УДК 616.127–008.6–091

УЛЬТРАСТРУКТУРА КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ СЕРДЦА, ВЫЗВАННОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ И ЦИТОСТАТИКАМИ

В. Б. Писарев, В. В. Новочадов, И. В. Зарипова
Кафедра патологической анатомии ВолГМУ,
Клинический онкологический диспансер, г. Ульяновск

В эксперименте на крысах показаны некоторые сходства и различия в строении ядра, митохондрий и миофиламентов кардиомиоцитов при патологии, вызванной хроническим эндотоксикозом и цитостатиками. Они были сопоставлены с различиями в точках приложения повреждающих агентов и динамикой повреждения сократительного аппарата при развитии кардиомиопатии.

Ключевые слова: кардиомиопатия, эндотоксикоз, ультраструктура кардимиоцитов.

ELECTRON MICROSCOPY OF CARDIAC MYOCYTES IN HEART DISEASE DUE TO CHRONIC ENDOGENOUS INTOXICATION AND CYTOSTATIC DRUGS

V. B. Pisarev, V. V. Novochadov, I. V. Zaripova

Abstract. It was shown experimentally that cardiac myocytes in rats have similar morphology and some differences in structure of nuclei, mitochondria, and myofilaments in diseases caused by chronic endogenous intoxication and cytostatic drugs. These findings were compared with different points of damaging factor action, and the dynamics of contractile apparatus lesion due to cardiomyopathy.

Key words: cardiomyopathy, endotoxicosis, cardiac myocyte structure.

Одной из наименее изученных вариантов патологии сердца на сегодняшний день являются кардиомиопатии. В основе этой группы заболеваний лежат структурные изменения миокарда при отсутствии ишемической, воспалительной или опухолевой природы повреждения. К этой группе заболеваний также не относят поражения миокарда вследствие артериальной гипертензии или пороков сердца [2, 3, 11].

На данный момент различают несколько механизмов развития кардиомиопатий. Внешний механизм приводит к функциональной недостаточности миокарда вследствие прямого или опосредованного повреждения кардиомиоцитов (КМЦ). Одним из ярких примеров такого повреждения может служить кардиомиопатия, возникающая при хроническом эндотоксикозе (ЭТ) из-за альтерации клеток вследствие микроциркуляторных нарушений, вегетативного дисбаланса и действия эндогенных токсических соединений и медиаторов [6, 9, 12]. В основе второго механизма лежит недостаточность исполнительного аппарата внутриклеточной регенерации в КМЦ, что приводит к патологии даже при отсутствии внешнего повреждающего фактора. К данному виду повреждений относится классическая "антрациклиновая" кардиомиопатия, возникающая преимущественно у онкологических больных на фоне химиотерапии [4, 6, 7, 10]. Однако регенераторно-пластическая недостаточность миокарда может развиваться при использовании большинства противоопухолевых препаратов [13, 14].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Установить сходство и различия в ультраструктурной организации КМЦ при кардиомиопатии, вызванной хронической эндогенной интоксикацией и поражением сердца, индуцированным приемом цитостатиков.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была выполнена на 32 белых крысах линии "Вистар" массой 180-240 г. Выбор, содержание животных, моделирование патологических процессов и выведение крыс из опыта осуществляли на основе базисных нормативных документов МЗ РФ и рекомендаций ВОЗ.

Моделирование хронического ЭТ производилось 10 животным с помощью стандартной методики, предусматривающей ежедневное внутрибрюшинное введение 4 %-го раствора гентамицина из расчета 20 мг/кг массы тела и еженедельной инъекции раствора бактериального липополисахарида *S. thyphimurium* из расчета 0,5 мг/кг массы тела [6]. Моделирование кардиомиопатии под действием цитостатиков у 10 крыс предусматривало введение фторурацила в дозе 15 мг/кг перорально 1 раз в сутки. Группу контроля составили 12 интактных животных, получавших внутрибрюшинно 1 раз в неделю физиологи-

ческий раствор. Выведение животных из эксперимента проводилось на 30, 60 и 90-е сутки эксперимента.

