

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИОКАРДА КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОЙ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Корсиков Н.А.¹, Лепилов А.В.¹, Бобров И.П.¹, Долгатов А.Ю.¹, Долгатова Е.С.¹, Бабкина А.В.¹, Гервальд В.Я.¹, Бульбенко М.М.¹, Бычкунов В.А.¹, Чикменев А.В.¹, Лушникова Е.Л.², Бакарев М.А.²

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул, e-mail: nikkor94knaagmu@yandex.ru;

²ФГБНУ Институт молекулярной патологии и патоморфологии Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск

Целью данного исследования являлось изучение структурно-морфологической реорганизации миокарда крыс при однократной глубокой гипотермии в эксперименте. Эксперимент проведен на 20 крысах-самцах линии Wistar. Продолжительность эксперимента составила 14 суток. Гипотермия моделировалась путем погружения клеток с экспериментальными животными в емкости со средней температурой воды +5,0°C. Средняя температура окружающей среды (воздуха) была +7,0°C. Время погружения животных в среднем составляло 40 минут. При достижении ректальной температуры $\leq 20^\circ\text{C}$ животные изымались из емкостей. Животных выводили из эксперимента на 1-е, 2-е, 7-е и 14-е сутки. Животных контрольной группы (5 особей) помещали в воду температурой +30°C на такое же время нахождения в воде, как и крыс опытной группы. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином и методом ГОФП (по Lie). Сразу же после гипотермии (1-е сутки) в кардиомиоцитах отмечали миолиз, потерю исчерченности и пикноз ядер. При окраске по ГОФП наблюдались обширные поля фуксинофильного миокарда. На 2-й день эксперимента явления миолиза, утрата исчерченности и пикноз ядер мышечных клеток сохранялись, но явления фуксинофилии миокарда уменьшались. На 7-й день явления миолиза и число фиксифильных кардиомиоцитов продолжали уменьшаться, ядра выглядели увеличенными. На 14-й день явления миолиза исчезали, ядра уменьшались в размере, фуксинофилия отмечалась в единичных кардиомиоцитах. Таким образом, гипотермия как неблагоприятный фактор окружающей среды оказывает выраженное повреждающее действие на кардиомиоциты сердечной мышцы экспериментальных животных.

Ключевые слова: гипотермия, миокард, гипоксия, фуксинофилия.

SOME FEATURES OF THE STRUCTURAL AND MORPHOLOGICAL REORGANIZATION OF THE MYOCARDIUM OF RATS WITH A SINGLE DEEP HYPOTHERMIA IN THE EXPERIMENT

Korsikov N.A.¹, Lepilov A.V.¹, Bobrov I.P.¹, Dolgатов A.Yu.¹, Dolgatova E.S.¹, Babkina A.V.¹, Gerwald V.Ya.¹, Bulbenko M.M.¹, Bychkunov V.A.¹, Chikmenev A.V.¹, Lushnikova E.L.², Bakarev M.A.²

¹FGBOU VO «Altai State Medical University of the Ministry of Health of Russia», Barnaul, e-mail: nikkor94knaagmu@yandex.ru;

²FGBNU Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk

The purpose of this study was to study the structural and morphological reorganization of the rat myocardium during a single deep hypothermia in the experiment. The experiment was carried out on 20 male rats of the Wistar line. The duration of the experiment was 14 days. Hypothermia was modeled by immersing cells with experimental animals in containers with an average water temperature of + 5.0 °C. The average ambient (air) temperature was + 7.0°C. The immersion time of the animals averaged 40 minutes. When the rectal temperature reached $\leq 20^\circ\text{C}$, the animals were removed from the containers. Animals were taken out of the experiment on the 1st, 2nd, 7th and 14th days. Animals of the control group (5 individuals) were placed in water with a temperature of +30 degrees for the duration of the stay in the water of the rats of the experimental group. The preparations were stained with hematoxylin and eosin and by the GOFPP method (according to Lie). Immediately after hypothermia (day 1), cardiomyocytes showed myolysis, loss of striation, and pycnosis of the nuclei. When stained for GOFPP, extensive fields of fuchsinophilic myocardium were observed. On the second day of the experiment, the phenomena of myolysis, loss of striation and pycnosis of the nuclei of muscle cells persisted, but the phenomena of myocardial fuchsinophilia decreased. On the seventh day, the phenomena of myolysis and the number of fixinophilic cardiomyocytes continued to decrease, the nuclei looked enlarged. On the fourteenth day, the phenomena of

myolysis disappeared, the nuclei decreased in size, fuchsinophilia was noted in single cardiomyocytes. Thus, hypothermia, as an unfavorable factor in the surrounding section, has a pronounced damaging effect on the cardiomyocytes of the cardiac muscle of experimental animals.

