

УДК 57.012.4:599.742.1:611.738.53-092.9

СТЕРЕОУЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ И ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИКРОНОЖНОЙ МЫШЦЫ СОБАК В ПЕРИОДЕ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Филимонова Г.Н.

*Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии
им. акад. Г.А. Илизарова, Курган, e-mail: galnik.kurgan@yandex.ru*

Проведено морфологическое исследование икроножной мышцы щенков в раннем постнатальном периоде: новорожденных, 7-, 14-, 21-, 28-суточных, $n = 2$ для каждого периода. Использованы методы гистологии, стереометрии, сканирующей электронной микроскопии, статистического анализа. Полутонкие срезы окрашивали по М. Ontell, изучали с помощью стереомикроскопа «AxioScope.A1» и встроенной фотокамеры «AxioCam» (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Цитоархитектонику исследовали посредством растрового электронного микроскопа «JSM-840» (JEOL, Япония). Криостатные срезы с выявленной активностью миозиновой АТФ-азы послужили для стереологического анализа. Рассчитывали: объемную плотность мышечных волокон, микрососудов, эндомизия; численную плотность миоцитов и микрососудов, индекс васкуляризации (видовая константа). Выявлены особенности цитоархитектоники мышцы, её стромально-паренхиматозных отношений, отмечен волнообразный характер динамики показателей микроциркуляторного русла. Определены параллели по основным стереометрическим параметрам для передней большеберцовой и икроножной мышц. У новорожденных щенков узкие мышечные волокна без поперечной исчерченности, сети тонких эластических волокон, наибольшее содержание соединительнотканного компонента. На 7–14 сутки в миосимпластах идентифицируется поперечная исчерченность, к 21–28 суткам мышечные волокна оплетены микрососудами, в том числе в направлении, перпендикулярном ходу миоцитов, соединительнотканная прослойка минимальна. Для растущей мышцы характерны парные миобласты, группы ядер (миотубы), контрактурно измененные миоциты, в соединительнотканном компоненте эластические и коллагеновые волокна, фибробласты, фиброциты, макрофаги. Результаты могут представлять интерес при сравнительном морфологическом анализе в различных экспериментальных моделях.

Ключевые слова: икроножная мышца, постнатальный онтогенез, гистология, стереометрический анализ, цитоархитектоника

STEREO-ULTRASTRUCTURAL AND HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CANINE GASTROCNEMIUS MUSCLE IN THE PERIOD OF EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS

Filimonova G.N.

*National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Orthopaedics,
Kurgan, e-mail: galnik.kurgan@yandex.ru*

A morphological study of puppy gastrocnemius muscle in the early postnatal period was performed: newborn puppies, 7-, 14-, 21-, 28-day old, ($n=2$) for each period. Methods of histology, stereometry, scanning electron microscopy, statistical analysis were used. Half-thin sections were stained according to M. Ontell, studied using AxioScope.A1 stereomicroscope and AxioCam built-in camera (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Cytoarchitectonics was investigated with «JSM-840» scanning electron microscope (JEOL, Japan). Cryostat sections with the revealed activity of myosin ATP-ase served for stereological analysis. The following was calculated: bulk density of muscular fibers, microvessels, endomysium; number density of myocytes and microvessels, vascularization index (species constant). The particular features of the muscle cytoarchitectonics were revealed, as well as those of the muscle stromal-parenchymal relationships, the wavelike character of the dynamics of microcirculatory bed values was noted. Parallels were determined for the main stereometric parameters for the anterior tibial and gastrocnemius muscles. Newborn puppies had narrow muscle fibers without cross striation, networks of thin elastic fibrils, the highest content of the connective-tissue component. The cross striation was identified in myocytes on day 7-14, and by 21-28 day the muscle fibers were criss-crossed with microvessels, including in the direction perpendicular to the myocyte course, the connective-tissue interlayers were minimal. Paired myoblasts, groups of nuclei (myotubes), contractually changed myocytes were characteristic of the growing muscle, there were elastic and collagen fibers, fibroblasts, fibrocytes, macrophages in the connective-tissue component. The results may be of interest for comparative morphological analysis in various experimental models.

