



УДК 591.8:599.323.4]:612.393

doi.org/10.29038/2617-4723-2019-387-137-147

Гістологічні особливості литкового м'яза щура за умов хронічної алкоголізації та ішемії різної тривалості

Олександр Мотузіук, Василь Пикалюк

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна
Адреса для листування: cmoplutsk@gmail.com

Отримано: 30.03.19; прийнято до друку: 28.04.19; опубліковано: 28.06.19

Резюме. Мета роботи – провести аналіз гістологічних змін у литковому м'язі за умов експериментальної ішемії різної тривалості, ускладненої хронічною алкоголізацією. Експеримент реалізовано на щурах інбредної лінії *Wistar* масою 140–160 г. Виділено такі групи тварин: контрольна, тварини з ішемією (1, 2 та 3 год), алкоголізовані тварини й алкоголізовані тварини з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1, 2, 3 год. Експериментальну ішемію здійснювали через 30 днів після введення останньої дози етилового спирту методом Халілова-Захірходжаєва через перетискування джгутом основних артерій. Гістологічну обробку тканини проводили за загальноприйнятною методикою, фарбувалили за методом Ван-Гізона. Виявлено, що за умов хронічної алкоголізації й ішемії різної тривалості порушуються структура й хід частково атрофованих унаслідок алкогольної міопатії волокон, відбуваються дегенеративні зміни в цілісності сарколеми, у деякої частини волокон зменшується об'єм міофібрил, ендомізій набрякає та починає некротизуватися, міофібрили роз'єднуються. Відзначено появу нейтрофілів поміж міофібрил і дифузні крововиливи, але, попри це, в окремих ділянках зберігається типова поперечна посмугованість. Отримані результати свідчать про негативну синергію міотоксичних впливів етилового спирту та руйнівного впливу судинної ішемії на волокна литкового м'яза щурів.

Ключові слова: литковий м'яз, ішемія, хронічна алкоголізація, патоморфологічні зміни, м'язові волокна, ендомізій, сарколема.

Histologic Features of Rat Gastrocnemius Muscle Under Conditions of Experimental Ischemia of Different Duration Complicated by Chronic Alcoholization

Oleksandr Motuziuk, Vasyl Pykaliuk

Lesja Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine
Correspondence: cmoplutsk@gmail.com

Abstract. The purpose of the study was the histological changes analysis in the gastrocnemius muscle under the conditions of experimental ischemia of different duration complicated by chronic alcoholization. The experiment was conducted on inbred Wistar line rats with 140 – 160 g body weight. The animals were divided into four groups: control; animals with ischemia (1, 2 and 3 hours ischemia duration); alcoholized animals and alcoholized animals with experimentally induced 1, 2, 3 hours ischemia. Chronic alcohol intoxication of the animals was achieved by intragastric delivery of 40 % ethyl alcohol for 30 days. Unilateral vascular ischemia was induced by tourniquet ligating of the main arteries. Histologic processing of the tissue was carried out according to standard histological methods, stained with Van Gison method. Morphometric indices (thickness of muscle fibers and the size of interfibrillary space) were measured using VideoTest Morphology 5.0 software. It was found that the level of expression of morphological changes directly depends on the duration of ischemia. With its increase, destructive changes of the gastrocnemius muscle become more evident: invaginations on the sarcolmes of fibers are more clearly visible, myofibrils are disorganized, the amount of collagen increases and the scar formation starts. After three-hour ishemia the cytological signs of necrosis are observed, but in many

areas the typical cross-striped and the normal structure of muscle fibers was preserved. Under the conditions of chronic alcoholization and ischemia of different duration, the structure and course of partially atrophied after alcoholic myopathy fibers are broken, degenerative changes in the integrity of sarcolemes are observed, some fibers decrease the volume of myofibrils, there endomysium swells and its necrosis starts, myofibrils dissociate. The presence of neutrophils between myofibrils and diffuse hemorrhage has been observed, nevertheless, in some sites a typical cross-striped structure was preserved. The obtained results show the negative synergy of myotoxic effects of ethyl alcohol and the destructive effects of vascular ischemia on fibers of rat *m. gastrocnemius*.

Key words: *gastrocnemius* muscle, ischemia, chronic alcoholization, pathomorphological changes, muscle fibers, endomysium, sarcolemma.

Вступ

Серед багатьох м'язових патологій ішемія є достатньо розповсюдженою й займає одне з головних місць [1]. Вона є однією з основних причин післяопераційних ускладнень, які можуть призводити до ампутації кінцівки та навіть смерті людини. Тому актуальним залишається дослідження прикладних аспектів фізіології та біофізики скелетних м'язів, які б могли допомогти покращити методики діагностики та лікування м'язових патологій, що можуть бути спричиненні ішемією різної тривалості [2].

Окремий важливий напрям у наукових дослідженнях становлять ускладнення ішемічної травми скелетних м'язів нижніх кінцівок іншими патологічними чинниками, серед яких – уживання алкоголю. Взаємобтяжуючий вплив цих двох патологічних процесів, призводитиме до інтенсифікації дистрофічних змін та зниження життєздатності м'язової тканини, загрожуючи ранньою інвалідацією та ускладненням якості життя загалом. Алкогольна міопатія, яка є результатом хронічної алкогольної інтоксикації, вважається багатофакторною хворобою й характеризується генералізацією атрофічного процесу в скелетних м'язах. Алкоголь-асоційовані морфофункціональні зміни м'язової тканини залежать від особливостей гістологічної структури міофібрил [3].

Основним патогенним чинником у процесі ішемічних ушкоджень м'язової тканини є вільні радикали. При ішемічному пошкодженні, яке підсилене зловживанням алкоголю, спостерігається надмірна активація в м'язовій тканині процесів вільнорадикального перекисного окиснення та загальне зменшення роботи антиоксидантних систем організму [4–7]. Ураховуючи вищесказане, вважаємо актуальним проаналізувати морфологічні особливості м'язових волокон за комплексної дії двох факторів ішемії та хронічної адміністрації алкоголю.

Мета дослідження – провести аналіз гістологічних змін у литковому м'язі щура за

умов ішемії різної тривалості, ускладненої хронічною алкоголізацією.

Матеріали й методи дослідження

Для дослідження використано щурів інбредної лінії *Wistar*, маса яких 140–160 г. Протокол дослідження затверджено комісією з питань біоетики СНУ ім. Лесі Українки (протокол № 1 від 14 березня 2017 р), згідно з правилами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) і нормами біомедичної етики, відповідно до Закону України №: 3446 - IV 21.02.2006 р., м. Київ, «Про захист тварин від жорстокого поводження» з проведенням медико-біологічних досліджень. Тварин, відібраних для експерименту, розділено на групи: інтактні; з ішемією різної тривалості (1, 2 та 3 год), алкоголізовані та алкоголізовані тварини з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1, 2, 3 год.

Модель індукції хронічної алкогольної інтоксикації. Експериментально-індуковану хронічну алкоголізацію щурів проводили за методом Халілова-Захірджаяєва [8]. Згідно з методикою, протягом 30 днів щурі один раз на добу перорально отримували 40 % етиловий спирт із розрахунку 2 мл / 100 г маси тіла тварини.

