

УДК: 591.4- 61:57. 616.1- 618

## И.В. Заднипряный, О.С. Третьякова, Т.П. Сатаева МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС В ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ГЕМИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И ВОЗМОЖНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ КОРРЕКЦИИ

Крымский государственный медицинский университет им. С.П. Георгиевского,

**Заднипряный И.В., Третьякова О.С., Сатаева Т.П.** Морфологические особенности кардиомиоцитов крыс в период беременности в условиях хронической гемической гипоксии и возможные направления коррекции // Украинський морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 3. – С. 30-33.

Поступление азотсодержащих ксенобиотиков в организм во время беременности оказывает выраженное патогенное действие на сократительные кардиомиоциты беременных крыс, которое проявляется в виде ишемических и гипоксических повреждений сократительных кардиомиоцитов, с последующей их гибелью. Изменения сократительных кардиомиоцитов сопровождаются компенсаторными изменениями гемомикроциркуляторного русла, которые проявляются в усилении пиноцитозного транспорта и расширении просвета гемокapилляров. Применение препарата "Цитофлавин", продемонстрировавшего мембранопротекторные свойства, позволяет снизить степень повреждения кардиомиоцитов у беременных животных.

**Ключевые слова:** нитритная гипоксия, кардиомиоциты, беременность, крысы.

**Заднипряний І.В., Трет'якова О.С., Сатаєва Т.П.** Морфологічні особливості кардіоміоцитів щури в період вагітності в умовах хронічної гемічної гіпоксії та можливі напрямки корекції // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 3. – С. 30-33.

Надходження азотовмісних ксенобіотиків в організм під час вагітності має виражену патогенну дію на скорочувальні кардіоміоцити вагітних щурів, яке проявляється у вигляді ішемічних і гіпоксичних ушкоджень скорочувальних кардіоміоцитів, з подальшою їх загибеллю. Зміни скорочувальних кардіоміоцитів супроводжуються компенсаторними змінами гемомікроциркуляторного русла, які проявляються в посиленні піноцитозного транспорту та розширенні просвіту гемокapиллярів. Застосування препарату "цитофлавин", що продемонстрував мембранопротекторну властивість, дозволяє знизити ступінь пошкодження кардіоміоцитів у вагітних тварин.

**Ключові слова:** нитритна гіпоксія, кардіоміоцити, вагітність, щури.

**Zadnipyany I.V., Tretyakova O.S., Sataieva T.P.** Morphological features of pregnant rat cardiomyocytes in terms of chronic hemic hypoxia and its possible correction // Украинський морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 3. – С. 30-33.

Accumulation of nitrogen-containing xenobiotics in the body during pregnancy poses a marked pathogenic effect on contractile cardiomyocytes of pregnant rats, which manifests itself in the form of ischemic and hypoxic damage of contractile cardiomyocytes, followed by their death. Changes in contractile cardiomyocytes are accompanied by compensatory changes of hemomicrocirculatory vessels, which appear in the intensive pinocytosis and expansion of hemocapillary lumen. Application of the drug "Cytosflavin" revealed its membrane protective properties which can reduce the violations of cardiomyocytes in pregnant animals.

**Key words:** nitrite hypoxia, cardiomyocytes, pregnancy, rats.

Изучение влияния гипоксии на организм является одной из центральных проблем медицины, и ее влияние на здоровье человека постоянно возрастает, что обусловлено широким распространением азотсодержащих ксенобиотиков проявляющих выраженные гипоксические свойства [10]. В последнее время большое внимание уделяется изучению механизмов токсического воздействия, а также исследованию компенсаторно-адаптационных реакций в ответ на поступление в организм азотсодержащих веществ [1, 3].

Экзогенными источниками азотсодержащих ксенобиотиков являются избыток удобрений, выброс промышленных предприятий, тепловых электростанций, выхлопы городского транспорта, а также бытовая химия и т.д. [1]. Вымывание азотных удобрений с полей в природные водоемы, попадание окислов азота в грунтовые воды с кислотными осадками является причиной повсеместного увеличения содержания нитратов в продуктах питания и питьевой воде крупных

городов и в сельской местности [1, 10]. Помимо этого большое количество этих веществ является активным компонентом многих фармакологических препаратов, обуславливая их побочные эффекты [1, 3]. Таким образом, общая нагрузка содержащими азот веществами, поступающими в организм человека в составе пищи, воды и вдыхаемого воздуха, может значительно превышать физиологические пределы.