Keywords: gastrocnemius muscle, postnatal ontogenesis, histology, stereometrical analysis, cytoarchitectonics

Проблема регенерации длинных трубчатых костей и взаимодействие их с прилежащими мышцами является весьма актуальной в биологии и медицине. Это обусловлено, с одной стороны, частым травматизмом конечностей и необходимостью коррекции врожденных укорочений, с другой, знание

морфологических особенностей окружающих кость тканей при различных воздействиях может позволить существенно сократить время лечения больных. Работы, раскрывающие общность биологических процессов при дистракционном остеосинтезе и в постнатальном развитии, посвящены

периферическим нервам [1], фасциям скелетных мышц [2]. Выявлены особенности гемодинамики мышц-антагонистов при лечении оскольчатых переломов голени [3]. Определены гистологические параллели процессов естественного роста большеберцовой мышцы в раннем онтогенезе и индуцированных дозированным растяжением процессов при дистракции, показано преимущество высокоразрешающей круглосуточной автодистракции [4]. Морфофункциональные характеристики икроножной мышцы, являющейся синергистом передней большеберцовой и также подвергающейся дистракционной нагрузке, в доступной литературе не обнаружены, что послужило целью данного исследования.

Цель работы – выявить гистологические, стромально-паренхиматозные и стереоультраструктурные особенности икроножной мышцы собак в периоде раннего постнатального онтогенеза.

Материалы и методы исследования

Исследована икроножная мышца 10 щенков в периоде постнатального развития: новорожденные, 7-, 14-, 21-, 28-суточные, $n = 2$ для каждого возрастного периода. Фрагменты икроножной мышцы погружали в жидкий азот, изготавливали поперечные криостатные срезы (микротом-криостат МК-25ТУ64-1-856-78, Россия), проводили гистохимическую реакцию по выявлению активности миозиновой АТФ-азы (рН 9,0) по Padycula, Herman в модификации З. Лойда. Часть мышц фиксировали в смеси равных объемов 2% глутарового и параформальдегида, полимеризовали в эпоксидных смолах, изготавливали полутонкие срезы (ультратом «Nova», Швеция), окрашивали по М. Ontell. Изучали с помощью стереомикроскопа «AxioScope.A1» и встроенной цифровой фотокамеры «AxioCam» (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Морфологические особенности стереоультраструктурной организации мышцы щенков исследовали посредством сканирующего электронного микроскопа «JSM-840» (JEOL, Япония). Криостатные срезы использовались для стереометрии [5], изображения получали посредством проекционного микроскопа «Visopan» (Reichert-Jung, Австрия). Определяли: объемную плотность ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$) мышечных волокон (VV_{mf}), микрососудов (VV_{mv}), эндомизия (VV_{end}); численную плотность (мм^{-2}) миосимпластов и микрососудов (NA_{mf} ; NA_{mv}). Рассчитывали параметр, оценивающий васкуляризацию мышцы и, косвенно, ее оксигенацию, NA_{mv}/NA_{mf} – индекс васкуляризации и видовая константа. Достоверность различий

оценивали на основании непараметрического критерия Вилкоксона для независимых выборок, различия считали значимыми при $P < 0,05$, обработку цифрового материала осуществляли в программе AtteStat версия 10.8.8, встроенной в Microsoft Excel [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Для новорожденных щенков характерен несовершенный миофибриллярный аппарат, наблюдались очень мелкие мышечные волокна и огромное количество соединительнотканых прослоек с немногочисленными микрососудами (рис. 1 а), большое число мышечных волокон гофрированной, спиральной формы, волокна в состоянии контрактур различной степени, минимальное число микрососудов, крупные артерии и вены в широких прослойках перимизия (рис. 2, а). На 7 сутки роста наблюдались микрососуды в эндомизии, которые зачастую ориентировались продольно на поперечных срезах (рис. 1, б), были характерны парные миобласты и группы ядер (миотубы), примыкающие к предсуществующим волокнам либо формирующим самостоятельно новые миоциты (рис. 2, б). В последующие сроки онтогенеза отмечалось постепенное увеличение диаметров мышечных волокон и уменьшение прослоек эндо- и перимизия (рис. 1, в). К 14 суткам роста характерны волокна нормального строения, с поперечной исчерченностью, встречались контрактурно измененные волокна, доля соединительнотканых прослоек существенно уменьшалась по сравнению с новорожденными (рис. 2, в). К 28 суткам идентифицировались 3 метаболических типа мышечных волокон (рис. 1, г), визуализировались картины, описанные выше в различных сочетаниях, в частности пары миобластов вблизи мышечных волокон (рис. 2, г).