Модель індукції ішемії. Експериментальну індукцію ішемії здійснювали через 30 днів після початку хронічної алкоголізації за допомогою перетискування джгутом зовнішньої клубової артерії (*arteria iliaca externa*), стегнової артерії (*arteria femoralis*) та її каудальних терміналей на рівні гомілки. Час ішемії в щурів з обох дослідних груп становив 1, 2 та 3 год. При цьому здійснювали постійне спостереження за станом тварини, зокрема візуальне спостереження за амплітудою дихальних рухів і ректальне вимірювання ртутним термометром температури тіла. Обертання тварини з боку на бік здійснювали кожні 30 хв. Ініціація наркотичного сну тіопенталом натрію (0,04 мг/100 г, підтримувальна доза – 0,1 мг/100 г, швидкість введення – 5–10 мл/хв),

здійснювали після попередньої премедикації 0,1 % атропіном для попередження ларинго- та бронхоспазму (0,1 мл за 30 хв перед уведенням у наркотичний сон).

Гістологічна підготовка та фарбування зрізів. Досліджувані зразки м'язів фіксували в 10 % формаліні, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, заливку матеріалу проводили в гомогенізовану парафінову суміш фірми «Histomix». Різку блоків проводили серійно у фронтальній та сагітальній площинах на санному мікротомі (МС-2) товщиною 10 та 15 мкм. Фарбування м'язової тканини виконували за класичним методом Ван-Гізон (гематоксилін Майєра, пікрофуксин) та поміщали в полістерол. Препарати розглядали за загального збільшення мікроскопа в 100 та 400 разів [9]. Гістологічні препарати фотографували за допомогою цифрової камери SEO на мікроскопі Axioskop-40 (Carl Zeiss). Морфометричні показники (товщину м'язового волокна та величину міжфібрилярного простору) вимірювали за допомогою програми «ВідеоТест Морфологія 5.0».

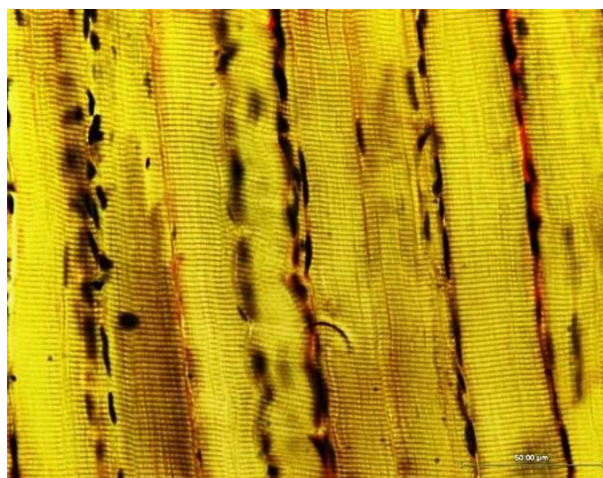
Статистичний аналіз усіх результатів здійснювали за методами варіаційної статистики в програмі Statistica 10.0. («Statsoft Inc.», США). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважалися відмінності при $p \leq 0,05$. Результати представлено як середнє арифметичне \pm похибка середнього ($M \pm m$).

Результати дослідження

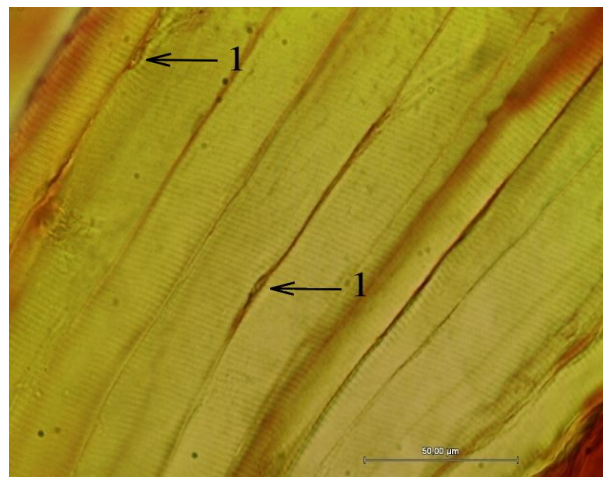
При хронічній алкоголізації волокна зберігають поперечну посмугованість і форму. Проте виявлено ознаки атрофії. Про це свідчить зменшення кількості ядер у волокнах тварин із хронічною алкоголізацією, які на зрізах виражені нечітко й погано фарбуються. В окремих ділянках препарату спостерігаємо збільшення кількості колагенових волокон (рис.1). Така морфологічна картина за свідчує розвиток алкогольної міопатії, яка не супроводжується фіброзом, некрозом і запальною інфільтрацією. Товщина м'язового волокна становила $20,03 \pm 1,50$ мкм, розміри інтерстиціального простору – $2,63 \pm 0,61$ мкм, що достовірно менше, порівняно з контролем, і є чіткою ознакою атрофії.

При ішемії литкового м'яза різної тривалості зміни в м'язових волокнах проявляються поступово. За ішемії тривалістю 1 год загальна картина ушкодження включає

наявність м'язових волокон нерівномірної товщини з порушенням поперечної посмугованості, вираженою вакуолізацією, у деяких місцях наявні ознаки гіпертрофії волокон.



А



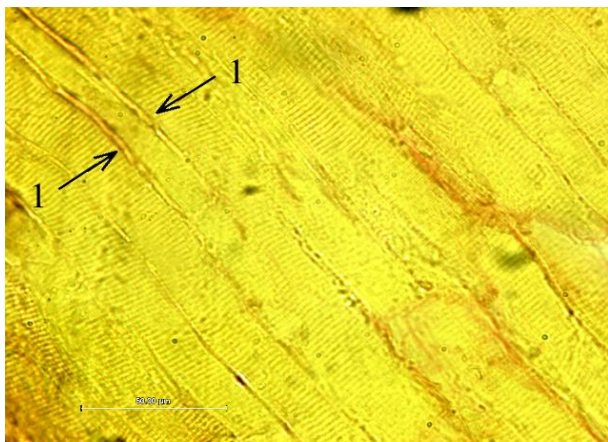
Б

Рис. 1. М'язові волокна *musculus gastrocnemius* щура. А – контроль, Б – хронічна алкоголізація. Світлова мікроскопія $\times 400$. Фарбування за ван Гізон. 1 – ядра погано фарбуються, їх кількість зменшується.

