

УДК 616.681-002-089.4:616.381-007.271:576.31
DOI: 10.24061/1727-0847.16.3.2017.77

Д.П. Замятин, В.П. Невзоров*, О.Ф. Невзорова*

Харьковский национальный медицинский университет;

**ГУ “Институт общей и неотложной хирургии имени В.Т. Зайцева НАМН Украины”, г. Харьков*

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ КОНТУЗИИ СЕРДЦА

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ КАРДІОМІОЦИТІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ МОДЕЛЮВАННІ КОНТУЗІЇ СЕРЦЯ

Резюме. В статье рассмотрены вопросы экспериментального моделирования закрытой травмы сердца. Определены ультраструктурные и морфо-функциональные нарушения клеток миокарда, соответствующие контузионным повреждениям сердца. Выявлено, что характерные нарушения в кардиомиоцитах обусловлены изменением миофибрилл и митохондрий и представлены, в частности, субсегментарными контрактурами, появлением полос сокращения и очаговым уплотнением миофибрилл.

Ключевые слова: контузионные повреждения сердца, модельный эксперимент, ультраструктурные и морфо-функциональные нарушения в кардиомиоцитах.

В настоящее время моделирование в клинической и экспериментальной хирургии стало одним из главных методов научного исследования, позволяющим ускорить понимание узловых вопросов патогенеза экстремальных состояний, в частности, травмато- и механогенеза, морфо-функциональных нарушений, происходящих при контузии сердца, а также наметить и обосновать пути их диагностики, профилактики и лечения [1-3]. Предложенная экспериментальная модель с воспроизведением контузионных повреждений сердца у лабораторных животных позволила проследить морфофункциональные и ультраструктурные изменения в кардиомиоцитах, подобные происходящим у пострадавших с контузией сердца [4, 5].

Цель исследования: исследовать морфо-функциональные и ультраструктурные изменения тканей сердца, которые возникают при моделировании контузионных повреждений сердца.

Материал и методы. Для реализации способа экспериментального моделирования нами применено в серии экспериментов на лабораторных животных, разработанное сотрудниками кафедры хирургии № 1 ХНМУ универсальное устройство для воспроизведения травматических повреждений [6], с помощью которого наносились повреждения сердца определенной степени тяжести в различные участки грудной клетки заранее наркотизированным крысам при разных

положениях ударника: положение 1 ударного устройства предусматривало нанесение травмы средней степени тяжести (не смертельной); положение 2 – вызывало более тяжелые травмы тяжелой и крайней степени тяжести (смертельной).

Содержание, уход и методы экспериментальной работы с животными соответствовали общепринятым нормам и правилам, предусмотренным “Европейской конвенцией по надзору и защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях” (Страсбург, 1986), Директивой Совета Европейского Содружества от 24.11.86 г., Хельсинской декларацией, Женевской конвенцией “International Guiding principles for Biochemical research in volvin ganimals”, 1990 г., распоряжением МЗ Украины № 32 от 22.02.88 г. и “Законом України про захист тварин від жорстокого поводження” №1759 от 15.12.2009 г. [6-10].

В зависимости от степени тяжести травматических повреждений сердца и сроков выведения из эксперимента животные были распределены на 5 подгрупп:

1 – контрольная – состояла из 10 здоровых интактных животных, у которых травму сердца не воспроизводили;

2 – крысы (10 особей) с воспроизведением травмы сердца средней степени тяжести (первое положение дозатора ударного устройства) и

© Замятин Д.П., Невзоров В.П., Невзорова О.Ф., 2017

этаназией через 10 минут (условное соответствие эректильной фазе травматического шока) – не смертельная травма сердца с поверхностными кровоизлияниями;

3 – крысы (10 особей) с воспроизведением травмы сердца средней степени тяжести (первое положение дозатора ударного устройства) и этаназией через 120 минут (условное соответствие торпидной фазе травматического шока) – несмертельная травма сердца с интрамуральными диффузными кровоизлияниями;

4 – крысы (10 особей) с воспроизведением травмы сердца тяжелой степени (второе положение дозатора ударника) и выведением из опыта через 10 минут – смертельная травма сердца с проникающим и кровоизлияниями эпикарда и миокарда;

5 – крысы (10 особей) с воспроизведением травмы сердца тяжелой степени (второе положение дозатора ударника) и выведением из опыта через 120 минут – смертельная травма сердца с проникающим и кровоизлияниями и разрывами миокарда.

