

ВЛИЯНИЕ КОРГЛИКОНА НА СТЕРЕОАРХИТЕКТониКУ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ МЕЛКООЧАГОВОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Резников К.М., Колесниченко П.Д.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации», Воронеж, e-mail: VRKMF@yandex.ru

При моделировании мелкоочагового инфаркта миокарда происходит трехмерная перестройка структуры кардиомиоцитов, особенно выраженная на 3-и сутки инфаркта. Увеличиваются различия в ширине саркомеров, которая может быть очень небольшой, вплоть до сближения Z-дисков вплотную (контрактура на уровне соседних саркомеров), или, наоборот, происходит их дилатация, которая характеризуется появлением промежутков между нитями актина. Митохондрии становятся на продольном срезе более округлыми, а в местах контрактур отсутствуют, перемещаясь в зоны гипердилатации саркомеров и в подсарколеммальное пространство. Введение сердечного гликозида коргликона в терапевтической дозировке значительно уменьшает выявленные изменения, что скорее всего связано с выравниванием активности натрий-калиевой АТФ-азы сарколеммы, и приводит к более равномерному потоку ионов кальция и более схожему сокращению саркомеров. При этом к 14-м суткам снижается интенсивность образования новых очагов некроза и происходит уменьшение объема некроза. Выравнивание активности АТФ-азы в зонах ее повышения приводит к стимуляции ее активности в тех зонах, где она была чрезмерно снижена, и нормализации переноса ионов натрия из клетки в этих же зонах, что соответственно приводит к уравниванию потоков ионов кальция, тем самым прекращаются явления, способствующие возникновению контрактур. Уменьшение образования контрактур приводит и зоны гипердилатации к снижению изменений структуры и локализации митохондрий, снимая явление пространственной разобщенности между местом образования энергии в митохондриях и ее использованием.

Ключевые слова: кардиомиоцит, ультраструктура, коргликон, саркомер, митохондрии.

INFLUENCE OF CORGLYCON ON THE STEREOARCHITECTONIC OF CARDIOMYOCYTES AT THE SMALL-SCALE INFARCTION OF MYOCARDIUM

Reznikov K.M., Kolesnichenko P.D.

Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, e-mail VRKMF@yandex.ru

In the modeling of small-focal myocardial infarction, there is a three-dimensional restructuring of the cardiomyocyte structure, which is especially pronounced on the third day of the infarction. Differences in the width of sarcomeres, which can be very small, are increasing, until the discs come close together (contracture at the level of neighboring sarcomeres) or, conversely, their dilatation occurs, which is characterized by the appearance of gaps between the threads of actin and myosin. The mitochondria become more rounded in the longitudinal section, and there are no contractures in the sites of the contractions, moving to the zones of hyperdilatation of the sarcomeres and into the subarachnolemal space. The introduction of cardiac glycoside at a therapeutic dosage significantly reduces the detected changes, which is most likely due to the equalization of sodium-potassium ATPase of the sarcolemma, resulting in a more even flow of calcium ions and a more uniform reduction in sarcomeres. This reduces the volume of necrosis. The alignment of the activity of ATPase in the zones of its increase leads to stimulation of its activity in those zones where it has been excessively decreased and normalization of the transfer of sodium ions from the cell in these zones, which accordingly leads to the balancing of calcium ion fluxes to sarcomeres, thereby stopping the phenomena leading to the appearance of contractures. Reducing the formation of contractures and hyperdilatation zones leads to a decrease in the structure and localization of mitochondria, removing the phenomenon of spatial disconnection between the place of energy formation in the mitochondria and its use.

Keywords: cardiomyocyte, ulrustructure, korglikon, sarcomere, mitochondria.

Поиск средств и способов коррекции нарушений при сердечной недостаточности диктует необходимость более полного понимания процессов, возникающих при нарушении сократительных свойств сердца, включая действие кардиотонических средств. Наиболее

детальное понимание нарушений сократительной деятельности и возникновения некрозов в сердце можно получить на основе исследования состояния кардиомиоцитов, особенно их контрактильного аппарата, а также состояния митохондриального аппарата клетки. Хорошо известные фармакологические свойства сердечных гликозидов позволяют при их использовании в условиях экспериментального мелкоочагового инфаркта миокарда установить возможные пути реализации лечебных эффектов создаваемых новых кардиотропных средств.

