало от 1 до 2, среднее число составило $(1,2 \pm 0,2)$. Площадь ТК составила $(94,0 \pm 20,7)$ мкм². Гранулы в цитоплазме ТК располагались компактно, дегрануляцию отмечали в небольшом количестве клеток. ИДТК составил 26,8 %.

Также выявляли наличие единичных ТК в нервных стволах.

При смерти, наступившей сразу после глубокой гипотермии, поперечнополосатые мышцы находились в состоянии выраженного отека. На продольных срезах в мышцах поперечная исчерченность была видна не отчетливо. ПМВ составила $(25,8 \pm 1,9)$. Определялись участки бледно окрашенных МВ. Ширина МВ составила $(50,4 \pm 3,0)$ мкм, диаметр – $(66,4 \pm 2,3)$ мкм, площадь поперечного сечения – $(2764,3 \pm 270,3)$ мкм² (табл. 1). Ядра МВ были увеличены в размерах и расположены не только по периферии, но и в центре клеток. Площадь ядра МВ составила $(55,1 \pm 2,0)$ мкм².

Между МВ, в эндомизии, отмечали явления выраженного интерстициального отека и выраженную инфильтрацию клетками воспалительного инфильтрата, которые были

представлены лимфоцитами, плазматическими клетками, моноцитами и нейтрофилами. Отмечали явления выраженного периваскулярного и периваскулярного отека.

Сосуды при смерти сразу после гипотермии были патетически расширены и полнокровны. ПМЦР составила $(6,6 \pm 0,4)$. Индекс Керногана составил $(4,4 \pm 1,5)$ (табл. 2). По ходу сосудов и вокруг них располагались МФ и ТК. МФ имели преимущественно вытянутую форму. Число МФ варьировало от 2 до 4, среднее количество их составило $(3,0 \pm 0,2)$, площадь МФ – $(142,9 \pm 14,2)$ мкм². ТК имели овальную или неправильную форму, количество их варьировало от 1 до 3 в поле зрения, среднее число ТК составило $(1,8 \pm 0,4)$. Площадь ТК $(130,9 \pm 16,9)$ мкм². Число клеток, находившихся в состоянии дегрануляции, возрастало по сравнению с контрольной группой, ИДТК составил 30,7%. Отмечали наличие ТК в нервных стволах.

На пятые сутки проведения эксперимента, после гипотермии поперечнополосатые мышцы находились в состоянии выраженного отека. На продольных срезах поперечная исчерченность МВ была видна не отчетливо, на поперечных срезах присутствовали явления гидропической дистрофии, отдельные мышечные волокна находились в состоянии миоцитолита (рис. 1, б). ПМВ составила $(23,8 \pm 1,9)$. Ширина МВ – $(51,6 \pm 2,6)$ мкм, диаметр – $(94,9 \pm 5,9)$ мкм, площадь поперечного сечения – $(4156,7 \pm 394,9)$ мкм² (табл. 1). Ядра в большинстве случаев были расположены в центре МВ и имели овальную или круглую форму, количество ядер в мышечных клетках было увеличено. Средняя площадь ядра составила $(61,9 \pm 4,95)$ мкм². В эндомизии отмечали явления выраженного интерстициального отека. Между МВ присутствовали диффузные и периваскулярные воспалительные инфильтраты, которые состояли из лимфоцитов, плазматических клеток, нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и фибробластов.

Сосуды на пятые сутки эксперимента имели округлую форму, были полнокровны, просвет их был сужен. ПМЦР составила $(5,8 \pm 0,7)$. В стенках артерий отмечали накопление кислых глюкозаминогликанов. Значение индекса Керногана составило $(1,6 \pm 0,2)$ (табл. 2). Вокруг сосудов определялись явления периваскулярного склероза. Капилляры имели извитой характер и были выстланы набухшим эндотелием. По ходу сосудов и в их адвентиции находились МФ и ТК. МФ имели веретеновидную или неправильную форму. Число МФ варьировало от 3 до 4, среднее количество их составило $(3,6 \pm 0,2)$, площадь поперечного сечения – $(188,2 \pm 15,6)$ мкм². ТК имели преимущественно неправильную форму, количество их составляло 2–12 в поле зрения, среднее число – $(4,6 \pm 0,4)$ и площадь сечения – $(167,1 \pm 13,4)$ мкм². Большинство клеток находилось в состоянии дегрануляции (рис. 2, б). ИДТК значительно возрастал и составил 83%. Отмечали возрастание числа ТК в нервных стволах.

