

МОРФОЛОГІЯ

© Каминский Р. Ф.

УДК 611. 127-018:[616-099:546. 49]-092. 9

Каминский Р. Ф.

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ІЗМЕНЕННЯ КАРДІОМОЦІТОВ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РТУТНОЙ ЭКСПОЗИЦІЇ

Національний медичинський університет імені А. А. Богомольца (г. Київ)

Робота являється фрагментом НІР «Вплив вроздженого та набутого гіпотиреозу на стан центральної та периферійної нервової системи щурів та можливість його фармакологічної корекції, № гос. регистрації 0109U001804.

Вступлення. Общее состояние здоровья человека и состояние сердечно-сосудистой системы, в частности, существенно зависит от воздействия на организм внешних факторов. Ртуть, ее неорганические и особенно органические соединения относятся к чрезвычайно токсическим веществам 1 класса опасности с остро направленным механизмом действия на организм, с выраженным нейротоксическим и кардиотоксическим действием [1-6, 8]. Несмотря на большое количество исследований, ряд вопросов, касающихся изучения воздействия ртути на сердечно-сосудистую систему, остаются не достаточно изученными.

Изучение особенностей и направленности изменений в кардиомиоцитах под действием малых доз ртути в кардиологическом и гистологическом аспектах будут способствовать раскрытию механизмов нарушений функционирования миокарда, что актуально в связи с необходимостью поиска новых схем профилактики токсического поражения сердца и кардиопротекции.

Целью работы было установить моррофункциональные изменения кардиомиоцитов крыс при хронической ртутной экспозиции.

Объект и методы исследования. Опыты проведены на 20 белых беспородных крысах-самцах массой 100-150 г. Содержание животных и эксперименты проводились в соответствии с положениями Закона Украины «О защите животных от жестокого обращения» (2006), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1985), что подтверждено Комиссией по биоэтике Национального медицинского университета имени А. А. Богомольца. Из эксперимента животные выводились под рауш-наркозом.

Исследованы 2 группы крыс: 1 группа – контрольные животные. 2 группа – животные, которым на протяжении 10 недель внутрибрюшинно вводили раствор хлорида ртути в дозе LD₅₀ – 0,01 мг на 100 г массы тела.

Для гистологического исследования сердце фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, обезвоживали и заливали в воск-парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, железным гематоксилином по Гейнденгайну, по Вейгерту, пикрофуксином по методу ван Гизон. Фотографирование

проводилось с помощью цифровой камерой C - 4040zoom на микроскопе Olympus BX51.

Гистохимическое изучение активности окисительно-восстановительных ферментов в миокарде проводилось на криостатных срезах свежезамороженной ткани сердца толщиной 10 мкм. Исследовалась активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по Нахласу и соавтор., цитоплазматической б-глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы – (ЛДГ) по Гесссу, Скарпели и Пирсу, а также НАД-Н-ДГ и НАДФ-Н-ДГ, – как показатель активности всей НАДФ-Н генерирующей системы дегидрогеназ – по Фарберу. Интенсивность гистохимической реакции определялась полу количественным методом в единицах активности (е. а.).

Для электронномикроскопического исследования фрагменты миокарда левого желудочка фиксировали в 2,5% растворе глютарового альдегида на какодилатном буфере с дофиксацией в 1% растворе OsO₄ и обрабатывали согласно общепринятой методике. Ультратонкие срезы исследовали под электронным микроскопом ПЭС-125К.

Морфометрические исследований проводили на полуавтоматическом устройстве обработки графических изображений с помощью программы «Органелла». В кардиомиоцитах определяли объемную и количественную плотности митохондрий, их среднюю площадь, среднее количество крист, суммарную и среднюю длину их мембран в одной митохондрии. Статистическая обработка проводилась методами вариационной статистики.

Результаты исследований и их обсуждение. После 10-ти недельного введения хлорида ртути структурные повреждения миокарда носят диффузный характер и охватывают все отделы правого и левого сердца. Четко видна гетерогенность патологических изменений кардиомиоцитов. Большая их часть имеет признаки неравномерного отека; повышенна эозинофилия миофибрилл, они часто разрыхлены или очагово пересокращены. В некоторых участках саркоплазмы обнаруживаются мелкие вакуоли. Изменения ядерного аппарата разнонаправлены: часть ядер неравномерно увеличена в размерах, гипохромная, другие – пикноморфные, гиперхромные (рис. 1 А).

