

**Summary.** *The study is important due to insufficient investigation of amniotic membrane transplantation efficiency in bacterial keratitis. The objective was to study in the experiment features of anti-inflammatory action of viable cryopreserved human amniotic membrane on the model of bacterial keratitis using different surgical techniques. Transplantation of viable cryopreserved amniotic membrane was performed in 30 Chinchilla rabbits on the developed model of bacterial keratitis using inlay technique. In one month after transplantation in several rabbits corneal edema infiltration and vascularization were found. At the same depth of the corneal destruction by bacterial infectious process biological covering technique should be preferred as less traumatic surgical intervention, which is accompanied by a lower inflammatory response.*

**Key words:** *bacterial keratitis, cryopreserved amniotic membrane, experiment.*

*Рецензент - д.мед.н., ст.н.с. Усов В.Я.*

*Стаття надійшла до редакції 20.11.2015 р.*

*Середа Катерина Віталіївна - врач-офтальмолог, аспірант ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України"; +38 097 906-32-85; evsereda08@gmail.com*

*Дрожжина Галина Іванівна - проф., д.мед.н., зав. відділом патології рогівки ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України"; +38 050 103-73-22*

*Гайдамака Тетяна Борисівна - д.мед.н., ст.н.с. відділу патології рогівки ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України"; +38 067 481-74-32; drgaydamaka@gmail.com*

*Віт Валерій Вікторович - д.мед.н., проф., зам директора з наукової роботи ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України"; +38 067 945-90-27*

*Шаблій Володимир Анатолійович - к.б.н., зам директора Кріобанку Інституту клітинної терапії; +38 050 444-78-24; v\_shabliy@ukr.net*

*Лобинцева Галина Степанівна - к.б.н., директор Кріобанку Інституту клітинної терапії; +38 044 206-66-72*

© Чернявская Е.А., Невзоров В.П., Бабийчук В.Г., Мартынова Ю.В., Кулик В.В.

УДК: 616.12-092.18-056.52-092.4:612.649.011.87:615.014.41

**Чернявская Е.А., \*Невзоров В.П., Бабийчук В.Г., Мартынова Ю.В., Кулик В.В.**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, отдел криофизиологии (г. Харьков, ул. Переяславская, 23, 61015, Украина); \*ГУ Институт общей и неотложной хирургии АМН Украины лаборатория патоморфологии и экспериментальной хирургии (въезд Балакирева, 1, г. Харьков, 61018, Украина)

## ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК КАРДИОМИОЦИТОВ МИОКАРДА МОЛОДЫХ КРЫС С АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА КОРДОВОЙ КРОВИ

**Резюме.** *Целью исследования было изучить динамику изменений ультраструктурной архитектоники кардиомиоцитов миокарда молодых крыс с алиментарным ожирением на фоне введения криоконсервированного препарата ядродержащих клеток кордовой крови. Моделирование алиментарного ожирения осуществляли по методике В.Г. Баранова путем содержания животных на гиперкалорийном рационе. Размороженный препарат ядродержащих клеток кордовой крови человека, вводили внутривенно, однократно. В ходе исследования было установлено, что ультраструктурная организация кардиомиоцитов миокарда молодых контрольных животных характеризовалась высокой метаболической активностью этих клеток. У молодых крыс с алиментарным ожирением развиваются катаболические процессы, структурно проявляющиеся в появлении в цитоплазме кардиомиоцитов включений липидов, липофусцина и вторичных лизосом. Через сутки после введения препарата молодым животным с ожирением наблюдается умеренное повышение метаболической и репаративной активности в кардиомиоцитах миокарда, о чем свидетельствует увеличение полисом, рибосом и гранул гликогена, а также снижение количества вторичных лизосом, включений липидов и липофусцина. Описанные изменения сохраняются в отдаленные сроки экспериментальных исследований.*

**Ключевые слова:** *алиментарное ожирение, ядродержащие клетки кордовой крови, кардиомиоциты, митохондрии, крысы.*

### Введение

Ожирение без преувеличения можно назвать эпидемией мирового масштаба, поскольку количество лиц, как среди взрослого, так и среди детского населения, которые имеют избыточную массу тела, постоянно увеличивается [3]. Ожирение является хроническим полиэтиологическим заболеванием, связанным с влиянием ряда генетических и неврологических факторов, изменением функций эндокринной системы, стилем жизни и пищевым поведением пациента, а также с на-