Цель исследования: экспериментально установить роль сократительных структур и состояния митохондрий кардиомиоцитов в процессе воспроизведения инфаркта миокарда и при введении в этих условиях кардиотонического средства.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 36 кроликах обоего пола массой 2800–3200 г, которые были распределены на 3 группы поровну: 1-я – контрольная, здоровые животные, 2-я – животные с мелкоочаговым инфарктом миокарда, 3-я – кролики с инфарктом миокарда, которым вводили ежедневно с третьих суток внутривенно сердечный гликозид коргликон в разовой дозе 0,15 мг. Для контроля функционального состояния сердца у всех животных записывали электрокардиограмму перед моделированием инфаркта миокарда, а также на 3-и, 7-е и 14-е сутки эксперимента. Мелкоочаговый инфаркт миокарда моделировали путем последовательного введения питуитрина и изопротеренола по специальной схеме в течение 2 суток [1]. Наблюдение проводили в течение 14 суток. Животных умерщвляли передозировкой хлороформа на 3-и, 7-е и 14-е сутки после начала моделирования патологии и в холодной (5°C) комнате извлекали сердца. Для патоморфологического исследования на светооптическом уровне брали кусочки ткани миокарда через всю толщину из стенок левого и правого желудочков, перегородки на уровне нижней трети сердца и из верхушки органа. Кусочки фиксировались в нейтральном формалине, заливались в парафин и после приготовления срезов окрашивались гематоксилином-эозином. Срезы просматривались в микроскопе в обычном и поляризованном свете. Ультраструктуру миокарда изучали методами обзорной электронной микроскопии. Материалом для исследования служили фрагменты миокарда передней стенки левого желудочка сердца. Ткань фиксировалась в 2,5%-ном растворе глютаральдегида на 0,2М-коллидиновом буфере (рН 7,4) с последующей дофиксацией в 1%-ном растворе 4-окси осмия и заливались в эпоксидную смолу ЭПОН-812. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом и просматривали в электронном микроскопе ВС-500 при увеличении 5000–30000. Эксперименты проведены с учетом рекомендаций [2].

Результаты исследования и их обсуждение

После воспроизведения мелкоочагового инфаркта миокарда выявляется снижение во все сроки исследования амплитуды зубца R электрокардиограммы на 19–30% ($p \leq 0,05$), которая несколько повышается на 14-е сутки введения коргликона. Одновременно в эти же сроки увеличивается длительность комплекса QRS на 14–27% ($p \leq 0,05$), а на 14-е сутки отмечается повышение амплитуды зубца T на 40% ($p \leq 0,05$). На 3-и сутки инфаркта миокарда удлиняется интервал P-Q на 23% ($p \leq 0,01$), но частота сокращений сердца уменьшается незначительно, она остается в пределах 254–295 ударов в минуту на протяжении всего исследования. При введении животным коргликона на фоне инфаркта миокарда выявляются удлинение интервала P-Q на 32–49% ($p \leq 0,05$) с 3-их по 14-е сутки наблюдения и урежение числа сокращений на 3-и, 7-е и 14-е сутки на 9–10% соответственно, а длительность комплекса QRS остается увеличенной в эти сроки на 27–31% ($p \leq 0,05$). Эти данные свидетельствуют о нарушении электрической активности сердца при воспроизведении инфаркта миокарда и о позитивном влиянии на эти процессы кардиотоника коргликона.

На 3-и сутки после начала воспроизведения инфаркта миокарда обнаруживается полнокровие артериол и венул субкардиального и среднего слоев левого желудочка и верхушки. Эндотелий сосудов частично отслоен, адвентициальный слой разрыхлен и утолщен. Окраска сарколеммы клеток эозином всех стенок сердца неравномерна, отмечаются гиперхромность ядер, исчезновение поперечной и продольной исчерченности. Крупные очаги некроза (массивы клеток) расположены в основном в субэндо- и субэпикардиальных слоях миокарда левого желудочка, межжелудочковой перегородки и верхушки сердца, а мелкие (группы клеток) множественные очаги некроза – в средних слоях тех же отделов. Все очаги некроза заполнены гистиоцитами. Крупные очаги некроза чаще всего треугольной формы, по размерам в некоторых случаях могут пронизывать всю толщину стенки левого желудочка, а мелкие – овальной или лентообразной формы. Очаги фуксинофилии соответствуют расположению некрозов. В поляризованном свете видны очаги миоцитолитического дисков А, расположенные чаще в среднем слое левого желудочка и межжелудочковой перегородке, а реже – в правом желудочке и верхушке сердца. По периферии некротических очагов отмечаются зоны сплошной анизотропии А-дисков. Вне зон некроза наблюдается чередование участков с пониженным и повышенным свечением А-дисков саркомеров.

