

Primljeno 25. 11. 1982.

MILAN CABRIĆ

Filozofski fakultet u Splitu
 OOUR Prirodoslovno-matematičke znanosti

NIGEL T. JAMES

Department of Human Biology and Anatomy
 University of Sheffield, England

~~128R~~
~~128R~~
 128R

**STEREOLOŠKA ANALIZA MIOKAPILARA
 KOD HIPOKINEZIRANIH PASA**

SAŽETAK

Kao posledica hipokinezije javilo se značajno smanjenje gustine kapilarne mreže i broja kapilara na jedinicu površine transverzalnog preseka, uz povećanje međukapilarne razdaljine.

1. UVOD

Kretanje predstavlja jednu od osnovnih karakteristika svih živih bića. Obim i karakter toga kretanja formirao se tokom dugog evolucionog razvitka svake životinjske vrste i predstavlja jedan od onih faktora koji su neophodni za normalno funkcionisanje organizma. Bilo kakvo značajnije ograničavanje kretanja direktno se odražava na funkciju nervno-mišićnog aparata, a preko ovog i na ostale organe i sisteme.

U toku mnogih godina detaljno je ispitana motorno-visceralna i nervno-reflektorna veza mišićnog aparata i kardiovaskularne funkcije (Roughton /11/, Hill /4/, Gonzalez-Fernandez i Atta /3/, Leonard i Jorgensen /7/, Lamb et al. /6/, Birkead et al. /1/, Deitrick et al. /2/, Parin et al. /9/ i drugih). Na žalost, veoma je malo radova koji su se, u ovom kontekstu, bavili problemom morfo-funkcionalnih promena na mišićnim kapilarima za vreme hipokinezije.

Osnovni zadatak našeg istraživanja bio je da se kvantifikuju — uz pomoć stereoloških i morfometrijskih metoda — promene na miokapilarima kod pasa za vreme 8-nedeljnog ograničavanja kretanja.

2. METODIKA ISPITIVANJA

Ispitivani uzorak bio je sastavljen od pet pasa — mešanaca, muškog pola, starosti od 2-4 godine, odabranih po principu slučajnog uzorka.

Eksperimentalne životinje držane su 56 dana u pojedinačnim boksovima dimenzija 120 x 90 x 91 cm. Hranjene su dva puta dnevno. Dnevni obrok sačinjavao je približno 20 g masti, 350 g mesa, 250-300 g kaše od raznih žitarica, 150 g posnog mleka, 120 g povrća i 20 g soli. U prostorijama, u kojima su se nalazili boksovi sa psima, bilo je dnevno osvetljenje, a temperatura je iznosila 15-17°C.

Svakom psu je pre i nakon 56 dana boravka u boku longitudinalnom incizijom uzet, iz predela m. vastus lateralis, komadić mišićnog tkiva.

Tkivo je odmah nakon biopsije fiksirano, u toku tri sata, u 3% gluteraldehidu rastvorenom u 0,1 M PO₄ buferu pri pH 7,4. Nakon toga tkivo je ponovo fiksirano u 2%

vodenom rastvoru OsO₄ u toku jednog sata i pri temperaturi od 4°C, dehidrirano u alkoholu (od 25% do 100%) i ukalupnjeno u EPON.

Tanke kriščiće tkiva, približne debljine od 1 mikrometar bojene su na vrućoj ploči (od oko 90°C) sa 1% toluidin-plavim, rastvorenim u 1% vodenom rastvoru boraksa, a po metodici koju je opisao Pearse /10/.

Dužina kapilara na jedinicu zapremine mišićnog tkiva, odnosno gustina kapilarne mreže, određivana je po formulama:

$$L_v = (P_A)_I + (P_A)_{II} \quad (\text{prema Underwood /13/}, i)$$

$$J_v = 2/3 [(P_A)_I + (P_A)_{II}] \quad (\text{prema Weibel/15/})$$

Minimalna međukapilarna udaljenost određivana je po obrascu:

$$ICD = \sqrt{\frac{2}{(P_A) \times \sqrt{3}}} \quad (\text{prema Odek-Ogunde /8/})$$

Stepen orijentacije kapilara i pokazatelj koncentracije ($\Omega_{i,3}$ i K) izračunati su korišćenjem formula:

$$\Omega_{i,3} = \frac{(P_A)_I - (P_A)_{II}}{(P_A)_I + (P_A)_{II}} \quad (\text{prema Underwood /13/}, i)$$

$$K = 2 \left[1 - \frac{(P_A)_I}{(P_A)_{II}} \right] \quad (\text{prema Weibel /15/})$$

3. REZULTATI ISPITIVANJA

Na tabelama 1 i 2 i slici 1 prikazane su numeričke vrednosti ispitivanih pokazatelja vaskularizacije kod eksperimentalnih životinja pre i posle 8-nedeljne hipokinezije.