По данным стереометрии объемная плотность мышечных волокон была минимальна у новорожденных животных, через 7, 14 и 21 сутки постнатального развития параметр плавно увеличивался, к 28 суткам не существенно снижался (таблица). Численная плотность миоцитов была максимальна у новорожденных щенков, к 7 суткам параметр снижался, составив 85% от значения на предыдущий срок, к 14 суткам еще более уменьшался, но к 21 суткам развития вновь возрастал, составив 165% ($P < 0,05$) от значения на предыдущий срок и к 28 суткам вновь снижался, составив 66% от значения параметра в предыдущий срок ($P < 0,05$). Подобная ступенчатая динамика параметра была отмечена и для передней большеберцовой мышцы щенков [4].

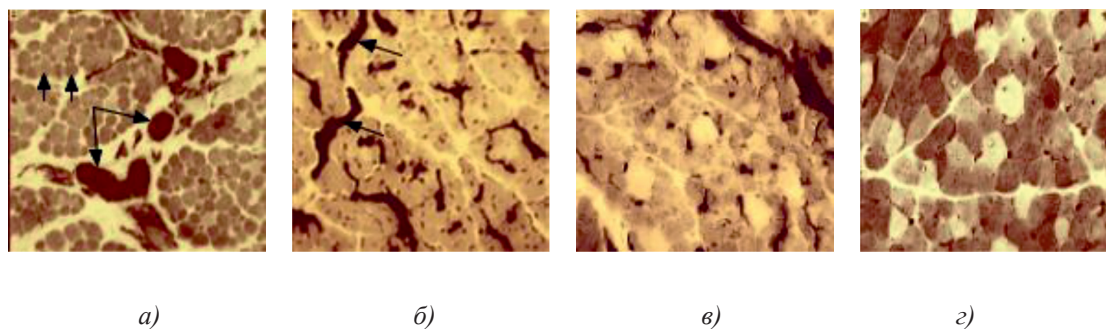


Рис. 1. Икроножная мышца щенков в различные периоды роста: а) новорожденного: крупные сосуды в широких прослойках перимизия (длинные стрелки), мелкие мышечные волокна двух типов (короткие стрелки), микрососуды не идентифицируются; б) 7-суточного: в перимизии сосуды ориентированы продольно, в эндомизии визуализированы микрососуды; в) 14-суточного; з) 21–28-суточных: идентифицируются 3 типа мышечных волокон. Поперечные криостатные срезы с выявленной активностью АТФ-азы, ув. x200