Сердце животных немедленно после эвтаназии внутрисердечным введением 4 %-го раствора параформа разрезали фронтальными секциями на 4 блока и вырезали строго ориентированные кусочки размером 1 мм^3. Их фиксацию производили в течение 12 ч в 4 %-м растворе параформа на 0,1 М какодилатном буфере с постфиксацией в течение 2 часов в 1 %-м растворе тетраокиси осмия на 0,1 М какодилатном буфере (pH=7,4) при температуре +4°С. После промывки в нескольких порциях раствора какодилатного буфера материал подвергали дегидратации в спиртах возрастающей концентрации и заливали в смесь эпона и аралдита [8].

Ультратонкие срезы толщиной 50–90 нм получали на ультрамикротомах LKB-8800 и монтировали на медные сетки. После контрастирования в 2,5 %-м растворе уранилацетата на 50° этаноле в течение 40 мин и 0,3 %-м растворе цитрата свинца в течение 20 мин срезы изучались в электронном микроскопе "Tesla BS-540" при ускоряющем напряжении 60 кВ. Фотодокументирование производили с использованием фотопластинок для ядерных исследований, электронные микрофотографии изготавливали на фотобумаге "Унибром 160 БП".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс контрольной группы в цитоплазме КМЦ четко определяются параллельно расположенные миофибриллы правильным чередованием А- и Z-дисков. Вокруг миофибрилл – обильное количество митохондрий с хорошо выраженными кристами. В гиалоплазме, преимущественно около миофибрилл, наблюдается развитая сеть полисом и гранулы гликогена (рис. 1). Ядро КМЦ содержит ядрышко, в котором хорошо различимы гранулярный и фибриллярный компоненты. Ядерная оболочка обычного двухмембранного строения. Кариолемма не образует инвагинаций. Хроматин представлен гетеро- и эухроматином, причем гетерохроматин достаточно четко локализован на внутренней ядерной мембране (рис. 2).

В миокарде крыс с ЭТ ядра КМЦ уменьшены в размерах, имеется небольшое число инвагинаций кариолеммы. Ядрышко уменьшено в размерах, деформировано, с резким снижением гранулярного компонента. Плотность гранул хроматина резко повышена, он представлен большим количеством глыбок в кариоплазме. Часть миофибрилл лизирована; на месте литических изменений обнаружено большое количество лизосом. Митохондрии увеличины в размерах, их содержимое – с повышенной электронной плотностью. Плотность рибосом снижена по сравнению с группой интактных животных. Гранулы гликогена практически не определяются (рис. 3).

К 60 суткам эксперимента указанные изменения выражены в несколько большей степени, а к 90-м суткам в КМЦ появляются новообразованные миофибриллы, отражающие этап репаративной регенерации лизированных волокон. Данные миофибриллы более тонкие и расположены под углом к сохранившимся волокнам, Z-полоски смещены относительно друг друга, в некоторых миофибриллах вставочные диски не определяются (рис. 4).

При исследовании КМЦ крыс, получавших цитостатические препараты, на 30-е сутки в ядрах обнаружено малое количество гетерохроматина, резко он представлен лишь узкой полоской вдоль внутренней поверхности кариолеммы. Основная часть материала ДНК представлена диффузно рассредоточенным эухроматином. Ядрышко включает гранулярный и нитчатый компоненты, что свидетельствует о его функциональной активности. Однако в отдельных случаях наблюдается образование кольцевидных ядрышек и потеря фибриллярного компонента. Одна из отличительных особенностей касается митохондрий. На электронных микрофотографиях большое количество митохондрий с разрушенным и гомогенизированным матриксом, вокруг которого формируются электроннопрозрачные поля. Данный феномен является артефактом, вызванным деструкцией митохондрий при контрастировании солями тяжелых металлов. Однако сам факт такой деструкции указывает на неустойчивость мембранного аппарата митохондрий [4]. В гиалоплазме отмечается резкое снижение количества рибосом и гранул гликогена. Миофибриллы становятся менее плотными, во многих саркомерах появляются пустоты, в некоторых случаях отмечается тотальный лизис миофиламентов в пределах саркомера. Наиболее выраженные изменения происходят в околоядерной зоне. Миофибриллы с пониженной электронной плотностью, между миофиламентами А-дисков отмечаются узкие пространства (рис. 5).

При воздействиях цитостатиками литические изменения миофибрилл, деградация других ультраструктур клетки, сопровождающаяся усилением процессов аутофагии, приводит к атрофии КМЦ и гибели по типу апоптоза (рис. 6).