Забор материала для морфогистологической характеристики травматического контузионного повреждения миокарда производили в условиях наркоза после этаназии животных [11]. С целью анализа возникающих гистопатоморфологических изменений миокарда и оценки состояния аппарата кардиомиоцитов в подгруппах экспериментальных животных смоделированной контузией сердца нами выполнено исследование образцов миокарда при помощи световой, поляризационной микроскопии и фотохимического флюорохромирования. На срезах сердца с помощью системы анализа изображений определяли морфометрический показатель – объемную плотность фуксинофильных кардиомиоцитов [12, 13].

Для светового микроскопического исследования фрагменты миокарда фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов при $T=20^{\circ}\text{C}$, после чего обезвоживали этиловым спиртом и заливали в парафин. Из парафиновых блоков готовили срезы, которые окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином. Участки ткани миокарда подвергали замораживанию в жидком азоте с целью приготовления препаратов для последующего морфогистохимического электронно-микроскопического исследования миокарда. В качестве флуоресцирующего красителя использовали кальцеин в соответствии с рекомендациями J. Jacobetal. (2003) и L. Mullins (1987).

Исследования по люминесцентной микроскопии выполнены на базе диагностической лабора-

тории молекулярных и клеточных технологий с иммуноферментным и иммунофлюоресцентным анализом ГУ “ИОНХ им. В.Т. Зайцева НАМН Украины” с помощью современного микроскопа Olympus BX-i53 (Япония) и программного обеспечения.

Для изучения морфо-функциональных и ультраструктурных изменений при электронной микроскопии ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМТП-6 “ЛОМО”, монтировали на электролитические сеточки и, после контрастирования цитратом свинца, исследовали под электронным микроскопом ЭМБ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Все данные обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента. Для выбора наиболее информативных показателей использован корреляционный, системный многофакторный и регрессивный анализ [14-17].

Результаты исследования и их обсуждение. На начальном этапе эксперимента при микроскопическом исследовании срезов препаратов миокарда животных контрольной подгруппы 1, окрашенных гематоксилином и эозином, кардиомиоциты на продольных и поперечных срезах выглядели контурированными. Строма представлена волокнистыми рыхлыми структурами с контурируемыми темными ядрами. Крупные интрамуральные артерии имели неравномерное кровенаполнение: вены были умеренно полнокровные, а мелкие сосуды кровь не содержали.

При оценке препаратов миокарда у экспериментальных животных исследуемых групп при световой микроскопии наблюдалась дистрофия кардиомиоцитов; мышечные клетки окрашивались эозином неравномерно, поперечной исчерченности во многих из них не было видно. Ядра имели неправильную форму, располагались как в центре кардиомиоцитов, так и на периферии. Отмечался периваскулярный и интерстициальный отек клеток миокарда. Были выявлены гистопатоморфологические изменения, которые были представлены однотипной реакцией сосудов на ударное травматическое воздействие в виде выраженных гемодинамических нарушений, за счет дистонии сосудов артериального русла и застойного полнокровия вен, а также изменений кровообращения в системе микроциркуляторного русла, в которых отмечались агрегация эритроцитов в просвете мелких капилляров по типу “мо-нетных столбиков” (рис. 1).

У крыс с тяжелой контузией сердца (подгруппы 4 и 5), в большинстве случаев, в интраму-

ральных и субэпикардиальных слоях миокарда были обнаружены кровоизлияния, состоящие из эритроцитов эозинофильной окраски, имеющими четкие контуры. Кровоизлияния были представлены очаговыми скоплениями эритроцитов с элементами разрыхления или даже разделения мышечных волокон с формированием небольших лакун заполненных кровью (рис. 2).

Артерии в исследованных случаях имели неизменную структуру стенки сосудов, отмечались явления неравномерно выраженного кровенаполнения и дистонического состояния, реже отмечался спазм сосудов. Вены, преимущественно интрамуральной локализации, были неравномерно расширены, их просветы заполнены конгломератами эритроцитов с различимыми контурами (рис. 3).

