

Stereološka analiza kapilar v debeli prečni rezini skeletne mišice

Stereological analysis of capillaries in thick slice of skeletal muscle

Vita Čebašek¹

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za anatomijo / Korytkova 2, 1000 Ljubljana

E-Mail: vita.cebbasek@mf.uni-lj.si

*Vita Čebašek; Tel.:+386 1 543 7300; Fax: +386-1 543 7301

Izvleček: V debelih prečnih rezinah hitrih mišic extensor digitorum longus (EDL) in počasnih mišic soleus (SOL) smo s stereološko analizo določali dolžino kapilar na površinsko enoto mišičnih vlaken (Lkap/Svl). V mišici EDL so imela tanka oksidativna mišična vlakna večje razmerje Lkap/Svl kot debela glikolitična mišična vlakna ($(35,03 \text{ mm}^{-1} \pm 1,87 \text{ mm}^{-1} : 22,28 \text{ mm}^{-1} \pm 4,04 \text{ mm}^{-1})$ ($p < 0,05$) in večje kot oksidativna vlakna počasne mišice SOL ($31,37 \text{ mm}^{-1} \pm 3,43 \text{ mm}^{-1}$) ($p < 0,05$). Oksidativna vlakna mišice SOL in glikolitična vlakna mišice EDL so bila enako debela, razmerje Lkap/Svl pa je bilo pri oksidativnih vlaknih večje. Iz rezultatov analize sklepamo, da dolžine kapilar ob mišičnem vlaknu ne določa le debelina mišičnih vlaken ampak predvsem njihova presnova. Menimo, da je razmerje Lkap/Svl koristno orodje za proučevanje plastičnosti mišic, saj nudi vpogled v presnovne spremembe mišičnih vlaken.

Ključne besede: kapilare; mišična vlakna; skeletna mišica; stereologija

Abstract: Stereological analysis of the thick cross sections of fast extensor digitorum longus (EDL) and slow soleus (SOL) muscles was performed and the capillary length to muscle fibre surface area ratio (Lcap/Sfib) evaluated. The Lcap/Sfib ratio of thin oxidative EDL muscle fibres was higher than that of thick glycolytic EDL muscle fibres ($35,03 \text{ mm}^{-1} \pm 1,87 \text{ mm}^{-1} : 22,28 \text{ mm}^{-1} \pm 4,04 \text{ mm}^{-1}$) ($p < 0,05$) and higher than that of oxidative SOL muscle fibres ($31,37 \text{ mm}^{-1} \pm 3,43 \text{ mm}^{-1}$) ($p < 0,05$). Although the thickness of slow oxidative SOL muscle fibres and of fast glycolytic EDL muscle fibres were equal, the ratio Lcap/Sfib of oxidative SOL fibres was higher. The results indicate that the length of capillaries of skeletal muscle fibres correlates well with oxidative capacity of muscle fibres. The Lcap/Sfib ratio offers an insight into muscle fibre metabolism. We believe it can serve as an useful tool for study of skeletal muscle plasticity.

Key words: capillaries; muscle fibres; skeletal muscle; stereology

1. Uvod

Slika prečnega prereza skeletne mišice vsebuje veliko morfoloških podatkov, ki nam v korelaciji z biokemičnimi podatki nudijo vpogled v delovanje mišice. Pri ocenjevanju morfoloških značilnosti tkiva nam delo zelo olajša stereologija, veda, ki omogoča kvantitativno analizo notranje zgradbe 3D struktur zgolj na podlagi analize dvodimenzionalnih (2D) prerezov skozi (Weibel in sod., 1966). Stereologija uporablja posebne merske sisteme, t.

im. testne mrežice, s pomočjo katerih štejemo presečišča med opazovano strukturo in oznakami testnega sistema. S številkami izražena količina neke strukture v tkivu je zelo uporaben podatek, saj omogoča objektivno primerjavo in olajša nadaljnjo statistično analizo.

Postopki štetja presečišč med opazovano strukturo in stereološkimi testnimi sistemi so se z leti spreminjali in izboljševali. Iz prvotnega polaganja prozornih testnih mrežic na mikroskopsko sliko ali na fotografijo tkivnega preparata in ročnega štetja števila presečišč, so se ti

postopki v času računalnikov modernizirali in pohitrili. Danes se vedno bolj uveljavljajo digitalni testni sistemi, ki jih generiramo z računalniškimi programi in jih projiciramo na digitalno sliko preparata na zaslonu.