рушением энергетического баланса [6]. Особенно неблагоприятным в прогностическом плане является алиментарное ожирение (АО). К наиболее частым болезням, которые ассоциируются с АО относят артериальную гипертензию, нарушение углеводного обмена, сердечную и дыхательную недостаточность и др. [4] Ожирение считается неинфекционной эпидемией XXI века в связи с высоким риском развития сердечно-сосудистой патологии, ранней инвалидизацией и преждевре-

менной смертью больных [5].

В научной и клинической практике накоплена значительная информация о положительном влиянии кордовой крови, как на разные органы, системы, клеточные культуры, так и на организм в целом. Благодаря своему биохимическому составу кордовая кровь является уникальной субстанцией с разнонаправленной биологической активностью [2].

К настоящему времени исследования, касающиеся изучения механизмов действия препаратов, полученных из кордовой крови на адаптационно-компенсаторные резервы организма экспериментальных животных при АО, отсутствуют. Поэтому большой теоретический и практический интерес представляет возможность коррекции нарушений гомеостаза организма экспериментальных животных при АО с помощью применения криоконсервированного препарата ядросодержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК).

В связи с вышеизложенным, целью исследования было изучить динамику изменений ультраструктурной архитектоники кардиомиоцитов миокарда молодых крыс с моделированным АО на фоне введения ЯСК КК.

### Материалы и методы

Исследования выполнены на белых 6 месячных беспородных крысах-самцах. Эксперименты на животных проведены в соответствии с Общими принципами работы на животных, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985).

Все животные были разделены на 3 группы: 6 месячные интактные крысы; 6 месячные контрольные крысы с моделью АО; 6 месячные крысы с АО на фоне применения ЯСК КК. Забор материала у экспериментальных животных осуществлялся на следующие сутки, а также через месяц после введения ЯСК КК.

Моделирование АО осуществляли по методике В.Г.Баранова путем содержания животных на гиперкалорийном рационе [1]. Наличие ожирения определялось по достоверному увеличению весо-ростового показателя - индекса Ли, который является точным математическим показателем степени ожирения у крыс и определяется по формуле:

$$\frac{3\sqrt{x \text{ вес тела (в г)}}}{\text{Длина от носа до анального отверстия, (в см)}} \times 1000.$$

Величина индекса более 300 свидетельствует о наличии ожирения.

Препарат представляет собой взвесь криоконсервированных ЯСК КК в аутоплазме с концентрацией стволовых CD34+ клеток 2 - 4x10<sup>5</sup> в 1мл. Размороженный препарат ЯСК КК человека, вводили внутривентриально, однократно в дозе 3x10<sup>5</sup> CD34+ клеток на килограмм

веса животных.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации на следующие сутки и через месяц после введения ЯСК КК, производя забор кусочков ткани миокарда для электронно-микроскопического исследования.

Предварительную фиксацию проводили в глутарово-формальдегидном фиксаторе при температуре 4°C в течении 5-6 часов. Затем кусочки миокарда перенесли в 1%-ный забуференный раствор четырехокиси осмия на 3-4 часа при температуре 4°C для окончательной фиксации. В дальнейшем ткань обезживали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, пропитывали в смеси эпоксидных смол (эпон-аралдит) и заключали в блоки по стандартным методикам. Полимеризацию блоков проводили в термостате при 60°C в течении двух суток.

Из полученных блоков, на ультрамикротоме УМТП - ЗМ, изготавливали ультратонкие срезы, монтировали их на электролитические сеточки и, после контрастирования цитратом свинца, изучали под электронным микроскопом ЭМВ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 кв.