Таким образом, при световой микроскопии препаратов наблюдалось неравномерное окрашивание мышечных волокон в полях зрения среза

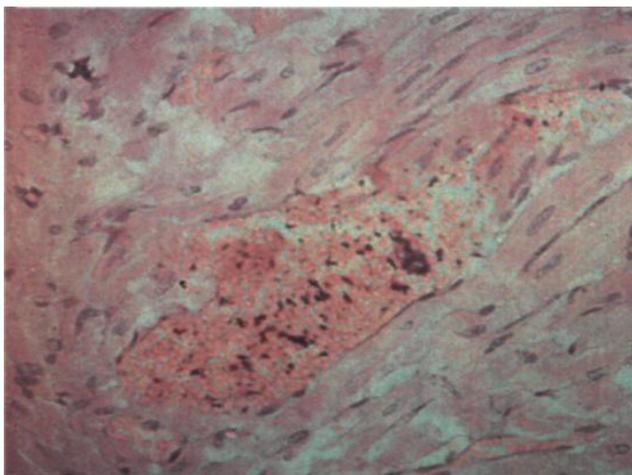


Рис. 1. Выраженное полнокровие сосудов миокарда. Отек стромы. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 700

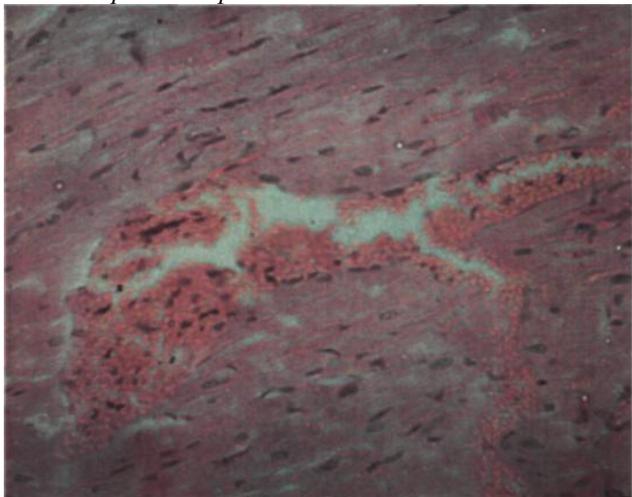


Рис. 2. Очаговые кровоизлияния в строму миокарда. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 700

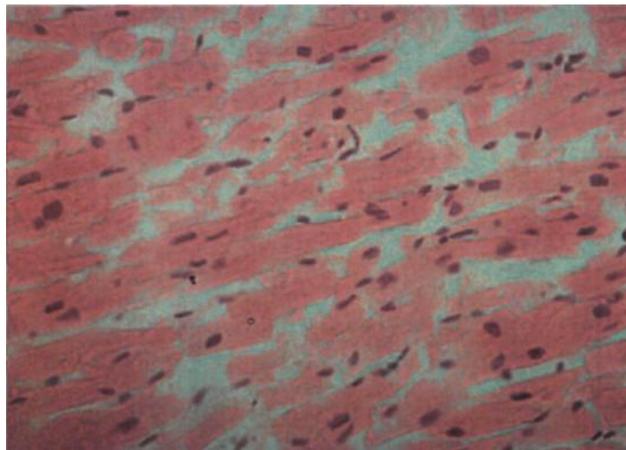


Рис. 3. Фрагментация кардиомиоцитов. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 700

препарата, где отдельные мышечные волокна выглядели более интенсивно окрашенными – оксифильными, другие мышечные волокна слабо воспринимали эозин. Были отмечены случаи неравномерной окраски не всего кардиомиоцита, а только в его части. Мышечные волокна с выраженной эозинофилией в этих случаях выглядели набухшими и гомогенизированными. Характерная поперечная исчерченность сегментов определялась слабо либо не определялась вообще.

В срезах, где были выявлены кровоизлияния интрамуральной локализации, в миокарде встречались отдельные крупные пучки сердечных мышечных волокон, имевшие извитой вид, а также волнообразный или пилообразный ход волокон. Чаще всего эти изменения захватывали целые группы кардиомиоцитов, реже – отдельные пучки.

