
МОРФОЛОГИЯ

А. В. Смирнов, Н. Г. Паньшин, А. А. Спасов, И. Н. Иежица, М. В. Харитонов

Кафедра патологической анатомии, кафедра фармакологии ВолГМУ, Волгоградский научный центр РАМН и АВО

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИОКАРДА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ДЕФИЦИТА МАГНИЯ

УДК 616.61 132.2-092.9:546.46

При изучении морфологических особенностей миокарда крыс в условиях экспериментального дефицита магния обнаружены изменения, свидетельствующие о развитии хронического воспаления в стенке кровеносных сосудов с последующим склерозированием и формированием мелкоочагового кардиосклероза. Данный процесс приводит к развитию гипоксического повреждения сердечной мышцы.

Ключевые слова: эндотелий, миокард, магний, дефицит, воспаление, крыса.

A. V. Smirnov, N. G. Panshin, A. A. Spasov, I. N. Iezhitsa, M. V. Kharitonova

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE RATS MYOCARDIUM IN MAGNESIUM DEFICIENCY EXPERIMENTAL MODEL

Studying morphological features of rat myocardium in the conditions of experimental deficiency of magnesium we revealed changes testifying to development of a chronic inflammation in the vascular wall with the subsequent sclerosis and formation of cardiosclerosis. This process leads to the development of hypoxic damage to cardiac muscle.

Key words: endothelial cells, myocardium, magnesium, deficiency, inflammation, rat.

В структуре патологии элементного статуса у населения России недостаточность магния занимает лидирующую позицию, наряду с распространенностью дефицита йода, кальция, железа и цинка [1]. Магний служит обязательным кофактором для более трехсот ферментов, регулирующих различные функции организма. Дефицит магния стимулирует выработку целого ряда цитокинов и других гуморальных факторов, активацию оксидантных процессов [5]. Первой мишенью для всех этих воздействий становятся выстилающий сосуды эндотелий, повреждение которого, по современным представлениям, является ключевым звеном атеросклероза, воспаления и тромбообразования [4]. Проведено множество исследований, подтверждающих тесную взаимосвязь дисфункции эндотелия с формированием атеросклеротического поражения сосудов [3]. Дисфункция эндотелия сопровождается повышением уровня молекул адгезии, что приводит к адгезии лейкоцитов, росту концентрации провоспалительных цитокинов, высокой сосу-

дистой проницаемости, усилению окисления липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), пролиферации и миграции гладкомышечных клеток, а также активации тромбоцитов. В связи с этим в последнее время значительно вырос интерес к выявлению механизмов взаимосвязи между недостаточностью магния и развитием поражения сосудов [6]. В экспериментах *in vitro* было показано, что внеклеточный магний участвует в регуляции активности эндотелия, в частности, способен влиять на синтез оксида азота [7], захват и метаболизм ЛПНП [8], пролиферацию и экспрессию генов в клетках. Ferre S. с соавт. показали, что низкая концентрация магния в эндотелиальных клетках ускоряет процессы старения, что может быть фактором риска развития атеросклероза [2].

Коронарные кровеносные сосуды чрезвычайно чувствительны к магниевому балансу. При снижении уровня магния возрастает тонус коронарных сосудов, что ведет к ишемическому повреждению миокарда [8].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение влияния алиментарной недостаточности магния на структурные изменения артерий миокарда у крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были выполнены на 30 половозрелых нелинейных белых крысах-самцах массой 170—260 г. Контролем служили животные, находившиеся на стандартном лабораторном пищевом рационе. Интактная группа животных ($n = 10$) составляла контроль. У экспериментальных крыс ($n = 20$) моделировали магнидефицитное состояние. Для моделирования алиментарного дефицита магния животные содержались на магнидефицитной диете «ICN Biomedicals Inc.» (Aurora, Ohio, США), которая включала 20 % казеина, 70 % крахмала, 0,3 % DL-метионина, 0,2 % холина битартрата, 5 % кукурузного масла, 1 % поливитаминной смеси, 3,5 % диеты составляла полиминеральная смесь АIN-76, не содержащая магния. Весь рацион готовился на деионизированной воде, эту же воду в ходе эксперимента использовали в качестве питьевой воды для животных, находящихся на диете.

Скорость и глубину развития гипомagneзиемии контролировали, определяя концентрацию магния в плазме и эритроцитах крови спектрофотометрическим методом по цветной реакции с титановым желтым (Sigma, США) с измерением на спектрофотометре «СФ-26» (ЛОМО, Россия) в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 550 нм.