Считается, что основное патогенетическое действие этих веществ связано с превращением части гемоглобина в метгемоглобин и образованием NO-комплексов с гемовыми структурами крови (гемоглобином) и тканей (миоглобином), дыхательными ферментами и ферментами антиоксидантной системы, а также регуляторными белками, активизирующими синтез вторичных клеточных мессенджеров и т.д. [11, 12]. В результате взаимодействия активных форм азота (АФА) с указанными биологическими молекулами и молекулярными комплексами, запускается цепная реакция биохимических преобразова-

ний, продукты которых (пероксинитрит, пероксинитритная кислота, перекисные соединения гемоглобина, активные формы кислорода - АФК и т.д.) обладают еще большей токсичностью и наряду с нитритным анионом активизируют процессы перекисного окисления липидов клеточных мембран, а также разрушение других клеточных структур [10, 13]. Несмотря на большое количество работ, посвященных гипоксии, влияние экзогенных нитритов на сократительные кардиомиоциты является малоизученным [4].

Учитывая то, что экзогенные нитриты при попадании в организм способствуют развитию гемической и гистотоксической гипоксии, особую актуальность приобретает изучение токсического воздействия нитритов на организм матери и плода [4].

Помимо этого, особый интерес представляет функционирование сердца во время беременности. Как известно, оно не только немного смещается из-за растущей матки, но и испытывает возросшую на 40% нагрузку. При этом на фоне общей недостаточности кислорода при гемической (анемической) гипоксии в организме, которая сама по себе ведет к повышению нагрузки на систему кровообращения, может развиваться сердечная недостаточность [3, 8].

Сложный механизм развития гипоксии в организме, который сопровождается развитием каскада патологических биохимических процессов, объясняет трудности в подборе препаратов, способных обеспечить антигипоксическую защиту клеток организма. Антигипоксанты и антиоксиданты являются энергокорректорами метаболизма, которые выполняют задачи коррекции функций дыхательной цепи и других метаболических процессов, поставляющих энергетические субстраты. В связи с этим, особый интерес представляет препарат «Цитофлавин», который обладает свойствами метаболического энергокорректора, а также дополнительно обладает антигипоксической и антиоксидантной активностью. Лечебная эффективность препарата обусловлена взаимодополняющим действием янтарной кислоты, рибоксина, рибофлавина и никотинамида [2, 5].

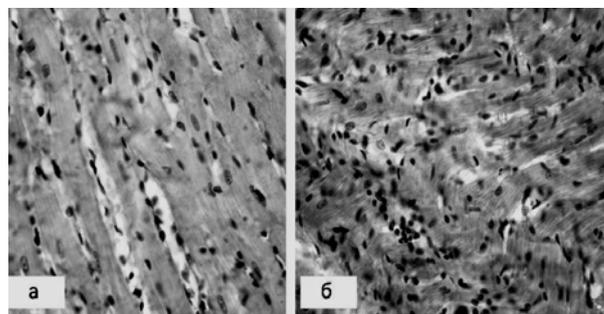
В связи с вышеизложенным, целью проведения исследования явилось изучение морфологических особенностей сократительных кардиомиоцитов беременных крыс в процессе развития гипоксии, индуцированной нитритом натрия  $\text{NaNO}_2$ , с последующей коррекцией нарушений.