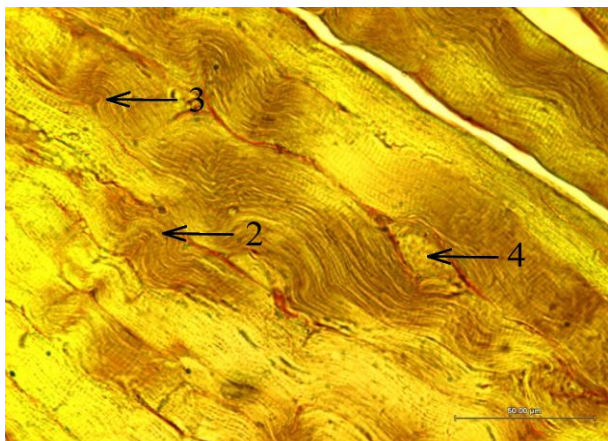
Також в окремих ділянках виражений набряк сполучнотканинної строми. Товщина м'язового волокна за цих умов експерименту становила $18,45 \pm 1,98$ мкм, розміри інтерстиціального простору – $3,73 \pm 0,48$ мкм. Після ішемії тривалістю 1 година окремі алкоголізовані волокна литкового м'яза зазнавали сепарації, інші втрачали свою структуру та чіткі межі. Спостерігали порушення впорядкованості міофібрил (рис. 2. Б). Відзначені атрофовані волокна різної товщини, міжфібрилярні набряки сполучно-тканинної строми, вакуолізацію саркоплазми волокна. В окремих ділянках наявні початкові етапи

Гістологічні особливості литкового м'яза щура за умов хронічної алкоголізації та ішемії різної тривалості

фіброзу. Особливо чітко виражені інвагінації сарколеми волокон, порушення її цілісності та поява в місцях інвагінацій більшої кількості колагену. Упорядкований хід міофібрил значно порушений. Товщина м'язового



А



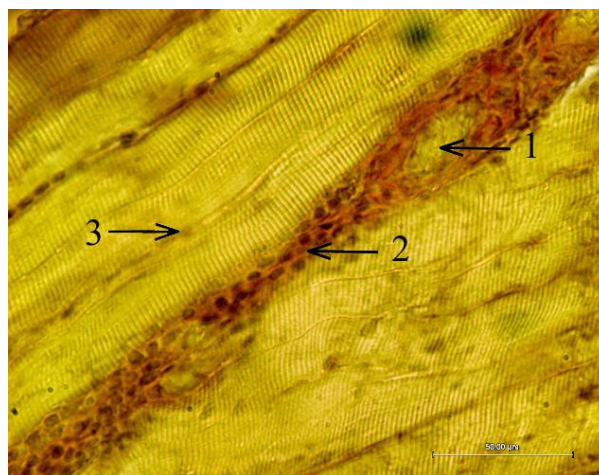
Б

Рис. 2. М'язові волокна ішемізованого *m. gastrocnemius* щура. Світлова мікроскопія, $\times 400$: А – ішемія тривалістю 1 година; Б – хронічна алкоголізація та ішемія тривалістю 1 година. Фарбування за Ван-Гізон. 1 – набряк ендомізію; 2 – порушення впорядкованості міофібрил; 3 – інвагінації сарколеми; 4 – початок формування фібринового тромба.

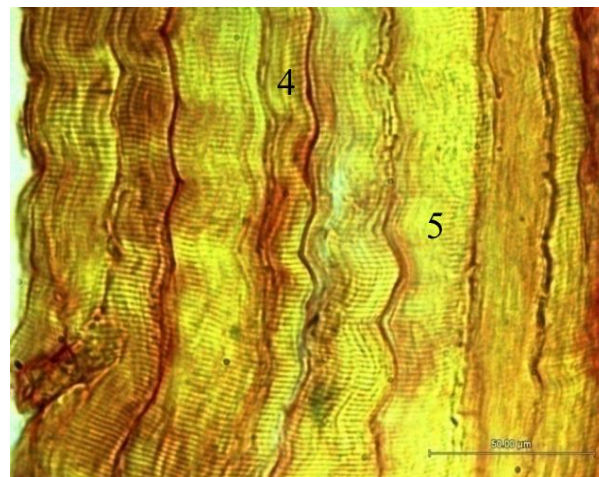
волокна *m. gastrocnemius* алкоголізованих тварин після односторонньої ішемії становила $16,12 \pm 1,46$ мкм, товщина ендомізію – $3,04 \pm 0,30$ мкм.

Морфологічні зміни в досліджуваних м'язів за ішемії тривалістю 2 год. Збільшення часу ішемії призводить до значних порушень структури м'язових волокон, зокрема чіткими стають ознаки дистрофії. Проте не всі м'язові волокна зазнали серйозних деструктивних змін. У деяких траплялися менші за інтенсивністю порушення, що супроводжувалися незначним руйнуванням поперечної посмугованості

м'язового волокна. Механізм переродження м'язової тканини на рівні окремих клітин характеризується порушенням цілісності сарколеми, утворенням на ній інвагінацій, виходом міоядер у міжфібрилярний простір, розривом міофібрили на окремі короткі фрагменти, заміщення скоротливого апарату колагеновими структурами в ділянках міофібрили, що відділилися. Щодо ядер, то вони в таких клітинах блідо фарбуються й мають збільшений розмір. Характерною особливістю некротичного переродження м'язової тканини є значна кількість ядер у міжклітинному просторі. Оскільки ядра розміщуються в здорових волокнах на



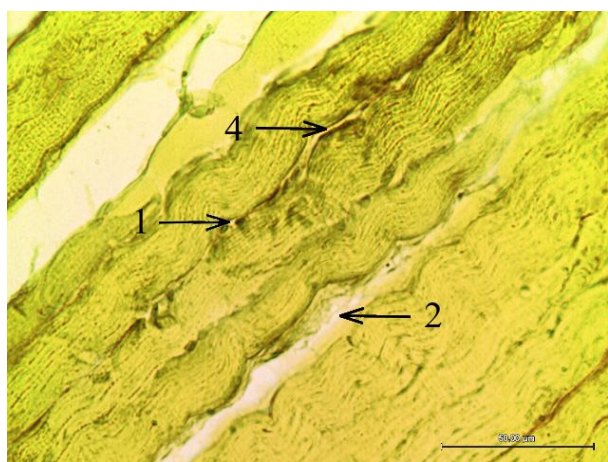
А



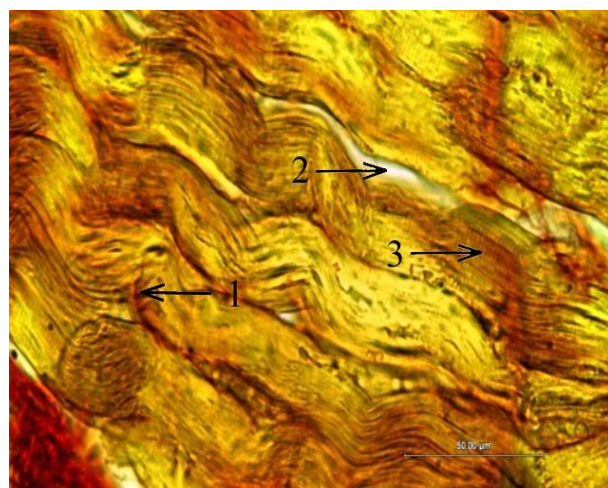
Б

Рис. 3. М'язові волокна ішемізованого *m. gastrocnemius* щура за ішемії тривалістю 2 год.: А – ішемія тривалістю 2 години; Б – хронічна алкоголізація та ішемія тривалістю 2 години. Світлова мікроскопія $\times 400$. Фарбування за ван Гізон. 1 – початок формування рубця та збільшення кількості фібробластів (2); 3 – ядра в міжклітинному просторі; гіпотрофовані (4) та гіпертрофовані (5) волокна.