На ультраструктурном уровне в цитоплазме кардиомиоцитов наблюдается околодерный и подсарколемальный отек. Пересокращенные миофибриллы чередуются с участками неупорядоченного расположения миофибрилл и миоцитолизу.

МОРФОЛОГІЯ

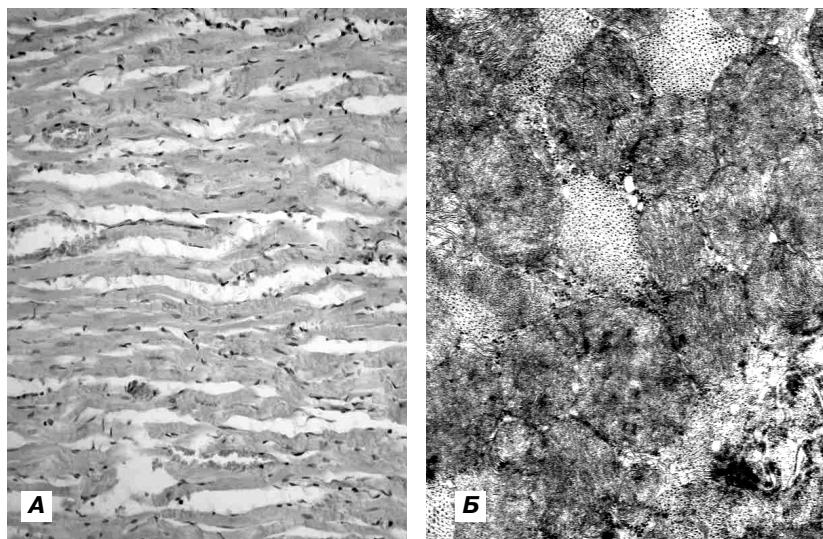


Рис. 1. Левий желудочек сердца крыс после хронической ртутной экспозиции. А – Отек интерстиция и кардиомиоцитов, очаговые контрактурные изменения. Окраска: гематоксилин и эозин.
Ув.: об., 20, ок. 16. Б – Митохондрии с электронно-плотным матриксом и незначительным числом крист. Электронно-микроскопическое фото.
Ув. 18000.

Таблица
Морфометрические показатели ($M \pm m$) митохондрий в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крыс после хронической ртутной экспозиции (ХРЭ)

Группы наблюдений	Объемная плотность МТ, %	Количественная плотность МТ, $10^{-2}/\text{мкм}^3$	Площадь МТ, 10^{-2} мкм^2
Контроль	$30,3 \pm 2,9$	$51,1 \pm 5,2$	$41,3 \pm 2$
ХРЭ	$14,6 \pm 3,03^*$	$22,9 \pm 5,5^*$	$48,6 \pm 3,4$

Примечание: * – достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

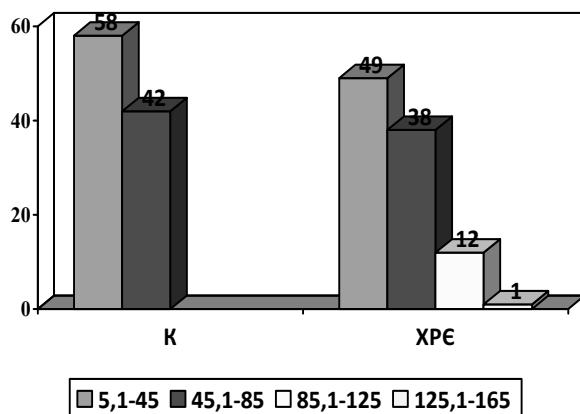


Рис. 2. Распределение митохондрий по площади в кардиомиоцитах левого желудочка сердца интактных крыс (К) и крыс после хронической ртутной экспозиции (ХРЭ). По оси абсцисс – площадь митохондрий (10^{-2} мкм^2) по оси ординат – количество митохондрий (%).

Митохондрии имеют электронно-уплотненный матрикс, в котором располагается незначительное количество крист, часть из которых фрагментирована (рис. 1 Б).

Морфометрический анализ показал, что средняя площадь среза этих органелл статистически не отличается от аналогичного показателя в контроле (табл.). Вместе с тем, анализ распределения митохондрий за этим показателем свидетельствует о значительных отличиях от контроля, вследствие наличия фракции крупных митохондрий (рис. 2).

Количественная и объемная плотности митохондрий достоверно отличаются от контрольных показателей. Снижение показателя объемной плотности митохондрий обусловлено уменьшением числа этих органелл в единице объема цитоплазмы кардиомиоцитов (табл.).