**Материал и методы исследования.** Экспериментальная часть выполнена на 22 самках трехмесячных белых крыс линии Wistar массой 180-200 г в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные были разделены на 2 группы по 11 в каждой [6]. Для индукции беременности каждой самке подсаживались половозрелые беспородные крысы-самцы из расчета два самца на четыре самки. На протяжении всей

беременности самкам I и II группы ежедневно внутривентриально вводили нитрит натрия  $\text{NaNO}_2$  в дозе 5 мг/100 г массы (доза, вызывающая гипоксию средней тяжести) [9]. Самкам второй группы после введения нитрита натрия в той же дозе, что и животным I группы, вводили цитофлавин из расчета 0,5 мл/100 г массы тела животного. На 21-е сутки беременности после проведения торако- и перикардотомии под эфирным наркозом сердце извлекалось сразу же помещалось в кардиоплегический раствор (0,9% KCl при температуре 0°C), чем достигалась остановка сердца в диастолу. Разрез сердца для забора материала из левого желудочка проводился с учетом расположения магистральных путей проводящей системы. Проводилась окраска срезов миокарда ГОФП-методом (гематоксилин-основной фуксин-пикриновая кислота) с целью выявления очагов ишемического повреждения [7].

Подготовка материала для ультрамикроскопического исследования проводилась по стандартной методике [7]. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме УМТП-4 (Украина), красили толуидиновым синим, контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом. Для определения проницаемости клеточных мембран применялась методика контрастирования гидроксидом лантана по Овертону [7].

**Результаты и их обсуждение.** При изучении срезов миокарда, окрашенных по ГОФП-методу, в кардиомиоцитах беременных крыс первой опытной группы после введения нитрита натрия отмечались признаки интерстициального отека, а также ишемического повреждения, которые проявлялись наличием диффузно расположенного фуксинофильного субстрата в цитоплазме. Однако во второй опытной группе, в которой применялась медикаментозная коррекция, фуксинофилия была менее выражена, а также практически не встречались контрактурные повреждения сократительных кардиомиоцитов, что свидетельствовало об антигипоксических свойствах применяемого препарата (рис.1).



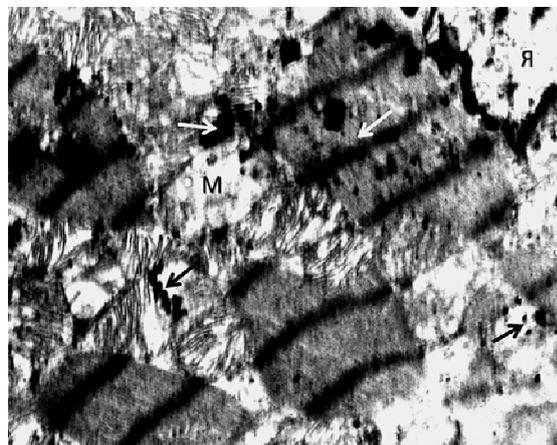
**Рис. 1.** Умеренное (а) и большое количество (б) диффузно расположенных мелких очагов умеренно выраженной фуксинофилии цитоплазмы кардиомиоцитов, окрашенных в красный цвет на желто-зелёном фоне. Окраска: ГОФП-метод. Ув. x 400.

По данным электронной микроскопии в кардиомиоцитах группы животных без коррекции отмечались как ишемические, так и гипоксические повреждения. В сократительных кардиомиоцитах наблюдалось снижение количества гранул гликогена, конденсация хроматина на ядерной мембране и значительное просветление нуклеоля, очаговый и тотальный лизис митохондриальных крист, появление остроконечных инвагинатов кардиолеммы, что является патогномичным признаком развития внутриклеточного отека [4]. Расширение цистерн саркоплазматической сети, литические повреждения митохондрий явились следствием необратимых нарушений проницаемости сарколеммы, что подтверждалось проникновением частиц коллоидного лантана через сарколемму во внутримитохондриальное пространство (рис. 2). В большинстве сократительных кардиомиоцитов наблюдалось уменьшение электронной плотности миофибрилл, выявлялись ригорные комплексы и отложение ионов  $Ca^{2+}$  в миофибриллах, что является патогномичным признаком избыточного поступления ионов  $Ca^{2+}$  в саркоплазму через патологически расширенные мембранные каналы [4]. Как известно, нерегулируемое поступление ионов  $Ca^{2+}$  не только затрудняет расслабление миофибрилл, но и разобщает процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях, активизирует лизосомальные кальций-зависимые протеазы и липазы. В дальнейшем это приводит к нарушению диастолического расслабления желудочков (ишемическая контрактура).