V tej študiji smo prikazali praktično uporabo dveh računalniško generiranih stereoloških testnih sistemov, s katerima smo tridimenzionalno ocenjevali dolžino kapilar ob površini mišičnih celic (vlaknen). Stereološke testne sisteme smo projicirali na serije slik, zajetih s konfokalnim mikroskopom iz debelih prečnih rezin dveh skeletnih mišic podgane, homogeno grajene in počasi krčljive mišice soleus (SOL) ter heterogeno grejene in hitro krčljive mišice ekstenzor digitorum longus (EDL).

2. Material in metode

Analizirali smo pet mišic SOL in pet mišic EDL podgan. Iz sredine zamrznjenih mišic smo s kriptomom narezali 120 mikronov debele tkivne rezine, jih fiksirali in obarvali s fluorescentnimi barvili za prikaz kapilar in mišičnih vlaken (Čebašek in sod., 2004). Na vsaki tkivni rezini smo z nepristranskim sistematičnim vzorčenjem izbrali pet mest iz katerih smo z objektivom Plan-Neofluar oil immersion 40x, s konfokalnim mikroskopom znamke Zeiss LSM 510 ali Bio-Rad MRC 600, zajeli globinske serije slik, med seboj oddaljene 1 μ m. Zajete serije optičnih rezin tkiva smo uporabili za stereološko ocenjevanje dolžine kapilar in površine mišičnih vlaken, pri čemer smo uporabili programa FAKIR in SLICER (Kubínová in sod., 2001), ki delujeta v programskem okolju Ellipse (ViDiTo, Slovakia).

Z računalniškim programom FAKIR smo generirali stereološki testni sistem v obliki digitalne mreže vzporednih premic (preiskovalna sonda FAKIR), postavljenih v tri med seboj pravokotne ravnine. Digitalne testne premice smo projicirali v z-serijo slik, ki smo jih na zaslonu videli kot točke oziroma majhne kvadratke, ki prebadajo mišična vlakna. Število presečišč med testnimi premicami in površino mišičnega vlakna, ki smo jih našli skozi celotno z-serijo slik, smo uporabili za izračun površine i-tega mišičnega vlakna S_i (vl) v debelini prečne tkivne rezine, po enačbi:

$$S_i(vl) = 2/3 u (I_1^i + I_2^i + I_3^i), \quad (1)$$

kjer je u konstanta mreže (razdalja med sosednjima vzporednima premicama ene ravnine) in je I_j^i ($j = 1, 2, 3$) število presečišč med j -to sondo FAKIR in plaščem i -tega vlakna.

Z računalniškim programom SLICER smo generirali stereološki testni sistem v obliki digitalne mreže vzporednih ploskev (preiskovalna sonda SLICER), postavljenih v tri med seboj pravokotne ravnine, ki smo jih

projicirali v z-serijo slik. Na zaslonu smo ploskve videli kot premice, ki režejo oziroma potujejo skozi mišično tkivo. Število presečišč med kapilarami enega mišičnega vlakna in preiskovalnimi sondami, ki smo jih našli skozi celotno z-serijo slik smo uporabili za oceno dolžine kapilar ob i -tem vlaknu L_i (kap) v debelini prečne tkivne rezine po enačbi:

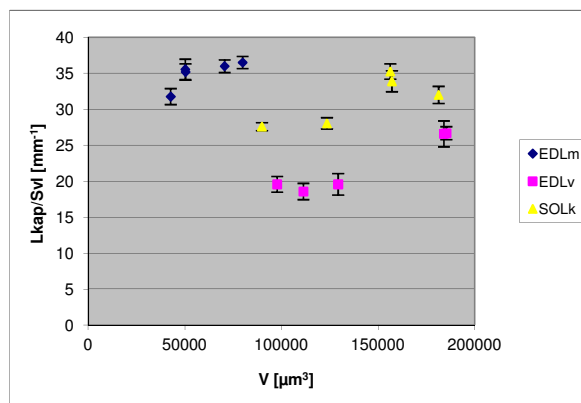
$$L_i(\text{kap}) = 2/3 d (Q_1^i + Q_2^i + Q_3^i), \quad (2)$$

kjer je d konstanta mreže (razdalja med sosednjima vzporednima ploskvama ene ravnine) in je Q_j^i ($j = 1, 2, 3$) število presečišč med j -to SLICER-jevo preiskovalno sondo.