Значительно снижены, по сравнению с контролем, показатели, характеризующие кристы. После хронической экспозиции в 1 митохондрии содержится в среднем $6,1 \pm 1,2$ кристы, что почти в 4 раза меньше, чем в контроле ($26,9 \pm 1,1$). Суммарная длина крист равна $26,01 \pm 2,86$ мкм, а средняя длина одной кристы $6,58 \pm 0,36$ мкм, что достоверно отличает их от контрольных показателей, которые равны $48,6 \pm 3,6$ мкм и $18,8 \pm 0,2$ мкм, соответственно. Необходимо отметить, что увеличенные в размерах митохондрии имеют большее число длинных крист, в результате чего и большую их суммарную длину. Это подтверждается корреляционным анализом, который свидетельствует о выраженной положительной зависимости между площадью митохондрий и суммарной и средней длиной крист ($r = 0,947$ и $r = 0,961$ соответственно $> r_{01} = 0,765$) и значимую положительную зависимость между площадью митохондрий и числом крист ($r = 0,672 > r_{05} = 0,549$).

Таким образом, в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крыс после хронического воздействия ртути наблюдается гипертрофия части митохондрий на фоне снижения количества мелких форм.

Количественные изменения митохондрий находят свое отражение в снижении уровня энергетического обмена у животных. Активность СДГ в миокарде крыс после хронической ртутной экспозиции достоверно снижается до $2,1 \pm 0,02$ е. а., против $2,8 \pm 0,02$ е. а. в контроле. Темно-синие зерна диформазана, размеры которых колеблются от умеренных до мелкоглыбчастих, располагаются по ходу миофибрилл (рис. 3 А). Одновременно, статистически достоверно усиливается активность ЛДГ: $2,89 \pm 1,25$ е. а. против $2,15 \pm 0,02$ е. а. в контроле. ЛДГ размещена неравномерно, гранулы расположены по ходу миофибрилл. Подавляется активность НАД-н-ДГ: $2,15 \pm 0,04$ е. а., против $2,75 \pm 0,02$ е. а. в контроле, что

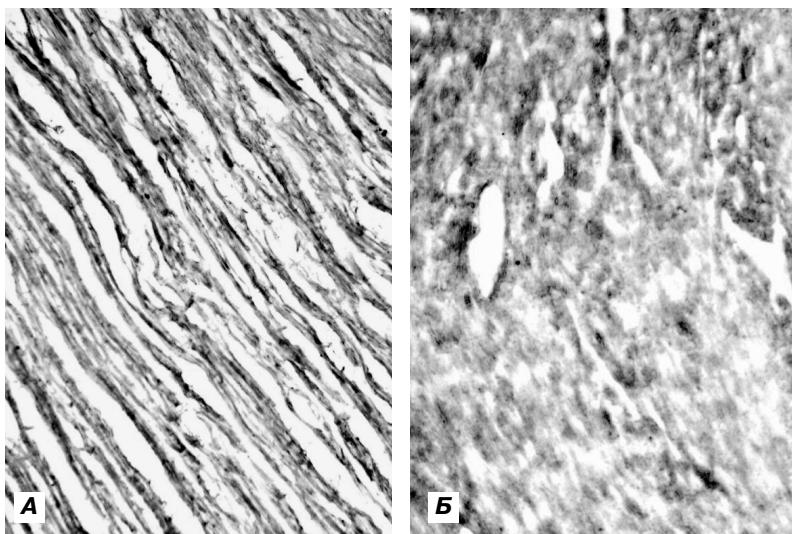


Рис. 3. Миокард левого желудочка сердца крысы после хронической ртутной экспозиции. А – Сниженная активность СДГ в кардиомиоцитах. Метод Нахласа и соавт. Ув.: об. 20, ок. 10.
Б – Сниженная активность НАД-Н ДГ в кардиомиоцитах. Метод Фарбера. Ув.: об. 40, ок. 10.

на гистологическом уровне проявляется мозаичным уменьшением количества зерен диформазана в саркоплазме кардиомиоцитов (**рис. 3 Б**).

Таким образом, при хроническом воздействии хлорида ртути наблюдается снижение активности НАД-Н-ДГ и СДГ при достоверном увеличении активности ЛДГ, что свидетельствует о нарушении метаболических процессов в кардиомиоцитах.

Анализ изменений в левом желудочке сердца крыс после длительного действия хлорида ртути показал, что кардиомиоциты испытывают существенные изменения. В этих клетках на первый план выступают нарушения сократительного (лизис и дезинтеграция миофибрилл, их пересокращение) и энергетического (изменения формы, размера, электронной плотности митохондрий, лизис их матрикса, внутренних и наружных мембран) аппаратов.