Keywords: hypothermia, myocardium, hypoxia, fuchsinophilia.

Доля районов Севера в Российской Федерации составляет 70%, там проживают 11,7 млн человек [1]. В условиях Севера воздействие холода является мощным стрессорным фактором, он служит пусковым механизмом в развитии изменений метаболических процессов во всем организме, в том числе и в сердечной мышце [2]. В то же время активная индустриализация арктической зоны способствует активному изучению механизмов адаптации человека к холодovому фактору [3].

В основе приспособления человека к условиям внешней среды лежат физиологические, биохимические и социально-бытовые механизмы адаптации [4]. Скорость, темп и характер адаптивных реакций во многом зависят от состояния организма человека [5].

Воздействию на организм человека низких температур на современном этапе уделяется большое внимание [6], но данные исследования в большей мере посвящены изучению вопросов танатогенеза сочетанной патологии, когда выявляется действие на организм не только низкой температуры, но и действие иных физических и химических факторов (травм, отравлений) и соматическая патология.

Важнейшим методом оценки воздействия холодovого фактора на организм человека является морфологический метод [7, 8]. На данный момент изученные и представленные морфофункциональные изменения, возникающие при холодovомой травме, достаточно скудны, а большинство из них можно отнести к неспецифичным, встречающимся при смерти от разных причин, а, следовательно, их анализ в полной мере является весьма ограниченным. Серьезной проблемой представляется проведение дифференциальной диагностики, когда выявленные морфологические признаки не являются специфичными и могут встречаться и при других патологиях [9, 10].

Заслуживают внимания работы, посвященные структурным изменениям ядерного аппарата клеточных элементов и морфофункциональным изменениям тучноклеточной популяции при гипотермии [11]. Данные исследования доказывают отрицательное влияние низких температур на структуру ядра и тучные клетки, а морфологические параметры, полученные при исследовании, могут быть использованы как специфические и адаптивные.

В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных морфологии миокарда при гипотермии [12, 13, 14]. Поэтому исследование морфологических изменений миокарда при гипотермии актуально.

Цель исследования: изучить особенности структурно-морфофункциональной реорганизации кардиомиоцитов экспериментальных животных после воздействия глубокой однократной водной гипотермии.

Материалы и методы исследования

Для исследования были использованы 20 половозрелых крыс линии Wistar мужского пола. Средняя масса особи составила 200–250 г. Холодовой стресс моделировался в экспериментальных условиях путем помещения животных (15 особей) в отдельных клетках в емкости с водой на глубину 5 см. Средняя температура воды составляла +5,0°C, температура окружающего воздуха была +7,0°C. Время проведения эксперимента в среднем составляло 40±8 минут. Основным признаком достижения глубокой степени гипотермии являлось понижение ректальной температуры до +20... +23°C. Контрольную группу составляли 5 животных, которых помещали в воду температурой +30°C на время нахождения в воде опытной группы.

Использование экспериментальных животных осуществлялось в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, и директивами -86/609/ЕЕС. В целях гуманности и устранения влияния стресса на результаты исследования умерщвление и обезболивание проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Выведение животных из эксперимента происходило сразу после гипотермии, а также на 2-й, 7-й и 14-й день после эксперимента методом декапитации под действием эфирного наркоза. Извлечение внутренних органов осуществлялось единым органокомплексом. Для проведения дальнейших гистологических исследований забирались фрагменты ткани сердца размером 0,5 x 0,5 см. Фрагменты фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина в течение 24–48 часов. В дальнейшем фрагменты обрабатывали в автомате с последующей заливкой в парафин в станции парафиновой заливки. На роторном микротоме изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм. Окраска препаратов осуществлялась гематоксилин-эозином и с целью выявления ишемического повреждения миокарда гематоксилином – основным фуксином – пикроновой кислотой (ГОФП) (по J.T. Lie et al., 1971) [15]. Препараты изучали и фотографировали при помощи медико-биологического микроскопа Nikon Eclipse E200 с камерой цифровой специализированной DS 1000 при увеличении x400. При проведении морфометрического анализа кардиомиоцитов использовалась программа «Image Tool 3.0.». Статистическая обработка полученных данных осуществлялась при помощи программы «Statistica 10.0» и программы «MS Excel 2016». Для каждой из полученных величин высчитывали среднее (M) и ошибку среднего (m). Гипотезу о нормальности распределения вероятности данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность данных