### Результаты. Обсуждение

Электронно-микроскопическое исследование кардиомиоцитов интактных животных показало, что их ядра имели вытянутую форму, а также типичную локализацию в саркоплазме. Ядерная мембрана была с множественными мелкими деформациями. Ядерный хроматин находился преимущественно в деконденсированной форме и его гранулы равномерно распределялись по площади среза ядра. Довольно часто встречались ядра, мембрана которых образовывала глубокие инвагинации. Очаги разрыхления и лизиса отсутствовали. Перинуклеарные пространства имели постоянную ширину. В перинуклеарной области кардиомиоцитов располагались цистерны саркоплазматического ретикула и Т-системы, заполненные тонковолокнистой субстанцией средней электронной плотности. Наблюдался полиморфизм форм и размеров митохондрий: одни из них содержали неравномерно контрастированный матрикс (рис. 1), другие электронно-плотный с многочисленными кристами.

Матрикс митохондрий обладал, в целом, мелкозернистой структурой и средней электронной плотностью. Отдельные кардиомиоциты имели митохондрии, находящиеся в стадии деления, о чём свидетельствует их "гантелевидная" форма и перетяжки. Митохондрии, как с электронно-плотным матриксом, так и с электронно-прозрачным, содержали большое количество параллельно ориентированных крист. В саркоплазме кардиомиоцитов молодых животных включения липидов и липофусцина, а также вторичные лизосомы обнаруживались очень редко.

У молодых крыс с моделью АО в субмикроскопи-

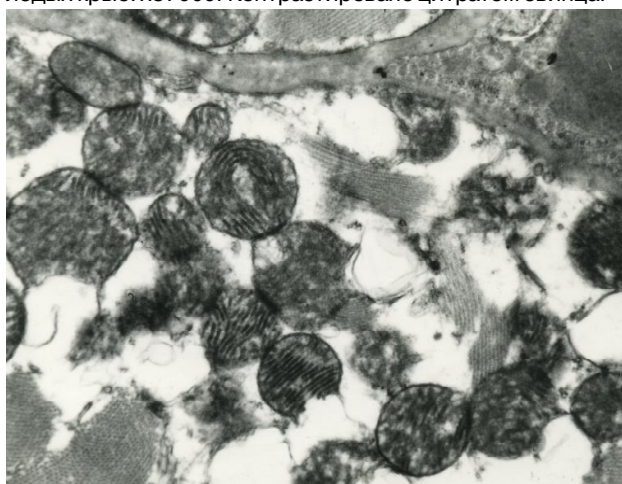
ческой архитектонике кардиомиоцитов присутствовали дистрофические и деструктивные изменения органелл. Матрикс ядер имел низкую электронную плотность. На фоне интактных животных возрастало количество глыбок конденсированного хроматина, которые концентрировались в области саркоплазмы, прилежащей к ядерной мембране. Деконденсированный хроматин располагался в центральной части матрикса ядра. Эта область матрикса ядра обладала низкой электронной плотностью. Ядерная мембрана образовывала мелкие и глубокие инвагинации. Наблюдалось разрыхление мембраны и очаги её разрушения. Встречались ядра с тотально разрушенными ядерными мембранами. В саркоплазме располагалось небольшое количество органелл, полисом, рибосом, гранул гликогена. Изменения митохондрий носили полиморфный характер. Часть имела электронно-прозрачный матрикс, в котором располагались единичные, разрыхлённые кристы, а в саркоплазме других обнаруживались очаги лизиса наружных мембран и крист (рис. 2). Довольно часто обнаруживались дегенеративно измененные митохондрии, с гомогенизированным матриксом и тотально разрушенными кристами.

В саркоплазме кардиомиоцитов присутствовали мелкие и крупные включения липидов и липофусцина, вторичные лизосомы, которые располагались вблизи пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи.

На следующие сутки после введения молодым крысам с АО препарата ЯСК КК в субмикроскопической архитектонике кардиомиоцитов присутствовали, как дистрофические, так и деструктивные нарушения органелл и мембран. Сохранялась низкая электронная плотность матрикса ядер кардиомиоцитов. Несколько снижалось количество глыбок конденсированного хроматина, концентрирующихся на ядерной мембране. Деконденсированный хроматин и рибосомы располагались в центральной части матрикса ядра, которая обладала низкой электронной плотностью. Ядерная мембрана с мелкими и глубокими инвагинациями была разрыхлена и имела очаги разрушения. Сохранялось большое количество ядер с тотально разрушенными ядерными мембранами. Перинуклеарные пространства неравномерно расширялись и имели вид электронно-прозрачных вакуолей. В саркоплазме располагалось небольшое, в сравнении с группой молодых интактных животных, количество органелл, полисом, рибосом и гранул гликогена. В целом митохондрии содержали укороченные и дезорганизованные кристы. Обнаруживались митохондрии с большим количеством крист и чётко контурированными наружными мембранами (рис. 3). В саркоплазме кардиомиоцитов молодых крыс с АО через сутки после введения препарата сохранялись мелкие и крупные включения липидов и липофусцина, а также вторичные лизосомы. Саркоплазматическая мембрана имела разрыхленный вид и очаги разрушения.