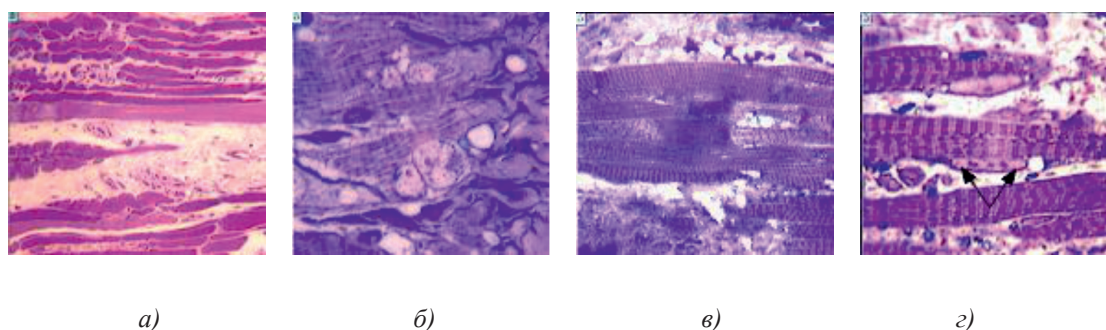


Рис. 2. Фрагменты икроножной мышцы щенков: а) новорожденного: узкие мышечные волокна, значительные прослойки эндомизия, спиральные волокна; б) 7-суточного: пары миобластов; в) 14-суточного: прослойки эндомизия уменьшены, контрактурно измененное волокно (в центре), з) 21–28-суточных: парные миобласты, примыкающие к мышечному волокну (стрелки). Полутонкие срезы, окраска по М. Ontell, ув.: а) x200; б), з) x1250; в) x500

Данные стереометрии икроножной мышцы щенков в периоде постнатального онтогенеза

Параметры Возраст щенков	VV_{mf} (mm^3/mm^3)	NA_{mf} (mm^2)	VV_{mv} (mm^3/mm^3)	NA_{mv} (mm^2)	VV_{end} (mm^3/mm^3)	I_{vasc}
Новорожденные	0,7098 ± 0,0124	6755,3 ± 197	0,0594 ± 0,0069	1209,0 ± 45,7	0,2308 ± 0,0118	0,1790
7 суточные	0,7333 ± 0,0119	5627,4 ± 88,9	0,1015 ± 0,0038	1758,7 ± 66,7	0,1682 ± 0,0071	0,3125
14 суточные	0,7566 ± 0,0048	3581,4 ± 125,2	0,0559 ± 0,0042	910,0 ± 56,6	0,1868 ± 0,0058	0,2541
21-суточные	0,8328 ± 0,0086	5907,6 ± 321,7	0,0263 ± 0,0034	769,1 ± 24,2	0,1429 ± 0,0076	0,1300
28-суточные	0,8095 ± 0,0175	3873,2 ± 144,2	0,0332 ± 0,0042	1123,5 ± 35,8	0,1568 ± 0,01534	0,2901

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения параметров, отличающиеся достоверно от соответствующих параметров на предыдущий срок исследования. Достоверность различий значима для уровня $P < 0,05$.

Объемная и численная плотности микрососудов в раннем постнатальном периоде носили волнообразный характер: к 7 суткам роста значения данных параметров составили 171 и 146% от значений

новорожденных животных соответственно; к 14 суткам параметры снижались, составив 55 и 52% от значений на предыдущий срок исследования ($P < 0,05$); к 21 суткам также снижались значения параметров, соста-

вив 47 и 85 % соответственно от значений на 14 сутки ($P < 0,05$), и на 28 сутки вновь возрастали, составив 126 и 146 % ($P < 0,05$) соответственно от значений на 21 сутки роста. Индекс васкуляризации изменялся подобно численной плотности микрососудов.

Методом сканирующей электронной микроскопии были выявлены особенности цитоархитектоники мышечных волокон и окружающей рыхлой волокнистой соединительной ткани икроножной мышцы. У новорожденных щенков наблюдались узкие мышечные волокна без видимой поперечной исчерченности (рис. 3, а), соединительнотканый компонент во всех сроках наблюдения был представлен тонкими эластическими волоконцами, образующими сети; неветвящимися тяжами коллагеновых волокон, фибробластами, фиброцитами, макрофагами (рис. 3, б). К 7-м суткам мышечные волокна становились заметно шире, идентифицировалась поперечная исчерченность (рис. 3, в), отмечены веретеновидные фибробласты, различные соединительнотканые волокна (рис. 3, г). К 14-м суткам миоциты характеризовались

четкой поперечной исчерченностью (рис. 3, д, е), на 21–28 сутки миоциты были оплетены микрососудами, в том числе в направлении, перпендикулярном ходу мышечных волокон, соединительнотканые прослойки были минимальны (рис. 3, ж, з).