оценивали с помощью параметрического критерия t-теста Стьюдента. Критическое значение уровня статистической значимости было равно 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Контрольная группа. Миокард был представлен группами кардиомиоцитов, формирующих пучки, расположенные плотно друг к другу. Кардиомиоциты были представлены в виде клеток, где на фоне эозинофильной цитоплазмы с отчетливо выраженным рисунком миофибрилл расположены палочковидные ядра, умеренно окрашенные гематоксилином. В строме располагались умеренно полнокровные сосуды. Подавляющее количество кардиомиоцитов имели два ядра небольших размеров (рис. 1а). Площадь ядер кардиомиоцитов составила $37,2 \pm 2$ мкм², периметр ядер – $27,3 \pm 0,8$ мкм, длина ядра составила $11,9 \pm 0,3$ мкм, ширина ядра – $3,9 \pm 0,1$ (табл. 1). При окраске на ишемические повреждения миокард имел желтоватую окраску, участков фуксинофилии обнаружено не было (рис. 1б).

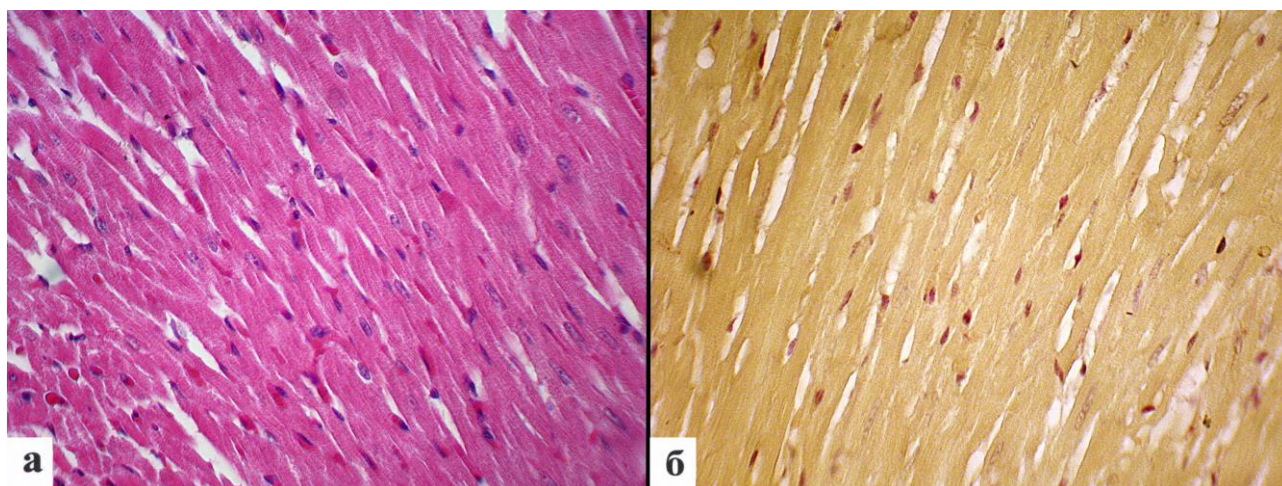


Рис. 1. Миокард крыс контрольной группы исследования: а – миокард представлен группами кардиомиоцитов, формирующих пучки, расположенные плотно друг к другу. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400; б – фуксинофильные кардиомиоциты отсутствуют, клетки сердца имеют желтоватую окраску. Окраска по ГОФП. Ув. x400

Таблица 1

Морфометрические параметры кардиомиоцитов крыс после проведения однократной глубокой водной гипотермии

Параметры	Контроль (I)	День эксперимента			
		Сразу после гипотермии (II)	2-й день (III)	7-й день (IV)	14-й день (V)
Площадь ядра (мкм ²)	37,2±2	22,2±1,3	29,5±1,5	45,3±1,2	28,1±0,9
Периметр ядра (мкм)	27,3±0,8	24,2±0,7	26,7±0,9	30,2±0,6	27,5±0,6