Далее, при последующем исследовании препаратов миокарда с помощью люминесцентной микроскопии, оценивали состояние сократительного аппарата кардиомиоцитов. В большинстве наблюдений была обнаружена выраженная фрагментация отдельных групп мышечных волокон, при этом степень ее выраженности была различной от имеющих вид поперечных трещин кардиомиоцитов до полного разделения групп мышечных волокон, с признаками пересокращения и расслабления кардиомиоцитов.

Субсегментарные контрактуры в виде повреждений отдельных или небольших групп кардиомиоцитов были выявлены по всему миокарду, располагались диффузно и чаще были представлены как повреждения отдельных мышечных волокон небольших групп кардиомиоцитов (рис. 4).

Мышечные волокна, прилежащие непосредственно к области кровоизлияния, чаще находились в расслабленном состоянии, а на удалении

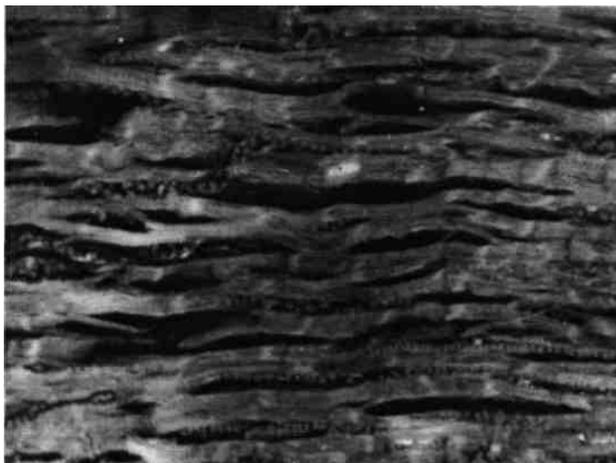


Рис. 4. Нарушение микроциркуляции, выстраивание эритроцитов по типу "поездов". Люминесцентная микроскопия. Ув. 700

были повышено сокращенными. Почти во всех мышечных волокнах, находящихся на границе с участками кровоизлияний, выявлялись субсегментарные контрактуры, которые, как правило, превышали по ширине те субсегментарные контрактуры, которые выявлялись в интактных участках миокарда. Следовательно, наибольшее количество полос сокращения обнаружено в участках миокарда, прилежащих к очагам кровоизлияний или лежащих вблизи от них.

В участках нефрагментированных мышечных волокон были обнаружены единичные тонкие поперечные трещины кардиомиоцитов, имеющие прямой ход. Больше всего таких трещин было отмечено в расслабленных мышечных волокнах. Глубина трещин варьировала от поверхностных (по типу надрывов), до глубоких, проникающих во внутренние слои кардиомиоцитов.

Таким образом, в результате проведенного исследования с помощью световой микроскопии было установлено, что моделирование повреждений сердца, сопровождающихся его контузией, в модельном эксперименте выполнено адекватно, что было подтверждено выявленными характерными морфологическими изменениями миокарда в виде мелкоочаговых кровоизлияний и расстройств гемоциркуляции.

При воспроизведении травм сердца различной силы у лабораторных животных исследован характер морфометрического показателя контузии сердца кардиомиоцитов – объемной плотности фуксинофильных кардиомиоцитов. Показатели объемной плотности фуксинофильных кардиомиоцитов, как морфометрического показателя контузии сердца, представлены в таблице.

Таким образом, по данным исследований с использованием люминесцентной микроскопии

Таблица
Характер морфометрического показателя контузии сердца кардиомиоцитов (объемной плотности фуксинофильных кардиомиоцитов) при воспроизведении травм различной силы

Подгруппы	Объемная плотность фуксинофильных кардиомиоцитов, %
Подгруппа 1 (контроль)	6,8±0,5
Подгруппа 2	18,6±2,4*
Подгруппа 3	35,7±2,1*
Подгруппа 4	41,5±1,8*
Подгруппа 5	52,8±2,2*

* Статистически достоверные различия ($p < 0,05$) по Манн-Уитни

были выявлены острые повреждения кардиомиоцитов в виде: фрагментации отдельных мышечных волокон и поперечных трещин, полос диссоциации, волнообразной деформации, субсегментарных контрактур, представляющих собой участки повышенного сокращения отдельных саркомеров, расположенных диффузно как в очагах повреждения, так и на удалении от них, т.е. на всем протяжении миокарда. Наибольшее повреждение кардиомиоцитов было выявлено в подгруппе 5.