В результате проведенного морфологического исследования выявлены особенности цитоархитектоники, микроциркуляторного русла и стромально-паренхиматозных отношений икроножной мышцы в периоде раннего постнатального развития. Установлено, что динамика большинства стереометрических параметров икроножной мышцы аналогична таковой для передней большеберцовой мышцы щенков [4]. В частности, имеет место волнообразный характер динамики показателей микрососудистого русла: максимальные цифры объемной и численной плотности микрососудов отмечены на 7 сутки постнатального развития, к 21 суткам показатели снижаются и вновь возрастают к 28 суткам. Для числа мышечных волокон выявлена также волнообразная динамика с максимальным увеличением параметра к третьей неделе роста.

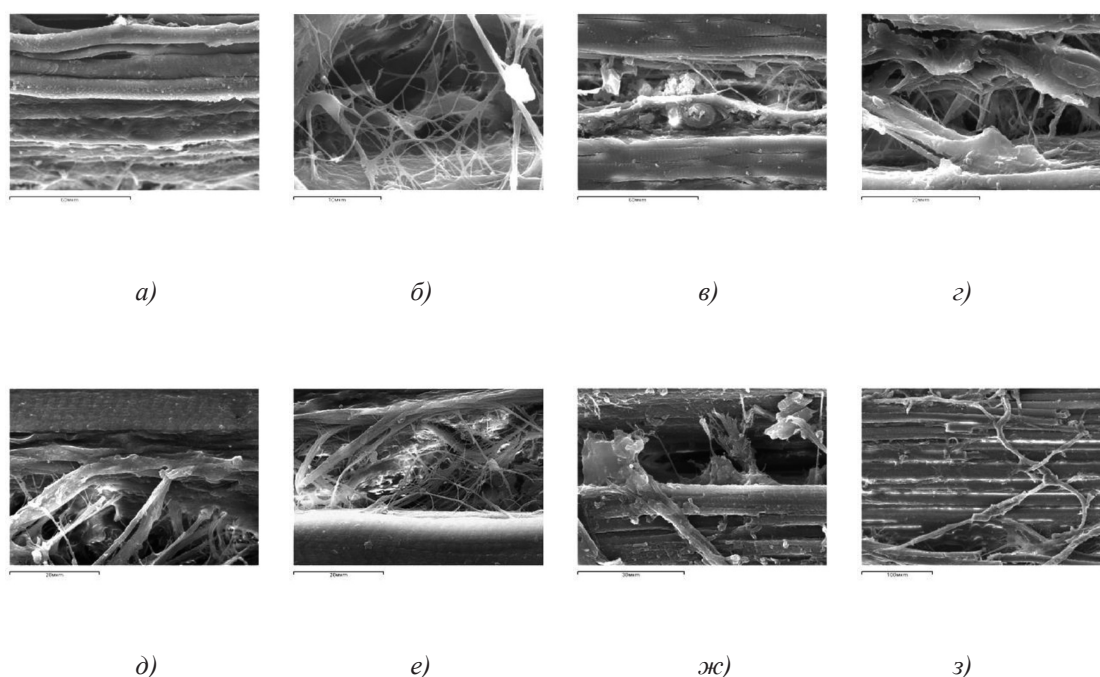


Рис. 3. Цитоархитектоника икроножной мышцы собак в постнатальном периоде. Сканограммы щенков: а, б – новорожденных, а) узкие мышечные волокна без поперечной исчерченности, ув. $\times 850$, б) сеть тонких эластических волоконцев, более широкое коллагеновое волокно, макрофаг (справа), ув. $\times 3700$; в, г – 7-суточных, в) мышечные волокна, в центре – микрососуд, идущий параллельно волокнам, ув. $\times 850$; г) веретеновидный фибробласт (внизу), различные волокна, ув. $\times 2500$; д, е – 14-суточных, мышечные волокна с четкой поперечной исчерченностью, ув. $\times 1900$; ж – 21-суточного, ув. $\times 1500$; з – 28-суточного, ув. $\times 300$, мышечные волокна и сеть оплетающих их микрососудов, минимум эндомизия