На 7-е сутки инфаркта миокарда происходит появление новых мелких очагов некроза в средних слоях стенки желудочков сердца, одновременно отмечается фибрирование (заполнение фибробластами) субэндо- и субэпикардиальных некрозов. В поляризованном свете возле некротических очагов наблюдаются участки как с повышенной, так и с пониженной анизотропией А-дисков. На 14-е сутки инфаркта миокарда продолжается

фиброзирование очагов некроза, и только в средних слоях перегородки изредка встречаются инфильтраты (2–3 десятка гистиоцитов) овальной формы. Фиброзированные очаги некроза в средних слоях чаще треугольной формы или в виде лент, а в субэндо- и субэпикардальных слоях они имеют звездчатую форму. Обращают на себя внимание полнокровие мелких сосудов и увеличение просвета более крупных сосудов в верхушке сердца. Усиление анизотропии А-дисков отмечается только вблизи зон фиброзирования.

Наиболее характерными изменениями ультраструктуры кардиомиоцитов являются изменения сократительного аппарата: повышение контрактильности саркомеров или ее понижение. Повышение контрактильности, идентифицируемое по сближению Z-дисков, можно классифицировать по следующим признакам: по локализации в клетке; по степени укорочения; по количеству вовлеченных в этот процесс саркомеров. Оказалось, что контрактуры, т.е. тесное сближение Z-дисков друг с другом, могут располагаться вблизи вставочного диска с одной или двух сторон от него или же в средней части клетки. По степени сближения Z-дисков можно условно выделить 3 состояния: 1-я степень – отсутствие Н-полос и А-дисков, 2-я степень – наиболее близкое, но еще различимое сближение Z-дисков (патологическое сокращение), 3-я степень – состояние, когда невозможно различать отдельные Z-диски (необратимое состояние вследствие образования мостиков между нитями актина с двух сторон, препятствующих последующему расслаблению). В поляризованном свете они видны как сплошная анизотропия А-дисков.

По количеству контрактур на протяжении миофибрилл изменения можно подразделить на 3 типа: 2–4 саркомера – 1-й тип (этот тип, по 1–2 участка на срезе, встречается и у здоровых животных); 4–8 саркомеров – 2-й тип (средняя степень повреждения, не во всех случаях приводит к гибели кардиомиоцита); 3-й тип – 9 и более саркомеров (тяжелая степень повреждения, в большинстве случаев приводящая к гибели клетки).

В зависимости от количества контрактур и числа вовлеченных в них саркомеров может выявляться и различная степень противоположного явления – увеличения расстояния между Z-дисками расположенных рядом саркомеров: 1-я степень – максимальная ширина саркомеров со всеми их составными частями (полное физиологическое расслабление); 2-я степень – истончение и разрыв отдельных миофиламентов (фрагментарное поражение сократительного аппарата клетки); 3-я степень – наличие лишь отдельных участков миофиламентов возле Z-дисков, деструкция саркомеров на большом протяжении, разобщение отдельных саркомеров между собой (тяжелая степень поражения сократительного аппарата может привести к гибели клетки). Возможны различные сочетания контрактурных изменений и чрезмерного увеличения размеров саркомеров, которые и

создают основу функционального состояния сократительных клеток сердца на каждый момент их существования.