При снижении концентрации магния ниже 1,4 ммоль/л в эритроцитах и ниже 0,7 ммоль/л в плазме считалось, что у животных развилась гипомagneзиемия средней тяжести. К началу восьмой недели магнидефицитной диеты у животных наблюдалось статистически значимое снижение уровня магния в эритроцитах на 57 % и в плазме — на 47 % ($p < 0,05$) по отношению к группе интактных крыс, после чего животных наркотизировали введением этаминала-натрия в дозе 40 мг/кг, внутривенно.

Для проведения гистологического исследования материал для исследования получали из левого желудочка на среднем уровне. Вырезали продольные и поперечные фрагменты, включающие все оболочки сердца, и фиксировали в 4%-м растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) в течение 24 ч. Заливали в парафиновые блоки по общепринятым гистологическим методикам. Парафиновые срезы толщиной 3—5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Масону, гематоксилином-основным фуксином-пикриновой кислотой (ГОФП) по Ли. Гистологические препараты также изучали в поляризованном свете.

Гистологические препараты фотографировали цифровой камерой «Canon» (Japan, 5.0 мегапикселей) на базе микроскопа «AxioStar plus» (Карл Цейс, Германия) с использованием объектива $\times 10$; $\times 40$ и окуляра $\times 10$. При морфологическом исследовании оценивали наличие воспалительной инфильтрации и признаков тромбообразования в стенке артериальных сосудов мышечного типа. Кроме того, определяли объемную плотность (ОП) кардиомиоцитов (V_v кмц, %), объемную плотность ядер кардиомиоцитов (V_v якмц, %), объемную плотность стромы (V_v с, %) и объемную плотность фуксинофильных кардиомиоцитов (V_v ГОФП+кмц, %), отношение объемной плотности стромы к объемной плотности паренхимы (V_{vc}/V_v кмц). Проводили расчет базовых статистических показателей (M , m) с использованием парного t -критерия Стьюдента.

Для проведения электронно-микроскопического исследования кусочков миокарда размером 1 мм³ фиксировали в течение 12 ч в 4%-м растворе параформа на 0,1М какодилатном буфере. Ультратонкие срезы толщиной 50—90 нм получали на ультратоме «LKB-8800». Изучение проводили на электронном микроскопе «Tesla BS-500» при ускоряющем напряжении 60 кВ. Электронные микрофотограммы изготавливали на фотографической черно-белой бумаге «Унибром 160 БГ».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных интактной группы в изучаемых микропрепаратах сосудистая выстилка артерий мышечного типа была представлена эндотелием, состоящим из одного слоя плоских одноядерных клеток. Признаки воспалительной инфильтрации и склероза в стенке артериальных сосудов и тромбообразования отсутствовали. Отмечалось умеренное полнокровие артериальных сосудов. Цитоплазма эндотелиоцитов однородная, слабо эозинофильная.

Кардиомиоциты у животных интактной группы [(ОП — $(82,6 \pm 1,3)$] %, соединялись «конец в конец» с образованием мышечных волокон. Ядра кардиомиоцитов имели овальную вытянутую форму [(ОП — $(7,2 \pm 1,2)$] %. Цитоплазма кардиомиоцитов была однородная, умеренно эозинофильная. Единичные кардиомиоциты окрашивались позитивно по Ли. В продольных срезах хорошо различалась поперечная исчерченность мышечных волокон, которая отражала наличие в сердечных миоцитах многочисленных миофибрилл, состоящих из темных и светлых участков. В поляризационном свете четко прослеживались анизотропные А- и изотропные I-полосы. В соединительнотканной строме преобладали фибробласты, коллагеновые и эластические волокна и кровеносные сосуды [(ОП — $(17,4 \pm 6,2)$] %.

В группе животных с дефицитом магния были отмечены выраженные явления полнокровия ар-

териальных сосудов мышечного типа. В сосудистой стенке прослеживались явления выраженного отека. В отдельных артериальных сосудах мышечного типа определялись поверхностные дефекты эндотелиальной выстилки. В области повреждения происходило формирование мелких пристеночных тромбов. Во внутренней, средней и наружной оболочках артерий отмечались признаки умеренно выраженной лимфоплазмозитарной инфильтрации с отеком, которая распространялась периваскулярно и сочеталась с развитием склеротических изменений вокруг сосудов и в их стенке. В отдельных артериях определялось краевое стояние полиморфно-ядерных лейкоцитов и лимфоцитов. Цитоплазма эндотелиальных клеток была однородная, гомогенная, умеренно эозинофильная.