Поскольку индикатором функциональной активности митохондрий является митохондриальный потенциал, определяемый как разность потенциалов между матриксом митохондрий и внутриклеточной средой, для решения поставленной задачи нами проведено исследование мембранного потенциала митохондрий в миокарде обоих желудочков с помощью гистохимической методики.

Как следует из полученных результатов, в контрольной группе лабораторных животных средняя интенсивность флуоресценции ткани миокарда при определении мембранного потенциала митохондрий была одинаково выражена в левом желудочке (ЛЖ) и правом желудочке (ПЖ) и составила 90,34 усл. ед.

Анализ интенсивности флуоресценции при определении мембранного потенциала митохондрий в группе с экспериментальной контузией сердца позволил определить достоверное снижение этого показателя как в левом, так и в правом желудочке.

В ЛЖ интенсивность флуоресценции составила 75,34 усл. ед., а в ПЖ 78,24 усл. ед., что свидетельствует об уменьшении разности потенциалов между матриксом митохондрий и внутриклеточной средой.

При проведении сравнения полученных результатов с результатами контрольной группы животных нами было установлено, что при контузии сердца интенсивность флуоресценции ткани миокарда ЛЖ при исследовании мембранного потенциала митохондрий достоверно снижалась на 16,6 %, а ПЖ – 13,4 %.

Таким образом, проведенное нами гистохимическое исследование миокарда, при контузии сердца, позволило получить данные о морфофункциональных изменениях органелл кардиомиоцитов – митохондрий.

Гистоморфометрическая оценка интенсивности возникшей гисто-флуоресценции при исследовании мембранного потенциала митохондрий кардиомиоцитов обоих желудочков сердца свидетельствует о достоверном снижении этих показателей при повреждениях сердца, сопровождающихся его контузией.

Выявленное нами в процессе исследования, снижение мембранного потенциала митохондрий свидетельствовало о нарушении в них окислительно-восстановительных процессов, что приводило к снижению энергетического обеспечения кардиомиоцитов.

Ультраструктурные изменения кардиомиоцитов при экспериментальном моделировании контузии сердца были выявлены уже через несколько минут после травмы сердца. Они носили очаговый характер, но локализовались преимущественно в субэпикардальных и субэндокардиальных отделах миокарда левого желудочка.

В ряде мышечных клеток было отмечено лишь уплотнение миофибрилл без изменения длины саркомера, в других кардиомиоцитах были обнаружены признаки пересокращения миофибрилл с уменьшением длины (рис. 5).

В процессе исследования было установлено, что кроме разной выраженности изменений сократительного аппарата миокарда отмечена вариабельность изменений митохондрий.

Наряду с увеличенными в размерах митохондриями были отмечены мелкие митохондрии, матрикс которых был плотным, кристы хорошо визуализировались, были расположены ориентированно (рис. 6).

При оценке состояния микрососудов были выявлены гемодинамические расстройства. Клетки крови в таких спазмированных сосудах

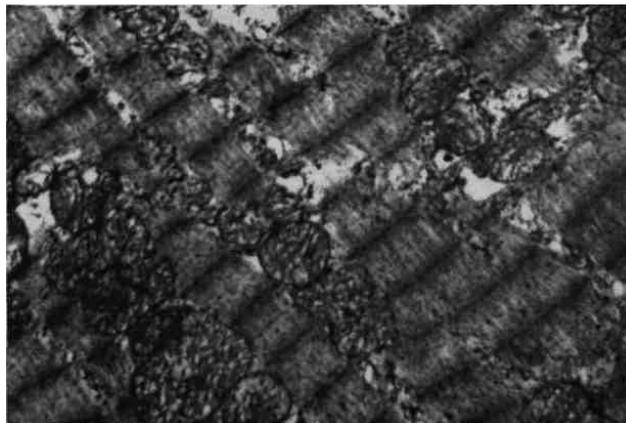


Рис. 5. Микрофото: очаговое уплотнение миофибрилл и появление полос сокращения. Ув. 6000