Известно, что число мышечных волокон не фиксируется при рождении, а увеличивается в постнатальном периоде, как путем саркомерогенеза предсуществующих волокон, так и путем генеза новых миофибрилл, в основном между рождением и 3-недельным возрастом [7]. Показано, что в возрасте 21 суток очень мелкие волокна, экспрессирующие изоформу тяжелой цепи миозина (МуНС) эмбриона, были заметны по всей мышце. Это не противоречит данным, полученным в настоящем исследовании, где на 21 сутки онтогенеза численность мышечных волокон достоверно возрастает, приближаясь к значению параметра при рождении, при этом у новорожденных параметр обусловлен очень мелкими диаметрами волокон на фоне большого количества соединительнотканного компонента. К 3-недельному возрасту возрастает число волокон при существенном уменьшении доли соединительной ткани. К 28-м суткам роста имеет место увеличение диаметров миоцитов и, соответственно, уменьшение их числа в поле зрения. Известно о функции циклазо-ассоциированных белков (САР) в регуляции обмена α -актина во время дифференцировки миофибрилл [8]. Переключение α -актина задерживалось у мышей с системной мутацией в САР2, и миофибриллы оставались недифференцированными у постнатальных мышей. Задержка переключения α -актина совпадает с началом дефицита двигательной функции и гистопатологических изменений, включая высокую частоту встречаемости спиральных волокон типа IIВ. То есть тонких нарушений постнатального ремоделирования F-актина достаточно для предрасположенности мышечных волокон к образованию спиральных волокон, которые также имеют место в представленной работе.

В процессе формирования структурно-функциональных единиц микрососудистого русла меняется количество, плотность расположения сосудов, их диаметр, ориентация в пространстве. Наиболее интенсивный рост у белой крысы наблюдался через 7 дней, число капилляров 1302 мм⁻², у взрослых животных — 478 мм⁻² [9]. В данном исследовании микрососудистое русло в мышце щенков максимально развивается также к 7 суткам, что подтверждено объемной и численной плотностью микрососудов.

В развитии скелетных мышц важную роль играют гормоны щитовидной железы, в частности трийодтиронин, который усиливается дейодиназой 2 типа (Dio2), глобальная инактивация гена Dio2 на ранних этапах онтогенеза нарушает дифференцировку и регенерацию скелетных мышц в ответ

на мышечное повреждение [10]. Исследовали рост мышц и типы волокон в мышцах задних конечностей в постнатальном развитии у свиней: быстросокращающиеся волокна с низким окислительным метаболизмом (IIВ) имели наибольшую площадь поперечного сечения [11]. В исследованиях митохондрий мышц выявлено, что их сеть изменяется с продольной ориентации на перпендикулярную по отношению к миосимпластам в течение 2–3 недель после рождения в гликолитических скелетных мышцах [12]. Эти структурные изменения сопровождаются изменением профиля экспрессии белков от митохондрий, предназначенных для сборки миосимпластов, в митохондрии, узкоспециализированные для клеточного энергетического метаболизма, определяя типы мышечных волокон. Выявлен микропептид, локализующийся в митохондриях, который усиливает их дыхательную активность и активизируется во время дифференцировки миоцитов C2C12 *in vitro* и в мышцах раннего постнатального развития [13]. Сохранность митохондрий имеет решающее значение для поддержания функции скелетных мышц [14].

Заключение

Таким образом, в результате исследования икроножной мышцы щенков получены новые данные по морфогенезу мышечной ткани растущих животных. Выявлены особенности цитоархитектоники икроножной мышцы и её стромально-паренхиматозных отношений. Определены параллели по основным стереометрическим параметрам для передней большеберцовой и икроножной мышц. Результаты могут представлять интерес при сравнительном морфологическом анализе в различных экспериментальных моделях.