**Рис. 1.** Ультраструктура кардиомиоцитов интактных молодых крыс.  $\times 37000$ . Контрастировано цитратом свинца.

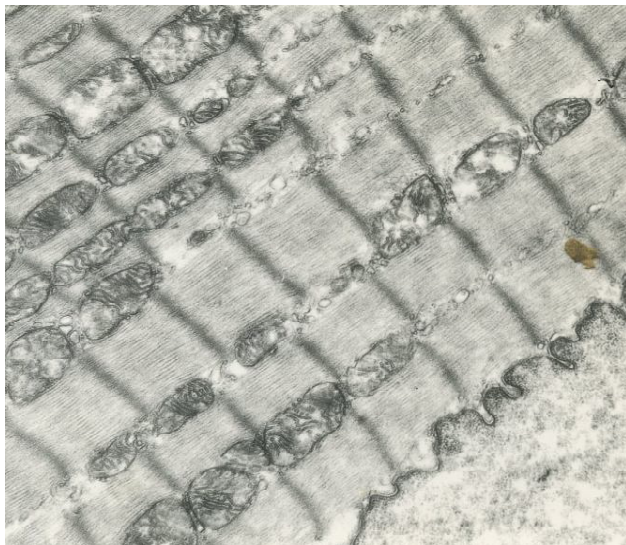


**Рис. 2.** Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс с АО. Очаговый лизис наружных мембран митохондрий.  $\times 37000$ . Контрастировано цитратом свинца.



**Рис. 3.** Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс с АО на следующие сутки после введения ЯСК КК. Плотные упакованные кристы митохондрий.  $\times 43000$ . Контрастировано цитратом свинца.

Анализируя субмикроскопическую организацию кардиомиоцитов миокарда молодых крыс с АО через сут-



**Рис. 4.** Ультраструктура кардіомиоцитів молодих крыс с АО через місяць після введення ЯСК КК. Мелкі інвагинації ядерної мембрани.  $\times 34\ 000$ . Контрастеровано цитратом свинця.

ки після введення ЯСК КК, слідует отметить, что набуодаетс я тенденция к восстанавленю их типичной ультраструктуры. Снужаетс я степень набухания митохондрией и возрастает количество крист, что свидетельствует о некотором уменьшении глубины выраженности митохондриальной дисфункции. Также в кардиомиоцитах практически отсутствуют тотальные разрушения внутриклеточных мембран и набуодаетс я умеренное повышение метаболической и репаративной активности, свидетельством чего является увеличение количества полисом, рибосом и гранул гликогена, а также снужение числа вторичных лизосом, включений липидов и липофусцина. Однако полного восстановления типичной субмикроскопической архитектоники кардиомиоцитов не наступает.

Через місяць після введення ЯСК КК субмикроскопическая архитектура кардиомиоцитов молодих крыс с АО в основном имела признаки высокой метаболической активности на уровне внутриклеточных мембран и органелл. Небольшая часть кардиомиоцитов сохраняла изменения, характерные для умеренно выраженного дистрофического процесса. Матрикс ядер кардиомиоцитов сохранял низкую электронную плотность. Глыбки конденсированного хроматина располагались преимущественно в области, прилежащей к ядерной мембране. В матриксе ядра определялось умеренное количество рибосом и гранул деконденсированного хроматина. Ядерная мембрана образовывала небольшое количество глубоких и мелких инвагинаций и содержала мелкие очаги разрыхления. Деструкции ядерной мембрани практически отсутствовали (рис. 4). Перинуклеарные пространства имели участки локального расширения, имеющего вид электронно-прозрачных везикул.