К 60-м суткам во многих саркомерах образовываются пустоты. Большинство миофибрилл заметно истончается, контур их напоминает контур бамбукового ствола. Одновременно возрастает расстояние между соседними миофибриллами; в участках значительного лизиса миофибрилл хорошо видны трубочки Т-системы, свободно лежащие митохондрии, гранулы гликогена. Особенно выраженное истончение миофибрилл, вплоть до полного их исчезновения, выявляется в центральной зоне КМЦ. Перинуклеарные пространства, лишенные миофибрилл, заметно расширены, количество органелл в них уменьшено. Наблюдается фрагментация Z-полосок со смещением Z-линий относительно друг друга.

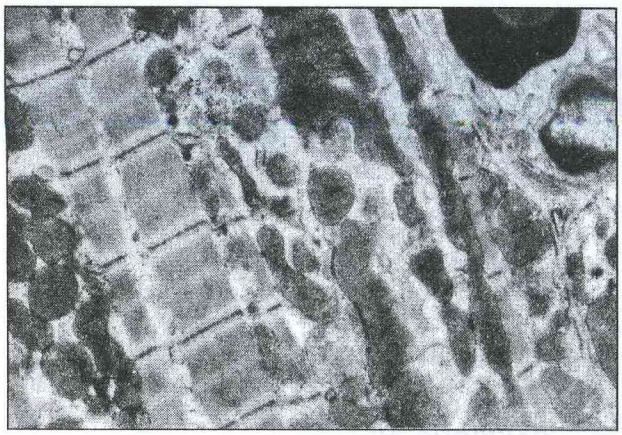

Рис. 1. Сократительный кардиомиоцит крысы контрольной группы. Нормальное строение миофибрилл. Обилие митохондрий, мелкие гранулы гликогена вблизи миофибрилл. Ув. х6000

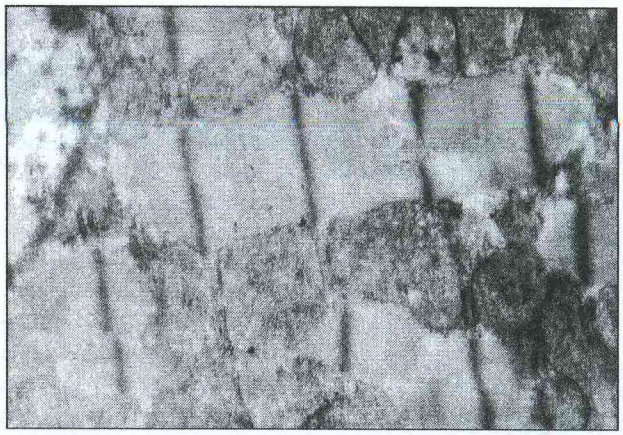

Рис. 2. То же. Светлое ядро, хорошо различимая кариолемма, чередование миофибрилл и плотно расположенных митохондрий с хорошо выраженным кристообразованием. Ув. х10000

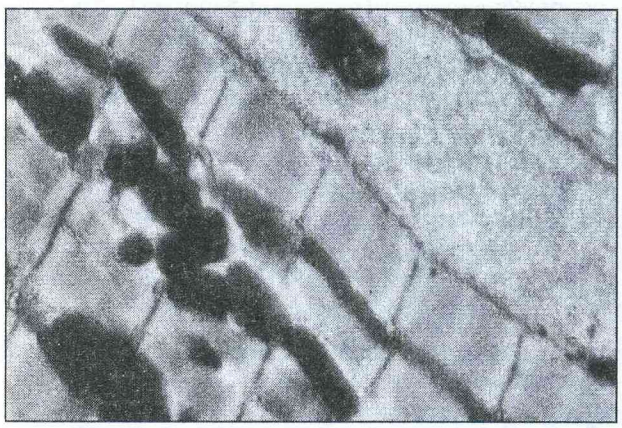

Рис. 3. Сократительный кардиомиоцит крысы на 30-е сутки хронического ЭТ. Сжатие и коллабирование ядрышка с отсутствием гранулярного компонента, уменьшение плотности глыбок хроматина. Лизис части саркомеров на 30-е сут. КМП. Ув. х8000