Broj kapilara na jedinicu površine transverzalnog preseka mišićnog tkiva $(P_A)_I$ iznosio je pre hipokinezije $1264,47 \pm 101,19$ ($x \pm S_x$), a nakon nje $967,24 \pm 116,41$. Istovremeno se smanjio i broj kapilara na longitudinalnom preseku mišića $(P_A)_{II}$ sa $710,32 \pm 43,91$ na $528,96 \pm 78,45$ kapilara po mm² (<0,001, po χ^2 testu).

Stepen orijentacije kapilara ($\Omega_{i,3}$) iznosio je pre hipokinezije $0,304 \pm 0,050$, a posle $0,301 \pm 0,062$ (razlika nije značajna). Pokazatelj koncentracije kapilara (K) bio

je pre hipokinezije $0,831 \pm 0,156$, a posle 56 dana ograničenog kretanja $0,844 \pm 0,181$ (razlika nije značajna).

Ukupna dužina kapilara na jedinicu volumena mišića (L_v i J_v) iznosila je za L_v $1974,79 \pm 94,11$ pre hipokinezije $1496,21 \pm 147,00$ mm mm^{-3} (značajno na nivou $p < 0,001$), odnosno za J_v $1772,17 \pm 70,25$ pre i $1554,38 \pm 144,43$ mm mm^{-3} posle ograničavanja kretanja (razlika je značajna na nivou $p < 0,001$).

Minimalna međukapilarna udaljenost (ICD) iznosila je na početku $30,54 \pm 1,34$ μm , da bi se nakon hipokinezije povećala na $33,01 \pm 1,34$ μm ($p < 0,5$).

Tabela 1

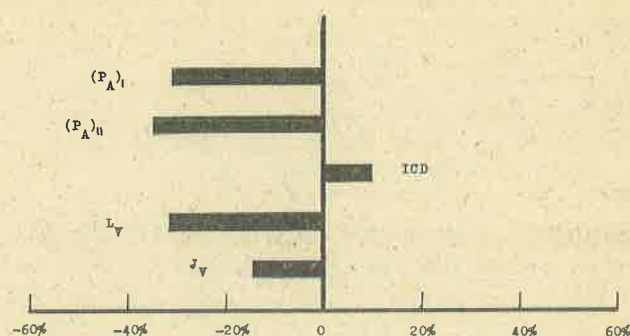
Broj kapilara na jedinicu površine transversalnog ($(P_A)_I$) i longitudinalnog ($(P_A)_{II}$) preseka mišićnog tkiva, ukupna dužina kapilara na jedinicu volumena mišića (L_v) i (J_v), stepen orijentacije kapilara ($\Omega_{1,3}$), pokazatelj koncentracije kapilara (K) i minimalna međukapilarna udaljenost (ICD) kod eksperimentalnih životinja pre hipokinezije

No	$(P_A)_I$ (mm^{-2})	$(P_A)_{II}$ (mm^{-2})	L_v (mm mm^{-3})	J_v (mm mm^{-3})	$\Omega_{1,3}$	K	ICD (μm)
1	1360,20	554,15	1914,35	1629,21	0,421	1,185	29,13
2	1435,76	705,28	2141,04	1878,57	0,341	1,017	28,35
3	1460,95	780,85	2241,80	1994,94	0,303	0,931	28,11
4	931,98	806,04	1738,02	1679,07	0,072	0,270	35,20
5	1133,50	705,28	1838,78	1679,07	0,232	0,755	31,91
X	1264,47	710,32	1974,79	1772,17	0,304	0,831	30,54
S-	101,19	43,91	94,11	70,25	0,050	0,156	1,34
x							

Tabela 2

Broj kapilara na jedinicu površine transversalnog ($(P_A)_I$) i longitudinalnog ($(P_A)_{II}$) preseka mišićnog tkiva, ukupna dužina kapilara na jedinicu volumena mišića (L_v) i (J_v), stepen orijentacije kapilara ($\Omega_{1,3}$), pokazatelj koncentracije kapilara (K) i minimalna međukapilarna udaljenost (ICD) kod eksperimentalnih životinja nakon 56 dana hipokinezije.