В сравнении с группой молодых крыс с АО количество органелл, рибосом, гранул гликогена в кардиомиоцитах существенно возрастало. Тем не менее, саркоплазма обладала низкой электронной плотностью. Большая часть митохондрий имела множество параллельно ориентированных крист и четко контурируемую наружную мембрану. В препаратах нередко набуодались митохондрии с локальным просветлением матрикса, имеющие "гантелевидную" форму с перетяжками. В кардиомиоцитах этой группы экспериментальных животных сохранялась значительная потеря электронной плотности саркоплазмы. В ней иногда выявлялись включения липидов, липофусцина и вторичные лизосомы. Цистерны саркоплазматического ретикулула и Т-системы были расширены, имели различную форму и размеры, а также были заполнены электронно-прозрачной субстанцией.

Таким образом, у молодых крыс с АО через місяць після введення ЯСК КК уровень дистрофических процессов в кардиомиоцитах существенно снужается, что структурно подтверждается отсутствием очагов деструкции мембран и крист митохондрий, саркоплазматического ретикулула, саркоплазматической мембраны, а также уменьшением в саркоплазме количества включений липидов и липофусцина.

### Выводы и перспективы дальнейших разработок

1. Ультраструктурная организация кардиомиоцитов миокарда молодых контрольных животных свидетельствует о высокой метаболической активности этих клеток.

2. У молодых крыс с АО развиваются катаболические процессы, структурно проявляющиеся появлением в цитоплазме кардиомиоцитов включений липидов, липофусцина и вторичных лизосом.

3. Через сутки после введення ЯСК КК у молодых крыс с АО в кардиомиоцитах набуодается умеренное повышение метаболической и репаративной активности, за счет увеличения количества полисом, рибосом и гранул гликогена, а также снужения количества вторичных лизосом, включений липидов и липофусцина.

4. У молодых животных с АО через місяць після введення ЯСК КК уровень дистрофических процессов в кардиомиоцитах существенно снужается, что структурно выражается в отсутствии очагов деструкции мембран и крист митохондрий, саркоплазматического ретикулула, саркоплазматической мембраны, а также уменьшением в саркоплазме количество включений липидов и липофусцина.

В дальнейших исследованиях планируется провести гистохимическую оценку состояния коллагеновых и эластических волокон в тканях миокарда молодых и старых животных с АО на фоне введення криоконсервированного препарата ЯСК КК.

## Список літератури

1. Баранов В.Г. Чувствительность к инсулину, толерантность к глюкозе и инсулиновая активность крови у крыс с алиментарным ожирением / В.Г.Баранов, Н.Ф.Баранов, М.Ф.Беловинцева //Проблемы эндокринологии.- 1972. - Т.6. - С.52-58.
2. Динамика ультраструктурных перестроек кардиомиоцитов миокарда молодых крыс в процессе развития и прогрессирования неврогенной артериальной гипертензии /Л.В.Бабичук, В.П.Невзоров, О.Ф.Невзорова [и др.] // Харківська хірургічна школа.-2012.-№5(56).- С.24-29.
3. Лещенко И.В. Эндокринна функція підшлункової залози у щурів за умов експериментального ожиріння /И.В.Лещенко, В.Г.Шевчук, О.А.Савченко [и др.]// Фізіологічний журнал.- 2014.-Т.60,№1.-С.41-48.
4. Лупанов В.П. Ожирение как фактор риска развития сердечно-сосудистых катастроф/ В.П. Лупанов //Российский медицинский журнал.- 2003. - Т.11, №6. - С. 331-337.
5. Перетолчина Т.Ф. Ожирение и морфофункциональные изменения сердца/ Т.Ф. Перетолчина, С.Ю. Дашутина, С.С. Барац //Кардиология.- 2005. - №7.- С. 66-68.
6. Greenberg A. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism /A.Greenberg, M.Obin // American J. of Clin. Nutrition.- 2006.- №83.- P.461-465.