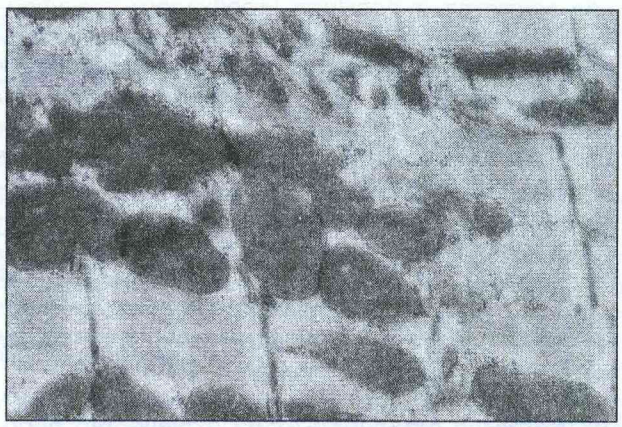

Рис. 4. То же, 90-е сутки ЭТ. Частичная регенерация миофиламентов с нарушением их параллельной ориентации в кардиомиоците. Скопления полисом между сохранившимися миофиламентами. Ув. х10 000

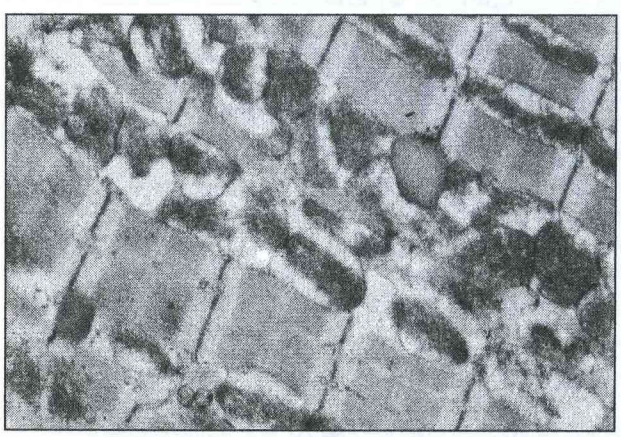

Рис. 5. Сократительный кардиомиоцит крысы на 30-е сутки цитостатической кардиомиопатии. Истончение миофибрилл, набухание и частичный аутолиз митохондрий. Аутофагосомы в саркоплазме между миофибриллами. Ув. х10000

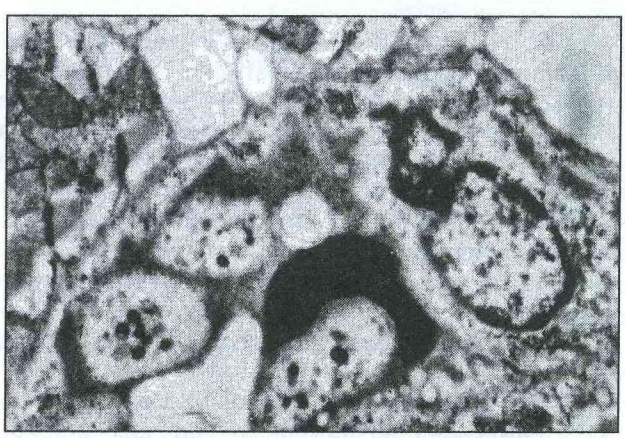

Рис. 6. То же 30-е сут. Макрофаг со светлым ядром, гранулярным ядрышком и фагосомами в цитоплазме вблизи сарколеммы кардиомиоцита с повреждением миофибриолл. Скопления рибосом и полирибосом по периферии истонченных миофибрилл и в саркоплазме вдоль новообразующихся миофиламентов. Ув. х29 000

Начиная с 90-х суток эксперимента в КМЦ определяются ультраструктурные признаки регенераторных реакций: по периферии истонченных миофибрилл отмечаются скопления рибосом и полирибосом, появляются небольшие новообразованные миофибриллярные пучки. В некоторых КМЦ новообразованные миофибриллярные пучки располагаются веерообразно, под углом к длиннику клетки, либо спиралеобразно закручены.