◇ ВЫВОДЫ

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что глубокая гипотермия оказывает повреждающее воздействие на скелетную мускулатуру и сосуды микроциркуляторного русла у крыс. Повреждение проявляется явлениями выраженного воспаления, вакуольной дистрофией, миоцитоллизом мышечных волокон, редукцией кровеносных сосудов и уменьшением значения индекса Керногана. Но в то же время на фоне альтерации и гипоксии тканей возрастает плотность распределения и площадь сечения ТК и МФ, которые, как известно, активируются гипоксией и являются важнейшими ремодуляторами соединительной ткани и активаторами ангиогенеза. Так, на пятый день эксперимента 83% ТК находилось в состоянии дегрануляции, что может сви-

детельствовать о высокой активности тучноклеточной популяции и стимуляции процессов ремодуляции и образования новых сосудов микроциркуляции. В этот же период эксперимента ТК находили и в нервных стволах, что может говорить о процессах репарации, происходящих в нервных волокнах.

Таким образом, наряду с повреждающим воздействием на мышечную ткань и микроциркуляторное русло, гипотермия также является мощным активатором активности ТК и МФ. Внутритканевые ТК и МФ могут являться важными факторами в процессе адаптации организма к гипотермии. Исследование в судебно-медицинской практике морфофункциональной активности тучноклеточной популяции при смерти от гипотермии может быть дополнительным дифференциально-диагностическим критерием.

◇ ЛИТЕРАТУРА

1. Витер В.И., Степанян Ю.С. Понятие «адаптации» при гипотермии // Проблемы экспертизы в медицине, 2007. – Т. 7. – № 1. – С. 22–24.
2. Томилин В.В., Пашиян Г.А. Руководство по судебной медицине / Под ред. В.В. Томилина, Г.А. Пашияна. – М., 2001.
3. Мишук Н.Е. Холодовая болезнь (гипотермия) // Медицина неотложных состояний, 2006. – Т.4. – № 5. – С. 40–53.
4. Потяк О.Ю. Морфологическая характеристика жевательных мышц после общей глубокой гипотермии // Астраханский медицинский журнал, 2014. – Т. 9. – № 2. – С. 80–83.
5. Потяк О.Ю. Гисто-ультраструктурная характеристика жевательных мышц в условиях гипотермии. // Журнал Гродненского государственного медицинского университета, 2014. – № 2. – С. 67–69.
6. Селезнев С.А., Назаренко Г.И., Зайцев В.С. Клинические аспекты микрогемодициркуляции. – М., Медицина, 1985.
7. Степанян Ю.С. Экспертная оценка микрогемодициркуляции в эндокринных железах при смерти от общего переохлаждения организма. // Проблемы экспертизы в медицине, 2008. – № 2. – С. 19–20.
8. Кондашевская М.В. Тучные клетки и гепарин – ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах // Вестник РАМН, 2010. – № 6. – С. 49–54.
9. Арташян О.С., Юшков Б.Г., Храмова Ю.С. Морфологические аспекты участия тучных клеток в формировании общего адаптационного синдрома. // Таврический медико-биологический вестник, 2012. – Т. 15, № 3. – ч. 1. – С. 22–25.
10. Юшков Б.Г., Климин В.Г., Арташян О.С. Тучные клетки и гипоксия // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2006. – № 1. – С. 45–48.
11. Бобр О.А., Мяделец О.Д., Дубовский В.В. Динамика популяции тучных клеток раневого процесса у крыс, подвергнутых гипобиотическим состояниям (голодание, гипотермия) // Вестник ВГМУ, 2006. – Т. 5. – № 4. – С. 1–10.
12. Мяделец О.Д. Клеточные основы барьерно-защитных функций кожного региона при измененном температурном гемостазе: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Витебск, 1993. – 38 с.

Для корреспонденции

ЛЫЧЕВА Наталия Александровна – к.м.н, доцент кафедры нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, старший научный сотрудник Алтайского филиала ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины»; 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 40; +7 (983) 554-56-66 • natalia.lycheva@yandex.ru

ШАХМАТОВ Игорь Ильич – д.м.н., проф., заведующий кафедрой нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, старший научный сотрудник Алтайского филиала ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины»; 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 40; +7 (3852) 62-81-65 • iish59@yandex.ru

КИСЕЛЕВ Валерий Иванович – д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор кафедры нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, директор Алтайского филиала ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины»; 656049, г. Барнаул, пр. Ленина 40; +7 (3852) 38-02-56 • vik@agmu.ru

БОБРОВ Игорь Петрович – д.м.н., старший научный сотрудник морфологической лаборатории медико-биологического центра Алтайского государственного медицинского университета; 656049, г. Барнаул, ул. Малахова, 51; +7 (960) 941-85-42 • ig.bobrov2010@yandex.ru

ЛЕПИЛОВ Александр Васильевич – д.м.н., проф., заведующий кафедрой судебной медицины имени профессора В. Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО Алтайского государственного медицинского университета; 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 40; +7 (913) 096-71-30 • lepilov@list.ru

ДОЛГАТОВ Андрей Юрьевич – к.м.н, ассистент кафедры судебной медицины имени профессора В. Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО Алтайского государственного медицинского университета; 656049, г. Барнаул, ул. Малахова, 51; +7 (905) 982-18-35 • adolgotov@yandex.ru

■ **Конфликт интересов отсутствует.**