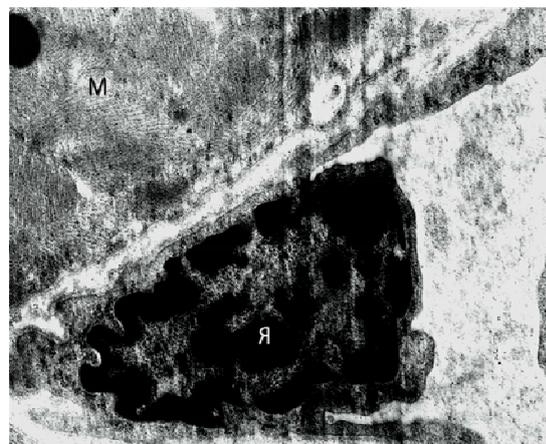
В поврежденных кардиомиоцитах отмечалось некоторое разрыхление сарколеммы и появление под ней фибробластов, активно синтезирующих коллагеновые волокна. Между соседними кардиомиоцитами наблюдалось некоторое расширение адгезивных фасций. Кроме этого, выраженные ишемические повреждения наблюдались в эндотелиоцитах гемомикроциркуляторного русла, которые проявлялись в виде признаков внутриклеточного отека, очагового лизиса крист митохондрий, а также увеличения количества пиноцитозных пузырьков различного типа. Внутри расширенных гемокapилляров наблюдались явления стаза и сладжа, а также запустевания вследствие сдавления части капилляров из-за возникшего клеточного отека. Перикапиллярное пространство было резко расширено и содержало белковые массы, появление которых, вероятно, обусловлено нарушением целостности клеточных мембран.

По данным электронной микроскопии кардиомиоциты крыс второй опытной группы (с применением корректора) имели повреждения преимущественно обратимого характера. Эти изменения заключались в неравномерном распределении нуклеарного хроматина, очаговом лизисе митохондриальных крист, при этом большинство митохондрий сохраняли свою нормальную структуру (рис.3). Некоторые со-

кратительные кардиомиоциты имели сниженное количество миофибрилл и большое количество гетерогенных митохондрий, что является свидетельством компенсаторных процессов. Проникновение коллоидного лантана внутрь сарколеммы отмечалось лишь в единичных кардиомиоцитах, что демонстрирует мембранопротекторный эффект исследуемого препарата [2]. Количество коллагеновых волокон в интерстиции по сравнению с первой группой было незначительным. Изменения в сосудах гемомикроциркуляторного русла носили мозаичный характер. Высокая пиноцитозная активность в одних капиллярах сопровождалась низкой активностью в других. Кардиолемма большинства эндотелиоцитов имела фестончатые края, что свидетельствует об умеренно выраженном внутриклеточном отеке. Большинство капилляров были полнокровными, что отражает компенсаторные процессы (рис. 3).



**Рис. 2.** Ультраструктура кардиомиоцита крысы без применения корректоров. Лизис митохондриальных крист (М), остроконечные инвагинаты кардиолеммы (Я), частицы лантана во внутреннем митохондриальном пространстве и кальциевые отложения в миофибриллах (стрелки). ТЭМ. Ув. x 20000.



**Рис. 3.** Ультраструктура миокарда крысы (II группа, срок беременности - 21 день). Сохранение нормальной структуры митохондрий кардиомиоцита (М), фестончатость кардиолеммы эндотелиоцита (Я), наличие пиноцитозных пузырьков разного типа. ТЭМ. Ув. x 18000.

Таким образом, исследуемый препарат, содержащий естественные метаболиты кардиомиоцитов, обладает выраженным мембранопротекторным эффектом, который доказывает отсутствие гранул лантана в цитоплазме и митохондриях большинства кардиомиоцитов исследуемых животных второй группы.

#### Выводы:

1. Поступление азотсодержащих ксенобиотиков в организм во время беременности оказывает выраженное патогенное действие на сократительные кардиомиоциты беременных крыс, которое проявляется в виде ишемических и гипоксических повреждений сократительных кардиомиоцитов, с последующей их гибелью.