Таким образом, можно говорить о том, что при кардиомиопатии, развивающейся при хронической эндогенной интоксикации и при действии цитостатических препаратов, существуют достаточно показательные ультраструктурные различия. Они касаются, в первую очередь, ядерного аппарата и заключаются в том, что при ЭТ происходит повреждение ядра, визуализирующееся конденсацией хроматина и превращением его в неактивный гетерохроматин. Такие же изменения касаются и ядрышка, теряющего гранулярный компонент. Эти данные могут быть интерпретированы как потеря транскрипционной активности ядра, возникающей вследствие прямого или опосредованного повреждения. Прямым следствием этого процесса является нарушение синтеза белка, что подтверждается электронно-микроскопическими данными о снижении количества полисом и свободных рибосом в цитозоле. В противовес этому, при патологии, вызванной цитостатиками, ядро КМЦ активно. Это выражается светлой кариоплазмой, низким содержанием гетерохроматина, наличием и фибриллярного, и гранулярного компонентов ядрышка. Однако, несмотря на активность ядра, количество рибосом снижено, что указывает на неэффективность транскрипционных и трансляционных процессов. Это подтверждает гипотезу о том, что первичный источник патологии белкового синтеза при действии цитостатиков-антиметаболитов лежит в синтезе недееспособной м-РНК.

Важным показателем, свидетельствующим о степени нарушения белково-синтетической функции, может служить тяжесть повреждения митохондрий. Если при ЭТ нарушения касаются увеличения осмиофильности, набухания и отека митохондрий, сохраняющих относительную стабильность мембран, то при использовании цитостатиков устойчивость митохондриальных мембран резко нарушена, что и проявляется в деструкции последних при их контрастировании. Данный факт может свидетельствовать о безусловно более тяжелом нарушении метаболизма.

Различия в этиологии поражающего фактора отражается и на саркомерах, причем если при кардиомиопатии на фоне ЭТ повреждение реализуется в виде лизиса части миофибрилл вследствие альтерации, то при цитостатическом воздействии уменьшение в размерах, истончение саркомеров и сердечная дисфункция являются не столько следствием литических изменений, сколько прямым результатом депрессии белкового анаболизма. Результатом этого в обоих случаях является резорбция поврежденных элементов фаголизосомами, более выраженная при применении противоопухолевых средств, внутриклеточно-регенераторное развитие новых миофибрилл с нарушением пространственной ориентации последних по отношению к линиям силового воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о неоднородных механизмах в развитии сходных признаков миокардиальной дисфункции, обусловленных различными точками приложения повреждающего агента и различной степенью альтерации тех или иных структур при кардиомиопатиях, развивающихся при хроническом ЭТ и при действии цитостатических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Автандилов Г. Г.* Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. *Кактурский Л. В.* Внезапная сердечная смерть: Клиническая морфология. – М.: Изд-во "Медицина для всех", 2000. – 127 с.
3. *Лушникова Е. Л., Клинникова М. Г. Молодых О. П.* и др. // Матер. II Всерос. съезда Российского общества патологоанатомов. – М., 2006. – Т. 2. – С. 94–96.
4. *Непомнящих Л. М., Лушникова Е. Л., Семенов Д. Е.* Регенераторно-пластическая недостаточность сердца: морфологические основы и молекулярные механизмы. – М.: Изд-во РАМН, 2003. – 255 с.
5. *Новочадов В. В., Писарев В. Б.* Эндотоксикоз: моделирование и органопатология. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005. – 240 с.
6. *Childs A. C., Phaneuf S. L., Dirks A. J.,* et al. // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62. – P. 4592–4598.
7. *De Beer E. X., Bottone A. E., Voest E. E.* // Eur. J. Pharmacol. – 2001. – Vol. 415. – P. 1–11.
8. Electron microscopy methods and protocols / Ed. by Nasser Hajibagheru M. A. – New Jersey: Humana Press, Totowa, 1999 – 283 p.
9. *Hocherl K., Dreher F., Kurtz A.,* et al. // Hypertension. – 2002. – Vol. 40, № 6. – P. 947–953.
10. *Kim Y., Ma A.-G., Kitta K.,* et al. // Mol. Pharmacol. – 2003. – Vol. 63. – P. 368–377.
11. *Krack A., Sharma R., Figulla H. R.,* et al. // Eur. Heart J. – 2005. – Vol. 26, № 22. – P. 2368–2374.
12. *Kruger S., Graf J., Merx M. W.,* et al. // Eur. J. Intern. Med. – 2005. – Vol. 16, № 5. – P. 345–347.
13. *Lancel S., Joulin O., Favory R.,* et al. // Circulation. – 2005. – Vol. 111, № 20. – P. 2596–2604.
14. *von-Haehling S., Anker S. D.* // Expert Opin. Investig. Drugs. – 2005. – Vol. 14, № 2. – P. 163–176.