периферії під плазмолемою, то їх локалізація в міжклітинному просторі є діагностичною ознакою некротичного переродження. Також простежено чітку тенденцію до руйнування м'язових волокон і заміщення їх рубцевою тканиною (рис. 3). На цьому етапі руйнування м'язів відзначаються ознаки набряку м'язової тканини: простори між окремими волокнами розширено за рахунок набряку міжклітинної строми. У такому випадку в інтерстиціальному просторі з'являється значна кількість фібробластів – елементів сполучної тканини. Середня товщина м'язових волокон – $17,5 \pm 1,28$ мкм, а величина міжфібрилярного простору збільшилася до $3,87 \pm 1,44$ мкм, що достовірно менше, порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).



А



Б

Рис. 4. М'язові волокна ішемізованого *musculus gastrocnemius* щура за ішемії тривалістю 3 год: А – ішемія тривалістю 3 год; Б – хронічна алкоголізація та ішемія тривалістю 3 год. Світлова мікроскопія $\times 400$.

Фарбування за ван Гізон. 1 – інвагінації сарколеми; 2 – збільшення міжфібрилярного простору; 3 – збільшення кількості колагену; 4 – початок некротизації м'язового волокна.

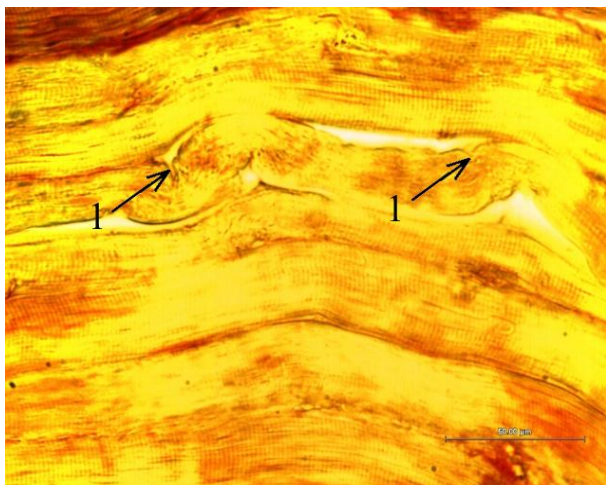
При хронічній алкоголізації та ішемії тривалістю 2 год, порівняно з просто алкоголізованим зразком, ми виявили неоднорідну й мозаїчну морфологічну картину в *m. gastrocnemius*: характерні численні вигини та вп'ячування сарколеми, які пов'язані з порушенням структури каркасних білків (рис. 3. Б). Відзначено дифузні крововиливи, але, попри це, у визначених місцях ще досі зберегалася типова поперечна посмугованість. Простежено зменшення кількості ядер м'язових волокон на тлі алкогольної інтоксикації, що є одним із проявів атрофічного процесу. На цій стадії патологічного ушкодження спостерігали м'язові волокна нерівномірної товщини. Товщина м'язового волокна в цьому випадку становила $13,89 \pm 1,61$ мкм, у той час як при звичайній алкоголізації – $20,03 \pm 1,50$ мкм. Щодо розмірів міжфібрилярного простору зареєстровано незначне збільшення – $3,42 \pm 0,53$ мкм, при алкоголізації – $2,63 \pm 0,61$ мкм.

Морфологічні особливості м'язових волокон литкового м'яза після 3-х годин ішемії. У досліджуваному м'язі при тригодинній ішемії спостерігаємо значне порушення структури його волокон. Проте не всі м'язові волокна зазнали серйозних деструктивних змін. У деяких із них траплялися менші за інтенсивністю порушення, які супроводжувалися незначним руйнуванням поперечної посмугованості. Також з'являються перші ознаки некрозу в деяких м'язових волокнах, їх розриви та фрагментація. Зафіксовано збільшення розмірів ендомізю внаслідок його набряку й збільшення кількості набрякової рідини. Також простежено досить велику кількість фібринових тромбів. Ядра при такій тривалості ішемії не проявляються. Загалом, за такої двогоднинної ішемії картина пошкодження волокон є неоднорідною й мозаїчною. На цій стадії патологічного ушкодження спостерігали м'язові волокна нерівномірної товщини. Середня товщина м'язового волокна в цьому випадку становила $13,45 \pm 1,71$ мкм, товщина міжфібрилярної строми – $3,42 \pm 0,53$ мкм.

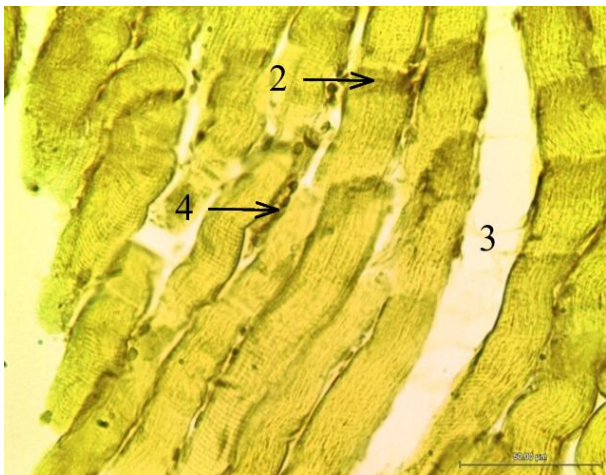
При тригодинній ішемії та алкоголізації порушення структури м'яза аналогічні тим, які зафіксовані при чистій ішемії, проте спостерігали деякі специфічні особливості, зокрема скоротливі елементи в досліджуваних зразках частково заміщено колагеновими волокнами сполучної тканини; простежено вищу кількість колагену (рис. 4.Б), фрагментацію ішемізованих м'язових волокон на окремі елементи, що, найімовірніше, пов'язано з активацією анаеробного шляху

Гістологічні особливості литкового м'яза щура за умов хронічної алкоголізації та ішемії різної тривалості

гліколізу, унаслідок якого активуються фосфоліпази й руйнують сарколему. У місцях інвагінацій поперечну посмугованість не помічали. Характерними змінами також є структурні зміни в сарколемі – спостерігаються її вп'ячування, а також розриви (рис. 5). Зареєстровано значне збільшення міжфібрилярного простору до $4,17 \pm 0,62$ μm за рахунок збільшення кількості набрякової рідини. При цьому товщина м'язового волокна зменшується до $12,17 \pm 1,38$ μm . Такі зміни, на нашу думку, пов'язані із токсичною дією етанолу, який при ішемії виступає як обтяжувальний фактор і приводить до розвитку міопатії.



А



Б

Рис. 5. М'язові волокна ішемізованого *musculus gastrocnemius* щура за умов хронічної алкоголізації та ішемії тривалістю 3 год: А – ішемія тривалістю 3 год; Б – хронічна алкоголізація та ішемія тривалістю 3 год. Світлова мікроскопія $\times 400$. Фарбування за ван Гізон. 1 – інвагінації сарколеми; 2 – початкові етапи фрагментації м'язового волокна; 3 – зростання кількості набрякової рідини; 4 – некротизація ендомізію.