Хорошо известно зональное распределение митохондрий в клетках сердца: подсарколеммальные, межфибриллярные, околоядерные, поэтому изменения контрактильного аппарата кардиомиоцитов закономерно вызывают и изменения системы энергоснабжения клетки, поскольку происходят нарушения структуры и локализации митохондрий. При контрактурах 1-й и 2-й степени эти органеллы имеют более округлую форму, а из зон контрактур 3-й степени они перемещаются в миофибриллярные (участки гипердилатации) или подсарколеммальные пространства, где располагаются в виде скоплений. В этих очагах можно обнаружить органеллы с редуцированными кристами или процессами разрушения внешней мембраны. Вставочные диски извилисты, при наличии расположенных рядом контрактур их просвет увеличен. Эндотелиоциты капилляров имеют фестончатые края, микропиноцитоз в них снижен, они неплотно прилегают к кардиомиоцитам. К 7-м суткам инфаркта увеличивается количество мелких митохондрий с плотным матриксом. В крупных митохондриях отмечается лизис крист и наружных мембран. Наряду с усилением деструкции митохондрий между ними появляются большое количество гранул гликогена, очаговое возникновение контрактур и повышенной растянутости саркомеров, расширение цистерн Т-системы и элементов саркоплазматической сети. На 14-е сутки патологии не удается выявить новых проявлений активации некротических процессов.

Сердечные гликозиды можно применять при острой и хронической левожелудочковой недостаточности [3]. Кальций, необходимый для сопряжения процессов возбуждения и сокращения, высвобождается главным образом из связи с фосфолипидами плазмолеммы в фазу деполяризации и вновь захватывается ими. Фосфолипиды, связывающие кальций, являются частью молекулы натрий-калиевой АТФ-азы. Фиксация сердечного гликозида на белковой части фермента вызывает конформацию ее и фосфолипидов. Вследствие этого способность фосфолипидов связывать кальций, а также подвижность ионов кальция повышаются, что обеспечивает более эффективное его высвобождение при прохождении потенциала действия. Неравномерность активности АТФ-азы на протяжении всей сарколеммы кардиомиоцитов может изменяться при ишемии миокарда, что позволяет объяснить описанные нами выше изменения в саркомерах: если Ca^{++} быстро покидает актомиозиновый комплекс, то расслабление происходит быстро и конформация контрактильного аппарата не нарушается; если АТФ-аза не успевает вывести избыток натрия, то саркомер полностью не расслабляется, и при повторяющемся сокращении может возникать контрактура. В этих условиях сердечный гликозид путем

тормозного влияния на АТФ-азу в зонах ее высокой активности может оказать позитивное действие при инфаркте миокарда.

Коргликон вводили внутривенно ежедневно в течение 10 дней по 0,15 мг/кг, предварительно растворив в 0,85%-ном растворе натрия хлорида, из расчета 1 мл/кг. Введение коргликона не приводит к существенным изменениям электрокардиограммы при экспериментальном инфаркте миокарда.

При введении коргликона с лечебной целью отмечается некоторое уменьшение просвета субэндо- и субэпикардиальных артериальных сосудов стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки, венозные сосуды в этих зонах дилатированы. Наблюдаются типичная локализация и форма некротических очагов. В сохранившихся волокнах поперечная и продольная исчерченность почти полностью отсутствует. Отмечается полнокровие артериальных и венозных сосудов субэпикардиальных слоев стенки желудочков сердца. Происходит полное заполнение очагов некроза типичной локализации с четко очерченными краями соединительнотканными клетками. На 7-е и особенно на 14-е сутки наблюдения субэндо- и субэпикардиальные некрозы полностью заполнены фибробластами и гистиоцитами, т.е. проявляется ускорение фиброобразования некрозов. В поляризованном свете можно видеть в среднем слое всех отделов сердца территории сплошной анизотропии, чаще всего вблизи некротических зон. Кроме того, во всех слоях и отделах выявляются участки волокон со сниженным свечением анизотропных дисков. К 14-м суткам эксперимента отмечаются лишь более диффузное расположение гистиоцитарных инфильтратов и отсутствие мелких кровоизлияний.