Список литературы

1. Илизаров Г.А., Карымов Н.Р. Сравнительное исследование ультраструктуры нервных волокон в онтогенезе и в условиях дозированной distraction // Гений ортопедии. 1995. № 1. С. 26–29.
2. Асонова С.Н. Механизмы морфогенеза соединительнотканых структур конечности в условиях дозированного растяжения // Гений ортопедии. 1996. № 2–3. С. 124–129.
3. Kononovich N.A., Popkov A.V. Hemodynamics in different muscle groups when treating comminuted fractures of leg bones (an experimental study). International Journal of applied and fundamental research. 2015. No. 5. P. 246–250. eLIBRARY ID: 23371706.
4. Шевцов В.И., Филимонова Г.Н. Передняя большеберцовая мышца собак на этапах постнатального и distractionного морфогенеза // Гений ортопедии. 2008. № 1. С. 74–80.
5. Schneider J.P., Ochs M. Stereology of the lung. Cell Biol. 2013. Vol. 113. P. 257–294. DOI: 10.1016/B978-0-12-407239-8.00012-4.

6. Гайдышев И.П. Моделирование стохастических и детерминированных систем: Руководство пользователя программы AtteStat. Курган, 2015. 484 с.
7. Bérard J., Kalbe C., Lösel D., Tuchscherer A., Rehfeldt C. Potential sources of early-postnatal increase in myofibre number in pig skeletal muscle. *Histochem. Cell. Biol.* 2011. Vol. 136. No. 2. P. 217–225. DOI: 10.1007/s00418-011-0833-z.
8. Kepser L.J., Damar F., De Cicco T., Chaponnier C., Prószyński T.J., Pagenstecher A., Rust M.B. CAP2 deficiency delays myofibril actin cytoskeleton differentiation and disturbs skeletal muscle architecture and function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019. Vol. 116. No. 17. P. 8397–8402. DOI: 10.1073/pnas.1813351116.
9. Козлов В.И., Гурова О.А. Ремоделирование системы микроциркуляции в онтогенезе // Астраханский медицинский журнал. 2012. № 3. С. 151–154.
10. Ignacio D.L., Silvestre D.H.S., Anne-Palmer E., Bocco B.M.L.C., Fonseca T.L., Ribeiro M.O., Gereben B., Bianco A.C., Werneck-de-Castro J.P. Early Developmental Disruption of Type 2 Deiodinase Pathway in Mouse Skeletal Muscle Does Not Impair Muscle Function. *Thyroid*. 2017. Vol. 27. No. 4. P. 577–586. DOI: 10.1089/thy.2016.0392.11.
11. Wank V., Fischer M.S., Walter B., Bauer R. Muscle growth and fiber type composition in hind limb muscles during postnatal development in pigs. *Cells Tissues Organs*. 2006. Vol. 182. No. 3–4. P. 171–181. DOI: 10.1159/000093966. PMID: 16914919
12. Kim Y., Yang D.S., Katti P., Glancy B. Protein composition of the muscle mitochondrial reticulum during postnatal development. *J. Physiol.* 2019. Vol. 597. No. 10. P. 2707–2727. DOI: 10.1113/JP277579.
13. Lin Y.F., Xiao M.H., Chen H.X., Meng Y., Zhao N., Yang L., Tang H., Wang J.L., Liu X., Zhu Y., Zhuang S.M. A novel mitochondrial micropeptide MPM enhances mitochondrial respiratory activity and promotes myogenic differentiation. *Cell Death & Disease*. 2019. Vol. 10. Article number: 528. DOI: 10.1038/s41419-019-1767-y.
14. Crupi A.N., Nunnelee J.S., Taylor D.J., Thomas A., Vit J.P., Riera C.E., Gottlieb R.A., Goodridge H.S. Oxidative muscles have better mitochondrial homeostasis than glycolytic muscles throughout life and maintain mitochondrial function during aging. *Aging (Albany NY)*. 2018. Vol. 10. No. 11. P. 3327–3352. DOI: 10.18632/aging.101643. PMID: 30449736.