Отже, під впливом алкоголю та експериментальної ішемії в литковому м'язі відбуваються поступові морфологічні зміни (табл. 1).

Таблиця 1

Морфометричні показники волокно *m. gastrocnemius* за умов ішемії різної тривалості та хронічної алкоголізації, $n=5$

Група	Алко- голь, мкм	Алко- голь + ішемія трива- лістю 1 год	Алко- голь + ішемія трива- лістю 2 год	Алко- голь + ішемія трива- лістю 3 год
Показник				
Товщина міжфібрилярного простору, мкм	$2,63 \pm 0,61$	$3,04 \pm 0,30$	$3,42 \pm 0,53$	$4,17 \pm 0,62^*$
Товщина м'язових волокон, мкм	$20,03 \pm 1,50$	$16,12 \pm 1,46$	$13,89 \pm 1,61$	$12,17 \pm 1,38^*$

Примітка. * - достовірні відмінності, порівняно з алкоголізацією ($p \leq 0,05$).

Отже, аналізуючи результати проведених досліджень, зазначимо, що при експериментальній ішемії в скелетних м'язах відбуваються значні прогресуючі патоморфологічні зміни. Вони проявляються поступово. Насамперед відбуваються незначні зміни у формі й розмірах м'язового волокна, за яким слідує зникнення поперечної посмугованості та незначне розширення інтерстиціального простору, що з часом заповнюється фібробластами, а ті, зі свого боку, згодом утворюють рубець. Наступними морфологічними змінами є початкові етапи некрозу й значні набряки як м'язової тканини, так і ендомізію зі збільшенням набрякової рідини. Ступінь вираження морфологічних змін безпосередньо залежить від тривалості ішемії. При її наростанні стають більш виразними деструктивні зміни волокон литкового м'яза, а саме: чіткіше видно вигини та вп'ячування на сарколемах волокон, руйнуються скоротливі елементи та, як наслідок, ще більше втрачається посмугованість м'язової тканини, зростає кількість сполучнотканинних елементів унаслідок збільшення чисельності фібробластів.

Порівнюючи м'язові волокна за умов хронічної алкоголізації й м'язові волокна за хронічної алкоголізації на фоні ішемії різної

тривалості, спостерігаємо низку характерних змін: по-перше, порушується структура та хід волокон; по-друге, відбуваються дегенеративні зміни в цілісності сарколеми, про це свідчать численні вигини та вп'ячування на її поверхні; змінюється діаметр м'язових волокон. У деякій частині волокон зменшується об'єм міофібрил, ендомізій набрякає й некротизується, міофібрили роз'єднуються. Відзначено появу нейтрофілів поміж міофібрил та дифузні крововиливи, але, попри це, в окремих ділянках зберігається типова поперечна посмугованість. Отримані результати свідчать про негативну синергію мітоксичних впливів етилового спирту й руйнівного впливу судинної ішемії на волокна *m. gastrocnemius* щурів.

Обговорення отриманих результатів

Алкогольна міопатія, яка трапляється в 40–60 % хронічних алкоголіків, являє собою сукупність метаболічних і біомеханічних змін у скелетних м'язах [10]. Хронічне зловживання алкоголем – одна з причин загальної дисфункції м'язової системи, їх атрофії із супутньою втратою м'язової маси та, як наслідок, порушення рухливості кінцівок загалом. Алкоголь порушує всі ланки обміну речовин м'язової й кісткової тканин. Значні незворотні зміни, що відбуваються в цих системах, є результатом дії алкогольної інтоксикації, яка призводить до порушення живлення тканин [11]. Комплексні дослідження впливу етанолу на м'язову та кісткову тканину виявили достовірні специфічні ознаки атрофії м'язових волокон селективного характеру [12–15]. Зокрема, атрофуються м'язові волокна ПВ типу, наприклад у *m. plantaris* і *m. gastrocnemius* зі зниженням усієї м'язової маси до 30 % [12, 17]. Установлено, що алкогольна проксимальна міопатія є наслідком зменшення розміру волокон без змін їх кількості [18]. Середній діаметр м'язових волокон за дії етанолу становить 80 % від їх діаметра в контрольних групах [11]. Такі порушення, є найбільш поширеним розладом функціонування скелетних м'язів, які наявні в близько 50 % людей, котрі зловживають алкоголем [13]. Характерно, що атрофія м'язових волокон ПВ типу не супроводжується фіброзом, некрозом і запальною інфільтрацією [19]. Поряд зі змінами волокон ПВ типу доведено, що пролонгована алкогольна залежність супроводжується незначними атрофічними змінами м'язових волокон І типу, зокрема *musculus gastrocnemius* [21]. Це суперечить отриманим раніше даним [22] і

підтверджує генералізованість ушкоджувального впливу метаболітів етилового спирту. Наявні результати про зменшення кількості ядер м'язових волокон в осіб із хронічною алкогольною інтоксикацією, що також може бути одним із проявів атрофічного процесу [23].

При ішемічній травмі скелетних м'язів спостерігаємо високу кореляцію між тривалістю ішемізації та подальшою життєздатністю м'язового волокна [24–26]. Мікроскопічні дослідження виявили чіткі ознаки некротичного й рубцевого дегенеративного переродження як на рівні цілого ішемізованого м'яза, так і на рівні окремих волокон у градуальній залежності від стадії ішемічного процесу [25, 31], що проявляються між 2 та 7 годинами [32]. Найхарактернішими патологічними змінами ішемічного ушкодження скелетних м'язів є масивний некроз, що супроводжується депігментацією. Ступінь некрозу в м'язах після 3, 4 і 5 год ішемії становив 2, 30 і 90 % відповідно. При цьому він був більш виражений у центральній його частині [33]. Максимальні гістологічні зміни відбуваються після 24 годин ішемії [34]. Основними характеристиками некрозу є набряк клітин і мітохондрій, розсіяна конденсація хроматину й пошкодження плазматичної мембрани, [35] зокрема втрата її гладкості з утворенням випинів і вп'ячувань, а також фрагментація. Загальна картина ішемічного ушкодження включає наявність м'язових волокон нерівномірної товщини з порушенням поперечної посмугованості, вираженою вакуолізацією, ознаками гіпер-трофії та некротичними змінами [25]. Характерною ознакою є виражений міжм'язовий набряк сполучнотканинної стромы [31]. Гістологічні зміни спостерігаємо уже після 30-хвилинної ішемії. Вони залежать від її тривалості [25].