При электронно-микроскопическом изучении ультратонких срезов миокарда кроликов, пролеченных коргликоном, отмечается примерно одинаковое расстояние между Z-дисками, в отличие от нелеченых животных. Митохондрии в цитоплазме располагаются неравномерно, чаще образуют скопления в межфибриллярных пространствах. В этих участках встречаются митохондрии с различной степенью повреждения крист, между ними часто обнаруживаются одноконтурные овальные образования, более мелкие, чем митохондрии и гранулы гликогена. При равномерном повышении контрактильности саркомеров не обнаруживаются выпячивания сарколеммы в межклеточные пространства. На 7-е сутки лечения сердечным гликозидом также отмечается более равномерное укорочение саркомеров, но оно сопровождается уже более выраженными выпячиваниями сарколеммы, заполненной гранулами гликогена и мелкими митохондриями, с редуцированными кристами и расширением пространств поперечной системы трубочек эндоплазматической сети. В тех клетках, где имеются более редко, чем у нелеченых животных, контрактуры, расположенные вблизи сарколеммы, происходит их выбухание в межклеточное пространство, а полости,

образуемые ими, заполнены полуразрушенными митохондриями. Обращает на себя внимание большое количество равномерно расположенных гранул гликогена. На 14-е сутки в клетках миокарда саркомеры укорочены равномерно, а митохондрии расположены между миофиламентами рядами, иногда в 2 слоя, их редкие скопления можно обнаружить лишь в околядерных и подсарколеммальных зонах.

Заключение

В экспериментах на кроликах показано, что при формировании мелкоочагового инфаркта миокарда происходит существенная перестройка трехмерности кардиомиоцитов. Если у здоровых животных в клетках сердца образуются одновременно 2–3 контрактуры саркомеров, что, по нашему мнению, является одним из механизмов внутриклеточного самовоспроизведения сократительных клеток сердца (физиологическая регенерация), то при внешних нежелательных воздействиях, например при воздействии питуитрина, суживающего сосуды сердца, и изопротеренола, усиливающего потребление кислорода, количество контрактур увеличивается до 9 и более. Такие контрактуры необратимы, и актомиозиновые комплексы резорбируются. Есть предположение, что уменьшение количества и выраженности контрактур может вызвать введение ивабрадина [4]. В рядом расположенных саркомерах, наоборот, происходит гипердилатация, вплоть до полного расхождения противоположно расположенных актиновых нитей, поэтому эти саркомеры тоже нежизнеспособны. Эти данные в определенной степени объясняют хорошо описанные сокращения миокарда в рамках трехмерных движений [5]. Возникновение значительных участков контрактур приводит к перемещению митохондрий в свободные пространства, т.е. происходит разобщение процессов образования и утилизации энергии. Кардиотоник коргликон, как известно, тормозит натрий-калиевую АТФ-азу сарколеммы, способствуя перераспределению ионов кальция, и тем самым улучшает сократительную деятельность сердца. По нашему мнению, сердечный гликозид в терапевтической дозе тормозит АТФ-азу только в участках ее увеличенной активности, выравнивая потоки кальция к актомиозиновым комплексам, но не действует там, где ее активность низка, поэтому постепенно уменьшается количество пространственно измененных саркомеров, что прерывает цепь трехмерных изменений кардиомиоцитов, и постепенно происходит восстановление работы сократительных элементов, улучшаются состояние и локализация митохондрий, т.е. возникает лечебный эффект. Если доза гликозида будет слишком высока, происходит тотальное торможение деятельности АТФ-азы, что проявляется в виде хорошо известного токсического действия сердечных гликозидов.

Список литературы

1. Резников К.М., Китаева Р.И. Способ моделирования мелкоочагового инфаркта миокарда. Авторское свидетельство №940208. РФ, 1983. Патентообладатель Воронежский государственный медицинский институт им.Н.Н. Бурденко.
2. Белозерова В.И., Драволина О.А., Тур М.А. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей / Под ред. Э.Э. Звартау. Изд.2-е. СПб., 2014. 80 с.
3. Энциклопедия лекарств. М.: «Веданта». 2012. 21 вып. (ред. Г.Л. Вышковский). С.623.
4. Канорский С.Н. Сравнительная оценка бета-адреноблокатора и ингибитора Jf – каналов у больных с хронической сердечной недостаточностью с сохраненной функцией выброса левого желудочка // Кардиология. 2016. Т.55, №2. С.24-29.
5. Обрезан А.Г., Баранов Д.З. Деформация миокарда у больных хронической сердечной недостаточностью // Кардиология. 2019. Т. 59(8). С. 88-96.