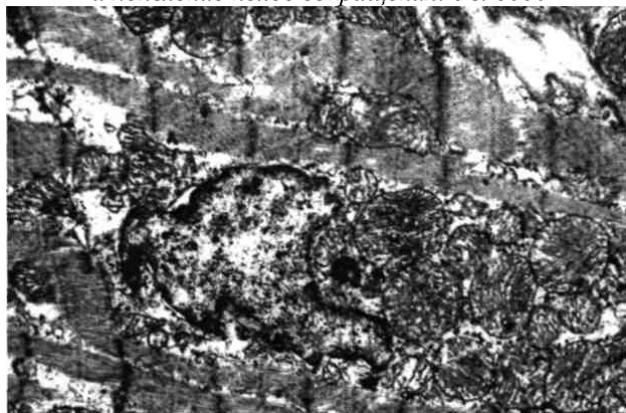


Рис. 6. Микрофото: асимметричная скученность митохондрий, матрикс которых уплотнен, вблизи деформированного ядра. Ув. 8000

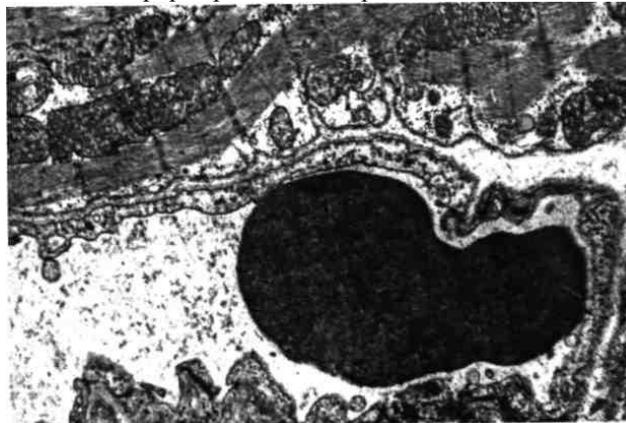


Рис. 7. Микрофото: перикапиллярные пространства расширены, отек эндотелия сосудов, в просвете капилляра деформированные форменные элементы. Ув. 7000

выглядели деформированными. Перикапиллярные пространства были неравномерно расширены (рис. 7).

Выводы. 1. Полученные нами в результате проведенного исследования данные позволили выявить характерные ультраструктурные и морфофункциональные изменения кардиомиоцитов, обусловленные изменением миофибрилл и

митохондрий. 2. Ультраструктурные изменения кардиомиоцитов при моделированном ушибе сердца были представлены субсегментарными контрактурами, появлением полос сокращения, очаговым уплотнением миофибрилл. 3. Ультраструктурные изменения митохондрий при экспериментальной контузии сердца представлены изменениями матрикса, который у большинства митохондрий просветлен, ориентация крист нарушена и количество их уменьшено, у части митохондрий, имеющих меньшие размеры, окружность просветлена, мембраны утолщены, матрикс

затемнен из-за плотно расположенных крист.

Перспектива дальнейших исследований.

Следует провести исследования относительно комплексности всех клеточных составляющих и ультраструктурной организации микроциркуляторного русла миокарда при контузии сердца. Вторым аспектом следует считать установление приоритетности нарушений биоэнергетических процессов, которые вызывали дистрофические изменения органелл и связаны с включением механизмов компенсации при повреждении сердца, сопровождающемся его контузией.