Існує безпосередній зв'язок між ступенем некротичних змін, виснаженням АТФ [25, 36] та мітохондріальною дисфункцією [37]. Установлено, що за ішемії тривалістю 1 год спостерігаємо легку вакуолізацію в периферичних частинах волокон, зумовлену руйнуванням мітохондрій [38]. Ушкодження мітохондріального апарату проявляється в появі органел кулястої форми, зменшенні щільності матриксу, відсутності або фрагментації крист у більшості органел [39]. Збільшення тривалості ішемії призводить до поглиблення деструктивних змін у м'язових волокнах із появою поблизу них лізосом і фагоцитів. Клітини втрачають здатність зберігати свій гомеостаз, виникає порушення іонного обміну, що призводить до набухання

клітини. Пізніше спостерігаємо поступове заміщення скоротливих елементів міоцитів сполучною тканиною [38].

Установлено, що м'язи, у яких переважають міоцити I типу, зазнають більших пошкоджень, ніж м'язи, у яких переважають волокна II типу [30]. У м'язових волокнах при експериментальній ішемії, яка триває 1 год, простежено високу вакуолізацію периферійних частин волокон, яка виникає в результаті руйнування мітохондрій. У деяких волокнах з'являється неповна дезорганізація, їх внутрішні структури частково вкорочуються, а їх центр заповнений безструктурними елементами. У самих волокнах або навколо них з'являється багато фагоцитів. При ішемії короткого періоду через набряк ендотелію виникає капілярна непрохідність, унаслідок чого припиняється кровопостачання м'яза й виникає гіпоксія [40–41]. Також після ішемії тривалістю 1 год в периферичних частинах волокон спостерігаємо легку вакуолізацію, зумовлену руйнуванням мітохондрій [42].

Збільшення тривалості ішемії призводить до поглиблення деструктивних змін у м'язових волокнах. При двогодинній ішемії відбувається втрата чітких контурів поперечної посмугованості м'язової тканини, що є наслідком структурних перебудов усередині ураженого волокна. Спостерігаємо руйнування скоротливого апарату. Також значно збільшується кількість сполучнотканинних елементів. Волокна втрачають свою структуру. Але на цьому етапі ішемії серед волокон трапляються ділянки, де структура м'язових клітин не зруйнована й відповідає нормі. Тобто при двогодинній ішемії не всі волокна зазнають руйнації. Деякі здатні зберігати свою цілісність і структуру.

За даними деяких дослідників [42–43] та результатами наших досліджень, при ішемії литкового м'яза тривалістю 3 год без реперфузії зникає поперечна посмугованість м'яза. Також спостерігаємо осередки некрозу цитоплазми частини міоцитів. Характерні розриви м'язових волокон, набряки ендомізю. Волокна м'яза зазнають значних змін, які проявляються контрактурами, вогнищами міофібрилолізу, деструкцією ділянок поперечного та поздовжнього з'єднання міоцитів. Пошкоджені ділянки заміщуються на сполучну та жирову тканини. Збережені м'язові волокна атрофічно змінюються. Очевидно, що ці зміни зводять до мінімуму скоротувальну функцію м'язів. Ішемія скелетних м'язів, яка зумовлена тривалим стисненням або судинним

ушкодженням в анаеробних умовах і за зниження продукції АТФ пригнічує активність Ca^{2+} -АТФ-ази, що призводить до накопичення внутрішньоклітинної рідини та зростання концентрації інтрафібрилярного Ca^{2+} або зниження рівня його акумуляції чи відтоку внаслідок підвищення проникності мембрани саркоплазматичного ретикулулу й викликає розвиток контрактури [36]. За умов хронічної алкогольної інтоксикації ці зміни поглиблюватимуться, оскільки мембранна дестабілізація супроводжується підвищенням активності Ca^{2+} -АТФ-ази, що змінює гомеостаз кальцію та дестабілізує скоротливу функцію м'язів, причому простежено помітне збільшення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} під час алкогольної інтоксикації [44]. Збільшення клітинної концентрації активує кальцій-активовані нейтральні протеази, які спричиняють дегенерацію внутрішньоклітинних білків, що за умов алкогольної міопатії є фактором додаткового протеолізу. Характерно, що зменшення м'язової маси й відносного вмісту м'язових протеїнів під час алкогольної інтоксикації пояснюється не лише протеолізом, але й зміною клітинної проліферації та диференціації [45].

Зважаючи на те, що важкі випадки алкогольної міопатії пов'язані з високою смертністю, деякі дослідники висловлюють припущення, що несвоєчасне діагностування гострої ішемії різної етіології та неефективні клінічні заходи можуть збільшити ризик смерті постраждалого саме через зменшення життєздатності м'язової тканини й загального отруєння організму цитотоксичними продуктами рабдоміолізу. Відтак обтяження ішемії скелетних м'язів нижніх кінцівок гострим чи хронічним міотоксичним впливом алкоголю не викликає сумніву. Адже алкогольна міопатія характеризується м'язовою слабкістю, атрофією, спазмами, ригідністю й судомою м'язів [46]. Зазначимо, що оксидативний стрес, який є характерною ознакою ішемічного ушкодження скелетних м'язів, посилюється за умов алкогольної інтоксикації [47], унаслідок чого ушкоджуються міофібрили та мембранні системи сарколеми й мітохондрій. Існує припущення, що зміни структури волокон ішемізованого м'яза в алкоголізованих щурів, порівняно з нормою, асоційовані з різним ступенем алкоголь-індукованої атрофії міофібрил, що додатково ускладнюється васкулярним ішемічним ушкодженням [48]. Патоморфологічні дослідження м'язів при хронічній алкогольній міопатії свідчать про наявність

гострого м'язового некрозу (рабдоміолізу) з деструкцією м'язових волокон і внутрішньоклітинним набряком. Уважається, що прогресивне зменшення м'язової маси під час хронічної алкогольної інтоксикації також зумовлене підвищенням рівня с-трус протонкогену й алкоголь-індукованим апоптозом міоцитів [49]. Відзначено, що ультраструктурні та метаболічні зміни в скелетних м'язах, викликані компресійним васкулярним стисненням і хронічною алкогольною інтоксикацією, сприятимуть взаємному посиленню ушкоджувальних впливів.

Отже, у ході проведених досліджень виявлено, що зі збільшенням тривалості ішемії змінюється ступінь вираження морфологічних змін, порівняно з контрольною групою тварин. Найбільшого ступеня дегенеративних змін зазнають волокна при ішемії тривалістю 3 год. Спостерігаємо початкові етапи некрозу волокон, що супроводжуються зміною середніх розмірів товщини волокон із тенденцією до їх зменшення та збільшенням ендомізійу за рахунок його набряку. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями Kauko A. [50], які відзначали, що більш інтенсивні ультраструктурні зміни в м'язах проявляються вже після двох годин ішемії й підсилюється після 3-х годин ішемії. Ступінь некрозу в м'язах після 3 год ішемії становив 20 %. У наших дослідженнях ми спостерігали лише рідкісні початкові етапи некрозу. На фоні ішемії та хронічної алкогольної інтоксикації простежено більш складні структурні зміни волокон литкового м'яза, порівняно з контролем. Яскраво виражені дегенеративні зміни в цілісності сарколеми, про що свідчать численні вигини та вп'ячування на її поверхні; значно порушено впорядкування й хід міофібрил у волокнах, зменшується діаметр м'язових волокон, окремі волокна руйнуються та фрагментуються. У статті Urbano-Marquez A. [51] відзначено, що ультраструктурні й метаболічні зміни в скелетних м'язах, які викликані компресійним васкулярним стисненням і хронічною алкогольною інтоксикацією, сприятимуть взаємному посиленню ушкоджувальних впливів, що проявлятимуться у вигляді атрофії волокон, утраті їх структури й чітких меж розмежування, руйнуванням скоротливого апарату – міоцитів.