Отеч и деструкция митохондрий, снижение активности ферментов окислительного фосфорилирования в условиях продолжительного действия малых доз ртути связаны с нарушениями интактности клеточных мембран. Этому способствуют, с одной стороны, липотропные эффекты ртути – активация активности липаз, фосфолипаз и процессов ПОЛ, рост уровня и проявлений детергентного воздействия

на липиды мембран лизофосфатидов и жирных кислот [4, 7]. С другой стороны, изменения основных звеньев энергетического обмена – активация анаэробного гликолиза, снижение активности ферментов трикарбоновых цикла и дыхательной цепи – могут вызываться гипоксическим состоянием миокарда. Такие неспецифические изменения, безусловно, доминируют в патогенезе кардиотоксического действия тяжелых металлов. Однако нельзя исключать участия в этих процессах и специфических механизмов, определяющих их токсическое действие как тиоловых ядов. Среди них, безусловно, лидируют такие, как снижение активности ферментов энергетического обмена в результате блокады SH-групп, нарушение активного транспорта ионов за счет снижения энергетического

потенциала клетки и конкуренции ионов токсичных металлов из эссенциальными (прежде всего Ca^{2+}). Возможно также прямое мембранотоксическое действие на кардиомиоциты.

Вследствие выявленных нарушений развиваются необратимые изменения сердечной мышцы, которые могут быть непосредственной причиной сердечной недостаточности при хроническом действии металлов [2].

Выводы. После хронической экспозиции хлоридом ртути в сердце крыс происходит снижение эффективности процессов энергетического обеспечения функции кардиомиоцитов, активация механизмов внутриклеточного катаболизма, дискоординация контракtilного аппарата и нарушения объемно-пространственных соотношений митохондрий. Выявленные метаболические и структурные изменения кардиомиоцитов ведут к снижению их функциональной активности и являются основой для развития сердечной патологии.

Перспективы дальнейших исследований состоят в изучении влияния ртути на проводящую систему сердца.

Література

1. Дмитруха Н. Н. Исследование влияния тяжелых металлов на состояние сердечно-сосудистой системы у крыс по показателям ЭКГ, липидного обмена и неспецифической резистентности / Н. Н. Дмитруха, Т. К. Короленко, Л. М. Краснокутская // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2008. – №3 (230), приложение 2 (часть 1). – С. 123–124.
2. Трахтенберг И. М. Проблема кардиовазотоксического действия экзогенных химических веществ / И. М. Трахтенберг, В. А. Тычинин // Укр. кардиол. ж. – 2003. – №5. – С. 108-113.
3. Шамало С. Н. Лечение экспериментальной травмы седалищного нерва в условиях загрязненной окружающей среды / С. Н. Шамало, Ю. Б. Чайковский, Л. М. Сокуренко // I Российского конгресса с международным участием «Медицина для спорта – 2011». – Москва, 2011. – С. 513-517.
4. Girault L. Methyl mercury interactions with phospholipid membranes as reported by fluorescence, 31P and 199Hg NMR / L. Girault, A. Boudou, E. J. Drfouc // Biochim Biophys Acta. – 1997. – Vol. 26, №2. – P. 250-262.
5. Hong Y. S. Methylmercury exposure and health effects / Y. S. Hong, Y. M. Kim, K. E. Lee // J. Prev. Med. Public Health. – 2012. – Vol. 45, №6. – P. 353-363.

МОРФОЛОГІЯ

6. Houston M. C. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke / M. C. Houston // J. Clin. Hypertens (Greenwich). – 2011. – Vol. 13, №8. – P. 621-627.
7. Marchi B. Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on [Ca²⁺]i dependent phospholipase A2 activation / B. Marchi, B. Burlando, M. N. Moore // Aquat. Toxicol. – 2004. – Vol. 10, №2. – P. 197-204.
8. Nyland J. F. Low-dose inorganic mercury increases severity and frequency of chronic coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis in mice / J. F. Nyland, D. Fairweather, D. L. Shirley // Toxicol. Sci. – 2012. – Vol. 125, №1. – P. 134-143.

УДК 611. 127-018:[616-099:546. 49]-092. 9

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ КАРДІОМОЦІТІВ СЕРЦЯ ЩУРІВ ПРИ ХРОНІЧНОЇ РТУТНІЙ ЕКСПОЗИЦІЇ

Камінський Р. Ф.