Список использованной литературы

1. Москаленко В.Ф. *Біоетика: філософсько-методологічні та соціально-медичні проблеми* / В.Ф. Москаленко, М.В. Попов. – Вінниця: Нова Книга, 2005. – 210 с.
2. Патент 6548 Україна, МПК 7 G09B23/28, A61B17/00. Пристрій для відтворювання політрави / П.М. Замятін, Г.І. Каплін, О.Л. Чернов. – Заявл. 27.09.04; Опубл. 16.05.05; Бюл. №5.
3. *Effects of cardiac contusion in isolated perfused rat hearts* / R. Meier, M. Van Griensven, H.C. Pape [et al.] // *Shock*. – 2003. – Vol. 19, № 2. – P. 123-126.
4. *Хірургія серцевих ушкоджень. Особливості сучасної доктрини* / В.В. Бойко, П.М. Замятін, І.В. Полівенок, О.В. Бучнева. – Х.: Промінь, 2015. – 156 с.
5. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
6. Бююль А. *SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей* / А. Бююль, П. Цефель. – пер. с нем. – СПб.: ДиаСофтЮП, 2005. – 608 с.
7. *Патоморфологические и рентгенологические параллели при экспериментальном моделировании закрытой травмы груди различной степени тяжести* / Е.П. Шармазанова, Е.В. Панченко, В.Н. Лыхман, Н.А. Ремнева // *Харківська хірург. школа*. – 2010. – № 5(43). – С. 56-59.
8. *Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETSN 123) Директива Совета 86/609/ЕЕСот 24.11.86 по согласованию законов, правил и административных распоряжений стран-участниц в отношении защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.* (Страсбург, 18 марта 1986 года). Режим доступа: <http://www.lawmix.ru/abro.php?id=l1036>.
9. *Roterman-Konieczna I. Elementy informatyki medycznej* / I. Roterman-Konieczna. – Krakow: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellonskiego, 2011. – 202 s.
10. *Анализ клинических данных в медицинских исследованиях на основе методов вычислительного интеллекта* / В.В. Бойко, Е.В. Бодянский, Е.А. Винокурова [и др.] – Х.: ТО Эксклюзив, 2008. – 120 с.
11. *Квантово-биологическая теория.* (Под общей ред. проф. В.В. Бойко и проф. М.А. Красноголовца). – Х.: Факт, 2003. – 968 с.
12. *Политравма. Поражение сердца* / А.Н. Нудьга, Е.И. Киношенко, Е.А. Ковалева, А.И. Сидоренко // *Медицина неотложных состояний*. – 2006. – № 6(7). – С. 32-39.
13. *Политравма. Руководство для врачей. Том 1.* (Под общ. ред. проф. В.В. Бойко и проф. П.Н. Замятина. В 4-х томах. – Харьков-Черновцы, Издательство БГМУ, 2009. – 340 с.
14. *Cardiocyte nucleus shape as an in indicator of heart graft aging* / J. Nozynsky, M. Zakliczynski, E. Zembala-Nozynska [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2007. – Vol. 39, № 9. – P. 2846-2849.
15. *Informatyka medyczna / pod red. R. Rudowskiego*. – Warszawa: Wydawnictwo naukowe PWN, 2012. – 250 s.
16. *Kozak K. Large Scale Data Handling in Biology.* / K. Kozak. – Ventus Publishing Aps, United Kingdom. – University of Essex, 2010. – 53 p.
17. *Roterman-Konieczna I. Statystyka narecepte. Wprowadzenie do statystyki medycznej* / I. Roterman-Konieczna. – Krakow: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellonskiego, 2010. – 262 s.

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ КАРДІОМІОЦИТІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ МОДЕЛЮВАННІ КОНТУЗІЇ СЕРЦЯ

Резюме. У статті розглянуто питання експериментального моделювання закритої травми серця. Визначені ультраструктурні та морфофункціональні порушення клітин міокарду, які відповідають контузійним ушкодженням серця. Доведено, що

характерні порушення у кардіоміоцитах через контузію серця зумовлені зміною міофібрил та митохондрий і представлені, зокрема, субсегментарними контрактурами, появою смуг скорочення й осередковим ущільненням міофібрил.

Ключові слова: контузійні ушкодження серця, модельний експеримент, ультраструктурні і морфофункціональні порушення у кардіоміоцитах.

**MORPHOFUNKCIONALE AND UL-
TRASTRUKTURE CHANGES OF CARDIO-
MYOCITES AT EXPERIMENTAL DESIGN OF
CONTUSION OF HEART**

Abstract. The questions of experimental design of the closed trauma of heart are considered in the article. Ultrastruktura and morphofunkcionale violations of cages of myocardium are certain, to the appropriate contusions damages of heart. In a conclusion underline, that characteristic violations in cardiomyocytes

are conditioned by the change of myofibrils and mitochondria presented, in particular, subsegmentarecijn traktura, appearance of stripes of reduction and nidal compression of myofibrils.

Key words: conclusion of damage of heart, model experiment, ultrastruktura and morphofunkcionale violations in cardiomyocytes.

Kharkiv National Medical University (Kharkiv)

Надійшла 15.03.2017 р.
Рецензент – проф. Федонюк Л.Я. (Тернопіль)