No	$(P_A)_I$ (mm^{-2})	$(P_A)_{II}$ (mm^{-2})	L_v (mm mm^{-3})	J_v (mm mm^{-3})	$\Omega_{1,3}$	K	ICD (μm)
1	1138,87	377,83	1561,70	1280,08	0,516	1,361	31,23
2	1057,93	579,34	1637,27	1462,96	0,292	0,904	33,03
3	1183,87	755,66	1939,53	1778,80	0,220	0,723	31,23
4	579,34	604,53	1183,87	1180,34	0,021	0,086	44,64
5	831,23	327,45	1158,68	980,84	0,434	1,212	37,27
X	967,24	528,96	1496,21	1554,38	0,301	0,844	33,01
S-	116,41	78,45	147,00	144,43	0,062	0,181	2,24
x							



Sl.1. Procentualno smanjenje, odnosno povećanje ispitivanih pokazatelja nakon 56 dana hipokinezije

4. DISKUSIJA

Rezultati naših ispitivanja su pokazali, kao što se može videti, da je 56-dnevnu hipokineziju pratilo značajno smanjenje broja kapilara na uzdužnom i poprečnom preseku mišićnog tkiva i, samim tim, značajno smanjenje gustine kapilarne mreže na jedinicu volumena mišića (L_v i J_v). Pri tome, nije došlo do značajnije preorijentacije kapilara ($\Omega_{1,3}$ i K) u odnosu na longitudinalni i transversalni presek mišića. Međukapilarna udaljenost je, nakon hipokinezije, povećana, što je u kontekstu smanjenja gustine kapilarne mreže.

U literaturi nismo naišli na slična stereološka istraživanja kapilara u toku hipokinezije, te ove dobijene vrednosti teško možemo da poredimo sa drugim autorima. Međutim, u radovima Wachtlove i Parizkove /14/, Kovalenka i Gurovskog /5/, Savika /prema 5/, Taylora et al. /12/, Wiedemana /16/, Kuprijanova et al. /prema 5/ registrovane su destruktivne promene na kapilarama, sa smanjenjem broja kapilara, u toku duže ili kraće hipokinezije. Pri tome, na žalost, ni jedan rad nije posvećen izučavanju ovih promena kod pasa.

U toku analize mišićnog tkiva kod hipokineziranih pasa primetili smo povećanu pojavu sekundarnih lizozoma i fagozoma, što potvrđuje da se radi o povećanoj autolizi staničnog sadržaja i vrlo intenzivnim kataboličkim procesima. Možda se i na taj način mogu objasniti detektovane destruktivne promene na miokapilarima.

5. ZAKLJUČAK

Iz sprovedenih ispitivanja promena na miokapilarima u toku 56-dnevne hipokinezije mogu se izvući sledeći zaključci:

1. Kao posledica hipokinezije zabeleženo je značajno smanjenje gustine kapilarne mreže (od 31,9%, odnosno od 14,0%), uz, također, značajno smanjenje broja kapilara na jedinicu površine transversalnog (od 30,7%) i longitudinalnog (od 34,3%) preseka mišića. Istovremeno je zabeleženo povećanje međukapilarne razdaljine (od 8%)