Резюме. З метою вивчення особливостей і спрямованості змін в кардіоміоцитах під дією малих доз ртути за допомогою гістологічного, гістохімічного, електронно-мікроскопічного і морфометричного методів аналізу вивчений міокард серця контрольних щурів і щурів, яким протягом 10 тижнів внутрішньоочеревинно вводили розчин хлориду ртути в дозі 0,01 мг на 100 г маси тіла. Встановлено, що хронічна експозиція малими дозами ртути викликає неспецифічні якісні та кількісні зміни в кардіоміоцитах лівого шлуночка серця щурів. Найбільш чутливими до токсичної дії малих доз ртути є міофібрilli і мітохондрії. Зменшення кількісної та об'ємної щільнності мітохондрій, кількості та довжини крист в них корелують зі зниженням рівня активності ферментів дихання і термінального окиснення, а також посиленням гліколітичних процесів.

Ключові слова: кардіомоціти, щури, хронічна ртутна експозиція.

УДК 611. 127-018:[616-099:546. 49]-092. 9

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КАРДИОМОЦИТОВ СЕРДЦА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РТУТНОЙ ЭКСПОЗИЦИИ

Каминский Р. Ф.

Резюме. С целью изучения особенностей и направленности изменений в кардиомиоцитах под действием малых доз ртути с помощью гистологического, гистохимического, электронно-микроскопического и морфометрического методов анализа изучен миокард сердца контрольных крыс и крыс, которым на протяжении 10 недель внутрибрюшинно вводили раствор хлорида ртути в дозе 0,01 мг на 100 г массы тела. Установлено, что хроническая экспозиция малыми дозами ртути вызывает неспецифические качественные и количественные изменения в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крыс. Наиболее чувствительными к токсическому действию малых доз ртути являются миофибриллы и митохондрии. Уменьшение количественной и объемной плотностей митохондрий, количества и длины крист в них коррелируют со снижением уровня активности ферментов дыхания и терминального окисления, а также усилением гликолитических процессов.

Ключевые слова: кардиомоциты, крысы, хроническая ртутная экспозиция.

UDC 611. 127-018:[616-099:546. 49]-092. 9

Morphofunctional Changes Cardiomyocytes Rats with Chronic Mercury Exposure

Kaminskiy R. F.

Abstract. Overall health and condition of the cardiovascular system, in particular, greatly depends on the impact of external factors on the organism. Mercury and its inorganic and especially organic compounds are extremely toxic substances hazard class 1 with acute directional mechanism of action on the body, with severe neurotoxic and cardiotoxic. The goal was to establish the morphological and functional changes of rats cardiomyocytes with chronic mercury exposure. Experiments were conducted on 20 white mongrel male rats weighing 100-150 g. 2 groups of rats were studied: Group 1 – control animals. Group 2 – animals which are over 10 weeks were injected intraperitoneally with a solution of mercuric chloride in a dose LD50 – 0,01 mg per 100 g body weight. Conducted histological, histochemical, electromicroscopic and morphometric study. Statistical processing was performed by methods of variation statistics. Structural damage to the myocardium are diffuse and cover all parts of the right and left heart. Clearly visible heterogeneity of pathological changes of cardiomyocytes. Most of them have signs of uneven swelling; increased eosinophilia of myofibrils, they often loosened or focal superstaining. In some parts of the sarcoplasmic found small vacuoles. At the ultrastructural level in the cytoplasm of cardiomyocytes observed paranuclear swelling. Superstaining myofibrils interspersed with patches of random arrangement of myofibrils and myocytolysis. In left ventricular cardiomyocytes of rats after chronic exposure to mercury observed hypertrophy of the mitochondria due to lower number of small forms, there is a decrease of activity of NAD-n-DG and LDH at strengthening authentic LDH activity that constitutes a violation of the metabolic processes in cardiomyocytes. After chronic exposure mercuric chloride in the heart of rats a decrease in the efficiency of processes of energy supply function of cardiomyocytes, the activation mechanisms of intracellular catabolism discoordination of contractile apparatus and the violation of the spatial relations of mitochondria. Identify the metabolic and structural changes of cardiomyocytes lead to a reduction in their functional activity and are the basis for the development of heart disease. Most sensitive to the toxic effects of low doses of mercury is myofibrils and mitochondria. Reducing the density and volumetric quantification mitochondrial cristae number and length they correlate with a decrease in enzyme activity and respiration terminal oxidation and glycolytic amplification processes.

Keywords: cardiomyocytes, rats, chronic mercury exposure.

Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.

Стаття надійшла 19. 09. 2014 р.