2. Основные морфологические признаки нитритного повреждения сократительных кардиомиоцитов беременных крыс представлены диффузно расположенными мелкими очагами умеренно выраженной фуксинофилии цитоплазмы кардиомиоцитов, выявляемой при окраске по ГОФП-методу. По данным электронной микроскопии в кардиомиоцитах наблюдается снижение количества гранул гликогена, конденсация хроматина на кариолемме, очаговый и тотальный лизис митохондриальных крист, появление остроконечных инвагинатов кариолеммы, фрагментация миофибрилл. Необратимое повреждение клеточных мембран при нитритной гипоксии подтверждается наличием частиц коллоидного лантана внутри клетки.

3. Изменения сократительных кардиомиоцитов сопровождаются компенсаторными изменениями гемомикроциркуляторного русла, которые проявляются в усилении пиноцитозного транспорта и расширении просвета гемокapилляров.

4. Применение препарата "Цитофлавина", продемонстрировавшего мембранопротекторные свойства, позволяет снизить степень повреждения кардиомиоцитов у беременных животных.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ажиша Я.И. Экологические и медикобиологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами / Я.И. Ажиша, В.П. Реутов, А.П. Каюшин // Физиология человека. - 1990. - Т. 16. - № 3. - С. 131-150.
2. Афанасьев В.В. Цитофлавин в интенсивной терапии / В.В. Афанасьев // Пособие для врачей. - СПб, 2005. - 36 с.
3. Дмитров Д.Я. Анемия беременных / Д.Я. Дмитров // София: Медицина.- 1998.- 198с.
4. Заднипряный И.В., Сатаева Т.П. Морфофункциональные изменения при перинатальной гипоксии и возможные пути их коррекции / И.В. Заднипряный, Т.П. Сатаева // Таврический медико-биологический вестник. - 2013. - Т.16, №1, Ч.2 (61). - С. 252-257.
5. Ливанов Г.А. Использование метаболического антиоксиданта Цитофлавина в коррекции гипоксии и её последствий при тяжёлых формах отравлений нейротропными ядами / Г.А. Ливанов // Вестник интенсивной терапии. - 2009. - № 1. С. 60-63.

6. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Основные принципы // Ланималогия. — 1993. - № 1. - С. 29.

7. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника / А.Г. Сапожников, А.Е. Доросевич // Руководство. - Смоленск: САУ, 2000. - С.152-153.

8. Серов В.Н., Оржоникидзе Н.В. Анемия-акушерские и перинатальные аспекты / В.Н. Серов, Н.В. Оржоникидзе // РМЖ - 2004; 12: 1.

9. Черкесова Д.У., Омаров М.-С.А. Экспериментальная модель внутриутробной нитритной гипоксии / Д.У. Черкесова, М.-С.А. Омаров // Бюллетень. «Медицина. Научная практика». ДНЦРАМН. — 1995. — №1. — С. 44-46.

10. Шумилова Т.Е. Физиологические аспекты адаптации к гипоксическим состояниям организма / Т.Е. Шумилова, В.И. Шерешков, И.Н. Январева // Экология человека.-2004. - Т.2. - С. 269-272.

11. Evolutionary determined adaptation to hypoxia and human health / I.N. Yanvareva, T.I. Baranova, R.I. Kovalenko et al. // VIII World Congress Int Society for Adaptive Medicine - June 21-24, Moscow- Russia - 2006. - P. 17.

11. Functional Modification of Cytochrome C by Peroxynitrite in an Electron Transfer Reaction / D. Nakagawa, Y. Ohshima, M. Takusagawa et al // Chem. Pharm. Bull. - 2001. - V. 12. - № 12. - P. 1547-1554.

12. Nitric Oxide Inhibits Mitochondrial NADH: UbiquinonReductase Activity through Peroxynitrite Formation / N.A. Riobo, E. Clementi, M. Melani et al. // Biochem. J. - 2001. - V. 359. - P. 139-145.

Надійшла 14.03.2014 р.

Рецензент: проф. С.М. Федченко