Висновки

За умов хронічної алкоголізації та ішемії різної тривалості порушуються структура й хід

частково атрофованих унаслідок алкогольної міопатії волокон, відбуваються дегенеративні зміни в цілісності сарколеми, про що свідчать численні вигини та вп'ячування на її поверхні; у деякій частині волокон зменшується об'єм міофібрил, ендомізій набрякає й починає некротизуватися, міофібрили роз'єднуються. У м'язі відзначено місця з розволокненням, фрагментацією волокон. Простежено появу нейтрофілів поміж міофібрил і дифузні крововиливи, але, попри це, в окремих ділянках зберігається типова поперечна посмугованість. Отримані результати свідчать про негативну синергію міотоксичних впливів етилового спирту та руйнівного впливу судинної ішемії на волокна *m. gastrocnemius* щурів.

Література

1. Murdock, M. Compartment syndrome: a review of the literature. *Clin. Podiatr. Med. Surg.*; 2012, 29 (2), p 301–310.
2. Заводський, Д.; Ноздренко, Д.; Хома О.; Сорока, В. Зміна швидкісно-силових показників скорочення гомілкового м'язу щура за умов штучно викликаній васкулярній ішемії. *Вісник Київського університету імені Тараса Шевченка. Серія біологічна*; 2013, 63, с 5–7.
3. Martin, F. C.; Slavin, G.; Levi, A. J.; Peters T. J. Investigation of the organelle pathology of skeletal muscle in chronic alcoholism. *J Clin. Pathol.*; 1984, 37, pp 448–454.
4. Erkut, B.; Özyazıcıoğlu, A.; Karapolat, B. S.; Koçoğulları, C..U.; Keles, S.; Ateş, A.; Gundogdu, C.; Kocak, H. Effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol and allopurinol on ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle: an experimental stud. *Drug Target Insights*; 2007; 2, p 249–58.
5. Rácz, I. B.; Illyés, G.; Sarkadi, L.; Hamar J. The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *Eur Surg Res*; 1997, 29 (4), pp 254–63.
6. Duarte, J. A.; Gloser, S.; Remiao, F.; Carvalho, F.; Bastos, M. L.; Soares, J. M.; Appell, H. J. Administration of tourniquet: I. Are edema and oxidative stress related to each other and to the duration of ischemia in reperfused skeletal muscle? *Arch Orthop Trauma Surg*; 116, 1997, pp 97–100.
7. Noveli, G. P.; Adembri, C.; Gandini, E.; Orlandini, S. Z.; Papucci, L.; Formigli, L.; Manneschi, L. I.; Quattrone, A.; Patresi, C.; Capaccioli, S. Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. *Am J Surg*; 1997; 173, pp 206–209.
8. Халилов, М. Х.; Закихорджаев, Ш. Я. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации; *Вопросы клиники алкоголизма*: сб. науч. тр., Ташкент, 1983; с 38–41.

9. Меркулов, Г. А. *Курс паталогической техники*, 3 изд, исп. и доп.; Медгиз: Ленинград, 1956; с 124–126.
10. Fernandez-Sola, J.; Preedy, V. R.; Lang, C. H.; Gonzalez-Reimers, E.; Arno, M.; Lin, J. C. I.; Wiseman, H.; Zhou, S.; Emery, P. W.; Nakahara, T. Molecular and cellular events in alcohol-induced muscle disease. *Alcohol Clin Exp Res*; 2007, 31 (12), pp 1953–1962.
11. Дереча, Л. М. Алкоголь та його дія на організм: огляд літератури. *Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія: біологія*; 2007, 6 (788), с 7–16.
12. Hunter, R. J.; Neagoe, C.; Järveläinen, H. A.; Martin, C. R.; Lindros, K. O.; Linke, W. A.; Preedy, V. R. Alcohol affects the skeletal muscle proteins, titin and nebulin in male and female rats. *J. Nutr*; 2003, 133 (4), pp 1154–1157.
13. Preedy, V. R.; Adachi, J.; Peters, T. J.; Worrall, S.; Parkkila, S.; Niemela, O.; Asano, M.; Ueno, Y.; Takeda, K.; Yamauchi, M.; et al. Recent advances in the pathology of alcoholic myopathy. *Alcohol Clin Exp Res*; 2001, 25 (5), pp 54S–59S.
14. Preedy, V. R.; Adachi, J.; Veno, G.; Ahmed, S.; Mantle, D.; Mullatti, N.; Rajendram, R.; Peters, T. J. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur. J. Neurol*; 2001, 8 (6), pp 677–687.
15. Preedy, V. R.; Paice, A.; Mantle, D.; Dhillon, A. S.; Palmer, T. N.; Peters, T. J.; Alcoholic myopathy: biochemical mechanisms. *Drug Alcohol Depend.* 2201, 63, pp 199–205.
16. Adachi, J.; Asano, M.; Ueno, Y.; Niemelä, O.; Ohlendieck, K.; Peters, T. J.; Preedy, V. R. Alcoholic muscle disease and biomembrane perturbations (review). *J. Nutr. Biochem*; 2003, 14 (11), pp 616–625.
17. Preedy, V. R.; Patel, V. B.; Reilly, M. E.; Richardson, P. J.; Falkous, G.; Mantle, D. Oxidants, antioxidants and alcohol: implications for skeletal and cardiac muscle. *Front Biosci*; 1999, 4, pp 58–66.
18. Vary, T. C.; Nairn, A. C.; Lang, C. H. Restoration of protein synthesis in heart and skeletal muscle after withdrawal of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*; 2004, 28 (4), pp 517–525.
19. Sharma, S. C.; Ray, R. C.; Banerjee, A. K.; Lakshmanan, C. Chronic muscle wasting in alcoholics – a histochemical and biochemical study. *Indian J Pathol Microbiol*; 1990, 33 (3), pp 244–249.
20. Reilly, M. E.; McKoy, G.; Mantle, D.; Peters, T. J.; Goldspink, G.; Preedy, V. R. Protein and mRNA levels of the myosin heavy chain isoforms I, IIa, IIx and IIb in type I and type II fibre predominant rat skeletal muscles in response to chronic alcohol feeding. *J. Muscle. Res. Cell. Motil*; 2000, 21 (8), pp 763–773.
21. Pipinos, I. I.; Swanson, S. A.; Zhu, Z.; Nella, A. A.; Weiss, D. J.; Gutti, T. L.; McComb, R. D.; Baxter, B. T.; Lynch, T. G.; Casale, G. P. Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 2008; 295 (1), pp 290–296.
22. Slavin, G.; Martin, F.; Ward, P.; Levi, J.; Peters, T. Chronic alcohol excess is associated with selective but reversible injury to type 2B muscle fibers. *J Clin Pathol*; 1983, 36 (7), pp 772–777.
23. Clary, C. R.; Guidot, D. M.; Bratina, M. A.; Otis, J. S. Chronic alcohol ingestion exacerbates skeletal muscle myopathy in HIV-1 transgenic rats. *AIDS Res Ther*; 2011, 8 (30), pp 1–9.
24. Barie, P. S.; Mullins, R. J. Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res*; 1988, 44, pp 284–307.
25. Albani, M.; Megalopoulos, A.; Kiskinis, D.; Parashos, S. A.; Grigoriadis, N.; Guiba-Tziampiri, O. Morphological, histochemical, and interstitial pressure changes in the tibialis anterior muscle before and after aortofemoral bypass in patients with peripheral arterial occlusive disease. *BMC. Musculoskelet. Disord*; 2002, 3 (8), pp 1–7.
26. Rácz, I. B.; Illyés, G.; Sarkadi, L.; Hamar, J. The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *Eur Surg Res*; 1997, 29 (4), pp 254–263.
27. Ноздренко, Д. М.; Мотузюк, О. П.; Долгополов, О. В.; Заводовський, Д. О. Зміна швидкісно-силових параметрів скорочення скелетних м'язів за умов гострої ішемії. *Науковий вісник Волинського національного університету імені Лесі Українки*; 2012, 19 (244), с 101–109.
28. Заводовський, Д.; Ноздренко, Д.; Сорока, В.; Хома, О.; Мотузюк, О. Диверсифікація динаміки розвитку втоми ішемізованого м'язу. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Серія: Біологічні науки*; 2014, 13 (290), с 8–17.
29. Babinkov, V. I.; Khitrov, N. K.; Cherkashina, Z. A. Effect of early Fasciotomy on Intramuscular Pressure and Electrical Excitability of Muscles in Experimental Compartment Syndrome. *Bull. Experim. Biol. Med*; 2000, 130 (9), pp 857–860.
30. Gordon, A. M.; Homsher, E.; Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*; 2000, 80 (2), pp 853–924.
31. Holobar, A.; Farina, D.; Gazzoni, M.; Merletti, R.; Zazula, D. Estimating motor unit discharge patterns from highdensity surface electromyogram. *Clin Neurophysiol*; 2009, 120 (3), pp 551–562.
32. Vieira, T. M.; Windhorst, U.; Merletti, R. Is the stabilization of quiet upright stance in humans driven by synchronized modulations of the activity of medial and lateral gastrocnemius muscles? *J. Appl. Physiol*; 2010, 108 (1), pp 85–97.
33. Loerakker, S.; Oomens, C. W.; Manders, E.; Schakel, T.; Bader, D. L.; Baaijens, F. P.; Nicolay, K.; Strijkers, G. J. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle assessed with T2-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med*; 2011, 66 (2), pp 528–537.
34. Carvalho, A. J.; McKee, N. H.; Green, H. J. Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg*; 1997, 99 (1), pp 163–171.
35. Vignaud, A.; Hourde, C.; Medja, F.; Agbulut, O.; Butler-Browne, G.; Ferry, A. Impaired skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury

in mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [Online]; 2010, <https://dx.doi.org/10.1155%2F2010%2F724914>

36. Tupling, R.; Green, H.; Senisterra, G.; Lepock, J.; Mckee, N. Effects of ischemia on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} release in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 2001, 281, pp 224–232.

37. Tupling, R., 2005 A. R. *Effects of ischemia and ischemia-reperfusion on sarcoplasmic reticulum. Structure and function in rat skeletal muscle*. Thesis for the degree of Doctor of Phisiophy in Kinesiology, University of Waterloo, Canada.

38. Sever, M. S.; Vanholder, R. Crush syndrome: a case report and review of the literature. *J Emerg Med*; 2015, 48 (6), pp 730–731.

39. Wang, X. T.; Tian, Y.; Xu, W. X.; Cui, L. H.; Xiang, S. Y.; Lü, S. C. Protective effects of modeled superoxide dismutase coordination compound (MSODa) against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Cell Physiol Biochem*; 2015, 37 (2), pp 465–476.

40. Valsoni, B. C. G.; Bonfim, M. R.; Camargo, R. C. T.; Abreu, L. C.; Souza, D. R. S.; Camargo Filho, J. C. S. Effects of Passive Smoking Associated with Physical Exercise in the Skeletal Muscles of Rats During Pregnancy and Lactation. *International Journal of Morphology*; 2015, 33, pp 497–506.

41. Brasileiro, J. L.; Fagundes, D. J.; Mijji, L. O. N.; Oshima, C. T. F.; Teruya, R.M.; Guido, I.; Celso M.; Santos, M. A. Isquemia e reperfusão de músculo sóleo de ratos sob ação da pentoxifilina. *Jornal Vascular Brasileiro*; 2007, 6 (1), pp 50–63. <https://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492007000100008>

42. Мальченко, О. А.; Кубышкин, А. В.; Анисимова, Л. В.; Шаланин, В. В.; Мандрик Ю. В. Изменения в мышечной ткани задней конечности крыс в разные сроки формирования синдрома

ишемии-реперфузии. *Таверический медико-биологический вестник*; 2012, 15, (3), ч. 1 (59), с 207–210.

43. Carmo-Araújo, E.M.; Dal-Pai-Silva, M.; Dal-Pai, V.; Cecchini, R.; Anjos Ferreira, A.L. Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. *Int J Exp Pathol*; 2007; 88(3), pp 147–154. doi:10.1111/j.1365-2613.2007.00526.x

44. Ohlendieck, K.; Harmon, S.; Koll, M.; Paice, A. G.; Preedy, V. R.; Ca^{2+} -regulatory muscle proteins in the alcohol-fed rat. *Metabolism*; 2003, 52(9). pp 1102–1112.

45. Литвина, Н. А. *Состояние кровообращения верхних конечностей у больных с диафизарными переломами костей предплечья*. Прокопьевск, 1977. 20 с.

46. Chawla, J.; Gruener, G. Management of critical illness polyneuropathy and myopathy. *Neurol. Clin*; 2010, 28, p 961–977.

47. Gorshkova D. A. Free radical processes state in chronic alcohol intoxication. *Actual problems of medicine*; 2013, 22, p 191–193.

48. Hoek, J. B.; Cahill, A.; Pastorino, J. G. Alcohol and Mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterol*; 2002, 122 (7), p 2049–2063.

49. Патченко, Ю. В.; Салютін, Р. В.; Дамбровський, Д. Б. Стан судинного ендотелію та гістологічні зміни м'язової тканини у хворих при хронічній ішемії кінцівок. *Клінічна хірургія*; 2011, 3, с 41–44.

50. Kauko, A.; Hjelt, L. Morphological changes in striated muscle during ischemia. A clinical and histological study in man. *Actaorthop. Scandinav*, 1998, 39. p 13–19.

51. Urbano-Marquez, A.; Fernandez-Sola, J. The effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle. *Muscle Nerve*; 2004, 30. p 689–707.