**Чернявська О.А., Невзоров В.П., Бабичук В.Г., Мартинова Ю.В., Кулик В.В.**

### ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАСТРУКТУРНИХ ПЕРЕБУДОВ КАРДІОМІОЦИТІВ МІОКАРДА МОЛОДИХ ЩУРІВ З АЛІМЕНТАРНИМ ОЖИРІННЯМ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНОГО ПРЕПАРАТУ КОРДОВОЇ КРОВІ

**Резюме.** Метою дослідження було вивчити динаміку змін ультраструктурної архітектоніки кардіоміоцитів міокарда молодих щурів з аліментарним ожирінням на фоні введення кріоконсервованого препарату ядровмісних клітин кордової крові. Моделювання аліментарного ожиріння здійснювали за методикою В.Г. Баранова шляхом утримання тварин на гіперкалорійному раціоні. Розморожений препарат ядровмісних клітин кордової крові людини, вводили внутрішньочеревно, одноразово. У ході дослідження було встановлено, що ультраструктурна організація кардіоміоцитів міокарда молодих контрольних тварин характеризувалася високою метаболічною активністю цих клітин. У молодих щурів з аліментарним ожирінням розвиваються катаболічні процеси, що структурно проявляється в появі в цитоплазмі кардіоміоцитів включень ліпідів, ліпофусцину і вторинних лізосом. Через добу після введення препарату молодим тваринам з ожирінням спостерігається помірне підвищення метаболічної та репаративної активності в кардіоміоцитах міокарда, про що свідчить збільшення полісом, рибосом і гранул глікогену, а також зниження кількості вторинних лізосом, включень ліпідів і ліпофусцину. Описані зміни зберігаються у віддалені терміни експериментальних досліджень.

**Ключові слова:** аліментарне ожиріння, ядровмісні клітини кордової крові, кардіоміоцити, мітохондрії, щури.

**Chernyavskaya E.A., Nevzorov V.P., Babichuk V.G., Martynova Yu.V., Kulik V.V.**

### PECULIARITIES OF ULTRASTRUCTURAL REARRANGEMENTS IN MYOCARDIAL CARDIOMYOCYTES OF YOUNG RATS WITH ALIMENTARY OBESITY WHEN INTRODUCING CRYOPRESERVED CORD BLOOD PREPARATION

**Summary.** The research aim was to study the dynamics of changes in ultrastructural architecture of myocardium cardiomyocytes of young rats with alimentary obesity when introducing the preparation of cryopreserved cord blood nucleated cells. Alimentary obesity was simulated according to the method of V.G. Baranov by keeping the animals on hypercaloric diet. The thawed preparation of human cord blood nucleated cells was intraperitoneally introduced once. During the research it has been found that ultrastructural organization of myocardial cardiomyocytes of young control animals was characterized with a high metabolic activity of the cells. In young rats with alimentary obesity there have been developed the catabolic processes, structurally manifested in the appearance in cardiomyocyte cytoplasm of inclusions of lipids, lipofuscin and secondary lysosomes. Twenty-four hours later the administration of the preparation to young animals with obesity there was observed a moderate increase in metabolic and reparative activity in myocardial cardiomyocytes, as evidenced by a rise in polysomes, ribosomes and glycogen granules, as well as reducing the number of secondary lysosomes, inclusions of lipids and lipofuscin. These described changes are kept for the remote terms of experimental research.

**Key words:** alimentary obesity, cord blood nucleated cells, cardiomyocytes, mitochondria, rats.

**Рецензент:** д.мед.н., проф. Компанієць А.М.

Стаття постулила в редакцію 10.11.2015г.

Чернявская Елена Александровна - аспирантка отдела криофизиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков; elena\_chernyavskaya@ukr.net

Бабичук Владислав Георгиевич - д. мед. н., ст. научн. с., вед. научн. с. отдела криофизиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков; babiichuk.lyudmila@mail.ru

Невзоров Вячеслав Павлович - к. биол. н., ст. научн. с., вед. научн. с. лаборатории патоморфологии и экспериментальной хирургии, ГУ Институт общей и неотложной хирургии им. В.Т. Зайцева НАМН Украины, г. Харьков; +38 093 966-22-16

Мартинова Юлия Викторовна - и.о. м. научн. с. отдела криофизиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков; julia-gen1989@mail.ru

Кулик Владимир Владимирович - аспирант отдела криофизиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков; biovladimir91@mail.ru