Zbrane podatke o dolžini kapilar in površini mišičnih vlaken smo primerjali s Studentovim t-testom za neodvisne vzorce, pri čemer smo uporabili statistični paket SYSTAT (1991).

3. Rezultati

V homogeno grajenih mišicah SOL smo analizirali 244 mišičnih vlaken, v povprečju 55 na mišico, v heterogeno grajenih mišicah EDL pa 587 mišičnih vlaken, v povprečju 117 na mišico. Mišična vlakna počasne mišice SOL in hitre mišice EDL so imela v povprečju enako dolžino kapilar na površinsko enoto mišičnega vlakna ($L_{\text{kap}}/S_{\text{vl}}$) ($31,37 \text{ mm}^{-1} \pm 3,43 \text{ mm}^{-1} : 30,11 \text{ mm}^{-1} \pm 3,01 \text{ mm}^{-1}$) ($\bar{x} \pm \text{SD}$). Pri heterogeno grajeni hitri mišici EDL smo ločeno analizirali največja oziroma debela mišična vlakna in najmanjša oziroma tanka mišična vlakna. Pri tankih vlaknih mišice EDL je bilo razmerje $L_{\text{kap}}/S_{\text{vl}}$ večje kot pri debelih ($35,03 \text{ mm}^{-1} \pm 1,87 \text{ mm}^{-1} : 22,28 \text{ mm}^{-1} \pm 4,04 \text{ mm}^{-1}$) ($\bar{x} \pm \text{SD}$) ($p < 0,05$) in celo večje kot pri vlaknih mišice SOL ($31,37 \pm 3,43$) ($\bar{x} \pm \text{SD}$) ($p < 0,05$) (Graf 1).



Graf 1. Dolžina kapilar na površinsko enoto mišičnega vlakna ($L_{\text{kap}}/S_{\text{vl}}$) (mm^{-1}) ($\bar{x} \pm \text{SD}$) za oksidativna mišična vlakna mišice SOL (rumeni trikotniki) in za mišična vlakna mišice EDL ločena v dve skupini, za tanka

oksidativna mišična vlakna (modri rombi) in za debela glikolitična mišična vlakna (vijolični kvadrati).

4. Diskusija

S stereološko analizo slik zajetih s konfokalnim mikroskopom iz debelih prečnih rezin dveh fiziološko različnih podganjih mišic smo ugotovili, da imajo mišična vlakna mišic SOL in EDL v povprečju enako razmerje L_{kap}/S_{vl} . Mišica SOL je homogeno grajena, mišico EDL pa gradijo heterogena mišična vlakna različnih debelin, z različno presnovo. S citofotometrično študijo so ugotovili, da je aktivnost oksidativnih encimov v najtanjših mišičnih vlaknih podganje mišice EDL večja kot v najdebelejših mišičnih vlaknih te mišice, in celo večja kot v mišičnih vlaknih mišice SOL (Punkt in sod., 1996). S proučevanjem sprememb kapilarne mreže po treningu, so v podganjih skeletnih mišicah ugotovili, da je velikost stične površine med kapilarami in površinsko ovojnico mišičnih vlaken (sarkolemo) odvisna od gostote mitohondrijev v mišičnem vlaknu (Poole in Mathieu Costello, 1996). Rezultati naših meritev dolžine kapilar, ki smo jo ocenjevali ob posameznih mišičnih vlaknih, so v skladu z rezultati zgornjih dveh raziskav, saj smo v tankih mišičnih vlaknih mišice EDL ugotovili večje razmerje L_{kap}/S_{vl} kot v debelih in večje kot v mišičnih vlaknih mišice SOL (Graf 1). Ugotavljamo, da spremenljivka L_{kap}/S_{vl} dobro odraža presnovo mišičnih vlaken in menimo, da je zato še posebej primerna za ocenjevanje tkivnih sprememb, kjer pričakujemo spremembe v presnovi mišičnih celic.