2. Period hipokinezije nije izazvao značajniju promenu u stepenu orijentacije kapilara unutar mišićnog tkiva.

6. LITERATURA

1. Birkhead, N. C., Issekutz, B., Blizznard, J. J., Hought, G. Y.: Cirkulatory and metabolic effects of prolonged inactivity. *Aerospace Med.*, 35:259-260, 1964
2. Detrick, J. E., Whedon, K., Shorr, E.: Effects of Immobilization upon Various Metabolic and Physiologic Functions of Normal Man. *Am. J. Med.*, 4:3-36, 1948
3. Gonzales-Fernandez, J. M. i Atta, S. E.: Concentrations of oxygen around capillaries in polygonal regions of supply. *Math. Biosci.*, 13:55-69, 1972
4. Hill, A. V. *Trails and Trials in Physiology*, Edward Arnold Publ., London, 1965
5. Kovalenko, E. A., Gurovskij, N. N.: *Gipokinezija. Medicina*, Moskva, 1980.
6. Lamb, L. E. An assessment of the circulatory problem of weightlessness in prolonged space flight. *Aerosp. Med.*, 35: 413-419, 1964.
7. Leonard, E. F. i Ørgensen, S. B.: The analysis of convection and diffusion in capillary beds. *Am. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3:294-339, 1974.
8. Odek Ogunde, M.: Myocardial capillary density in hypertensive rats. *Lab. Invest.* 46: 54-60, 1982.
9. Parin, V. V., Krupina, T. N., Mihajlovskij, G. P. i Tizul, A. J.: Osnovnye izmenenia v organizme zdorovogo čeloveka pri 120-sutočnom posteljnomo soderžanii. *Kosm. biol. med.* 11: 59-64, 1970.
10. Pearse, D. C.: *Histological techniques for electron microscopy*. Academic Press, London, 1964.
11. Roughton, F. W. J.: Diffusion and chemical reaction velocity in cylindrical and spherical systems of physiological interest. *Proc. Roy. Soc. B.*, 140: 203-229, 1952.
12. Taylor, H. L., Henschel, A., Brozek, J. i Keys, A.: Effect of bedrest on cardiovascular function and work performance. *J. appl. Physiol.*, 2: 223-239, 1949.
13. Underwood, E. E.: *Quantitative stereology*. Addison-Wesley, Cambridge, 1970.
14. Wachtlova, M. i Parizkova, J.: Comparison of capillary in skeletal muscles of animals differentiating in respect of their physical activity. *Physiol. Bohemoslov.*, 21: 489-495, 1972.
15. Weibel, E. R.: *Stereological methods*. Academic Press, London, 1980.
16. Wiedeman, M. P.: Dimensions of blood vessels from distributing artery to collecting vein. *Circulat. Res.*, 12: 375-378, 1963.

Cabric, M.; James, N. T.

UDC 591.415 : 591.86 : 599.742.1 : 616-008.65

A STEREOLOGICAL ANALYSIS OF MYOCAPILLARIES IN DOGS SUBJECTED TO A PERIOD OF HYPOKINESIS

hypokineses / blood capillaries / skeletal muscle

Stereological and morphometric methods were used to quantify changes in the myocapillaries of five male mongrel dogs subjected to fifty-six days of hypokineses. Inactivity was enforced by keeping the animals in a confined space.

Examination of muscle tissue before and after the period of inactivity revealed a significant decrease in the density of the capillary network (a decrease of 31.9% and 14% using the equations of Underwood and Weibel, respectively). This was attributed to the effect of prolonged inactivity. The number of capillaries, per unit area was also significantly decreased both for transverse (by 30.7%) and longitudinal (by 34.3%) cross-sections. At the same time there was an increase of 8% in intercapillary distance.

The period of hypokineses did not give rise to any significant changes in the degree of orientation of capillaries in muscle tissue.

Милан Чабрич Нигел Т. Джеймс

СТЕРЕОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОКАПИЛЛЯРОВ У ГИПОКИНЕЗИРОВАННЫХ СОБАК

При помощи стереологического и морфометрического методов проведено измерение изменений микрокапилляров у пяти собак, которые провели в состоянии гипокинезии 56 дней. Собаки были неподвижными, так как находились в тесном пространстве.

Измерение характеристик мышечной ткани до и после периода неподвижности показывает значительное уменьшение плотности капиллярной сети (на 31.9% и 14.0% при применении уравнения Андервуда и Вайбла, относительно). Это объясняется продолжительной неподвижностью собак. Количество капилляров в единице площади также значительно уменьшилось для поперечного (на 30.7%) и для продольного (на 34.3%) пересечений. В то же время увеличилось на 8% расстояние между капиллярами.

В течение гипокинезии не обнаружены значительные изменения в ориентации капилляров в мышечной ткани.