Объемная плотность кардиомиоцитов опытной группы достоверно снижалась по сравнению с контрольной (табл.). Ядра кардиомиоцитов сохраняли овальную вытянутую форму. Отмечалось достоверное увеличение (по сравнению с контролем) объемной плотности кардиомиоцитов с фуксинофильной цитоплазмой при окраске по Ли. ГОФП-позитивные кардиомиоциты располагались отдельными группами преимущественно периваскулярно в субэпикардальных отделах миокарда левого желудочка. В эозинофильных мышечных сегментах при поляризационно-микроскопическом исследовании обнаружено сближение анизотропных дисков за счет укорочения изотропных (сегментарные контрактуры I—II степени). Объемная плотность стромы достоверно увеличивалась по сравнению с контрольной группой. Увеличение ОП стромы в сочетании с уменьшением ОП кардиомиоцитов характеризовалось увеличением соотношения $V_v c/V_v$ ($p < 0,05$).

Объемная плотность и объемное отношение основных компонентов миокарда крыс с алиментарным дефицитом магния ($M \pm m$)

Группа	Показатели				
	V_v кмц, %	V_v якмц, %	V_v с, %	V_v ГОФП+кмц, % от V_v кмц	V_v с/ V_v кмц, число
Контрольная группа	82,6 ± 1,3	7,2 ± 1,2	17,4 ± 6,2	33,4 ± 3,5	0,21 ± 0,02
Группа с дефицитом магния	71,8 ± 1,5*	11,4 ± 0,9	28,2 ± 7,4*	134 ± 8,2*	0,39 ± 0,03*

* Статистически достоверные изменения ($p < 0,05$).

При электронно-микроскопическом исследовании эндотелия мелких артериол миокарда обнаружено истончение цитоплазмы эндотелиоцитов, наибольшая толщина отмечалась в области ядра, которая выступала в просвет капилляра. В цитоплазме отмечалось множество пиноцитозных везикул, а также просветление матрикса за счет отека. Ядра эндотелиоцитов имели неровные контуры, глубокие инвагинации ядерной оболочки. Глыбки

гетерохроматина распределялись по периферии ядра, а также в виде островков.

Гладкомышечные клетки мелких артериол располагались радиально. Их форма становилась неправильной. Форма ядра приближалась к округлой с неправильными очертаниями, увеличением количества нуклеоплазмы. В цитоплазме отмечалось просветление перинуклеарной области за счет внутриклеточного отека, в отдельных клетках увеличение количества митохондрий, уменьшение количества и смешение актиновых микрофиламентов на периферию клетки. Осмиофильные тельца располагались под плазмолеммой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у крыс с алиментарным дефицитом магния обнаруженные морфологические изменения свидетельствовали о развитии хронического воспаления в стенке кровеносных сосудов с последующим склерозированием и формированием мелкоочагового кардиосклероза, что в целом косвенно подтверждается данными Maier J., et al., 2004. Данный процесс сопровождался увеличением объемной плотности соединительнотканной стромы преимущественно вокруг кровеносных сосудов, что существенно ухудшает кровоснабжение миокарда и способствует, по мнению Malpuech-Brugere, (2004), развитию гипоксических повреждений сердечной мышцы. Кроме того, имелись ультраструктурные изменения со стороны эндотелия мышечных артерий и артериол, которые свидетельствуют о возможности возникновения эндотелиальной дисфункции. Выраженные изменения в гладкомышечных клетках артериол свидетельствуют о длительной вазоконстрикции, которая, возможно, способствует ишемическому повреждению миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bobkowski W., Nowak A., Durlach J. // *Magnes. Res.* — 2005. — № 1. — P. 35—52.
2. Ferre S., Mazur A., Maier J. A. M. // *Magnes. Res.* — 2007. — Vol. 20. — P. 66—71.
3. Maier J. A. M. // *Mol Aspects Med.* — 2003. — Vol. 24. — P. 137—146.
4. Maier Jeanette A. M., Malpuech-Brugere Corinne, Mazur Andrzej // *Biochimica et Biophysical Acta.* — 2004. — Vol. 1689. — P. 13—21.
5. Ueshima K. // *Magnes. Res.* — 2005. — № 4. — P. 275—284.
6. Wolf F. I., Trapani V., Simonacci M., et al. // *Magnes Res.* — 2008. — Vol. 21. — P. 58—64.
7. Yang Z. W., Gebrewold A., Novakowald M., et al. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2000. — № 278. — P. 628—639.
8. Yokoyama S., Gu J., Nishida H. I., et al. // *Magnes. Res.* — 1994. — № 7. — P. 97—105.