Zgradba skeletnih mišic je specializirana za točno določena opravila. Vzdržljive skeletne mišice, ki so aktivne skozi daljše časovno obdobje imajo večji delež počasi krčljivih oksidativnih mišičnih vlaken, eksplozivne mišice, ki so le občasno aktivne pa imajo večji delež hitro krčljivih mišičnih glikolitičnih vlaken. V številnih študijah, kjer so proučevali odzivnost različnih človeških in živalskih skeletnih mišic na spremenjene pogoje dela, so ugotovili izjemno prilagodljivost oziroma spremenljivost mišičnih vlaken. Po treningu, po poškodbah ali različnih bolezenskih stanjih so ugotovili, da se lahko spremeni debelina mišičnih vlaken ali pa se spremeni in prilagodi presnova oziroma njihove biokemične in fiziološke lastnosti. Ta pojav poznamo kot plastičnost mišic (Pette, 2001). Spremenjeno velikost ali histokemičen tip mišičnih vlaken lahko dobro ocenimo že z analizo dvodimenzionalnih mikroskopskih slik obarvanih rezin mišičnega tkiva. Spremenjeno gostoto kapilar pa je dobro ocenjevati v treh dimenzijah (Mathieu in sod, 1983), saj zaradi morebitnega vijugavega poteka kapilar ali prečnih anastomoz (povezav), obstaja nevarnost, da s klasično

dvodimenzionalno analizo, dolžino kapilar ob mišičnih vlaknih podcenimo (Čebašek in sod, 2010).

3. Zaključki

S stereološko analizo tkiva smo ugotovili, da je razmerje med dolžino kapilar in površino mišičnega vlakna sorazmerno z intenzivnostjo oksidativne presnove v mišičnih vlaknih. Menimo, da je številsko razmerje L_{kap}/S_{vl} koristno orodje tudi za proučevanje plastičnosti mišic, saj nam nudi vpogled v presnovne spremembe mišičnih vlaken. Številski podatki dobljeni s stereološko analizo tkiva niso koristni le pri proučevanju mišičnega tkiva, ampak lahko pomembno olajšajo odkrivanje bolezenskih sprememb tudi v drugih tkivih.

Zahvala

V prispevku je prikazan del izsledkov doktorske študije, ki je potekala pod mentorstvom znanst. svet. dr. Ide Eržen in izr. prof. dr. Sama Ribariča ter v sodelovanju z dr. Lucie Kubínovo iz Prage (Oddelek za matematiko, Inštitut za fiziologijo, Češka akademija znanosti). Vsem trem se za pomoč in nasvete med nastajanjem naloge iskreno zahvaljujem. Za izdatno tehnično pomoč pri izdelavi preparatov sem hvaležna Majdi Črnak-Massarani.

Literatura

1. Čebašek V, Kubínová L, Ribarič S, Eržen I. A novel staining method for quantification and 3D visualisation of capillaries and muscle fibres. *Eur J Histochem* **2004**; 48, 151-158.
2. Čebašek V, Eržen I, Vyhnaal A, Janáček J, Ribarič S, Kubínová L. The estimation error of skeletal muscle capillary supply is significantly reduced by 3D method. *Microvascular Res* **2010**; 79, 40-46.
3. Kubínová L, Janáček J, Ribarič S, Čebašek V, Eržen I. Three-dimensional study of the capillary supply of skeletal muscle fibres using confocal microscopy. *J Musc Res Cell Motil* **2001**; 22, 217-227.
4. Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler h, Weibel ER. Estimating length density and quantifying anisotropy in skeletal muscle capillaries. *J Microsc* **1983**; 131; 131-146.
5. Pette D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* **2001**; 90, 1119-1124.
6. Poole Dc, Mathieu Costello. Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and plantaris muscles. *Microcirculation* **1996**; 3: 175-186.

7. Punkt K, Unger A, Welt K, Hilbig H, Schaffranietz L. Hypoxia-dependent changes of enzyme activities in different fibre types of rat soleus and extensor digitorum longus muscles. A cytophotometrical study. *Acta Histochem (Jena)* **1996**; 98, 255-269.
8. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* **1966**; 30, 23-38.