Длина ядра (мкм)	11,9±0,3	10,8±0,3	11,9±0,5	13,1±0,3	12,6±0,3
Ширина ядра (мкм)	3,9±0,1	2,6±0,1	3,1±0,09	4,4±0,1	2,8±0,1
Фуксинофильный миокард (%)	–	51,9±1,8	45,5±5,1	10,8±2,5	4,4±1,2

Примечание: для площади ядер $P_{I-II}, P_{III-V} < 0,0000001$; $P_{II-III} < 0,0006$. Для периметра ядер $P_{I-III} < 0,004$; $P_{III-IV} < 0,002$; $P_{IV-V} < 0,005$. Для длины ядра $P_{I-II} < 0,03$; $P_{II-IV} < 0,07$; $P_{IV-V} < 0,1$. Для ширины ядра $P_{I-II}, P_{III-V} < 0,0000001$. $P_{II-III} < 0,001$. Для фуксинофильного миокарда $P_{II-III} < 0,3$; $P_{III-IV} < 0,0002$; $P_{IV-V} < 0,05$.

Экспериментальная группа исследования. В ткани сердца сразу после воздействия однократной глубокой иммерсионной гипотермии наблюдаются выраженный отек и признаки миолиза кардиомиоцитов, формирование оптических пустот, потеря исчерченности и нечеткость границ мышечных волокон. Ядра мышечных волокон полиморфной формы, гиперхромные, пикнотичные (рис. 2а).

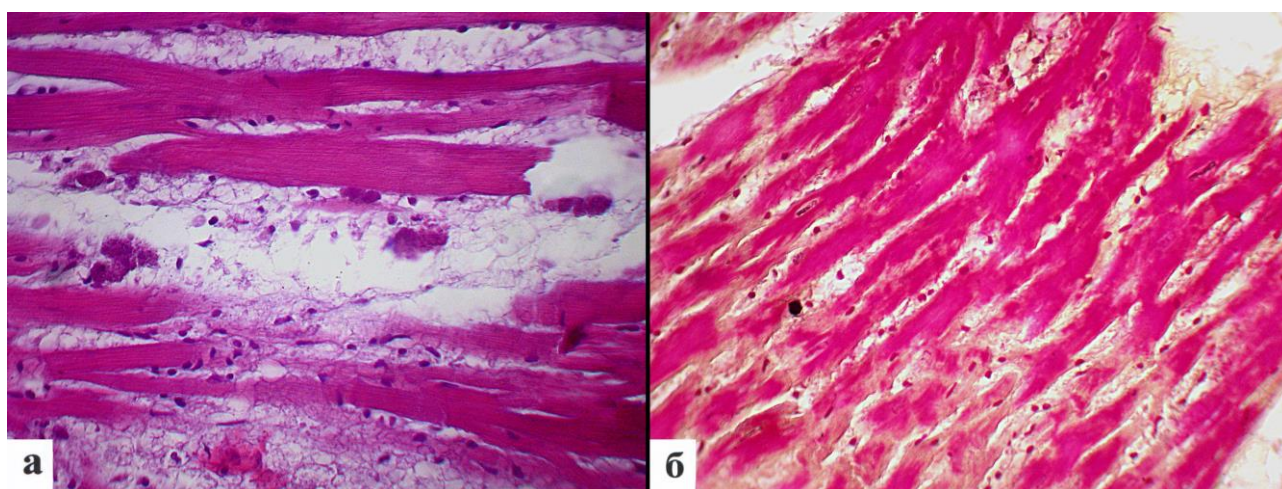


Рис. 2. Морфология миокарда крыс сразу после воздействия однократной глубокой иммерсионной гипотермии: а – выраженный отек и миолиз кардиомиоцитов, потеря исчерченности, нечеткость границ мышечных волокон, ядра пикнотичные. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400; б – крупные, сливающиеся между собой поля фуксинофильного миокарда. Окраска по ГОФП. Ув. х400

Площадь ядер кардиомиоцитов составила $22,2 \pm 1,3 \text{ мкм}^2$, периметр ядер – $24,2 \pm 0,7 \text{ мкм}$, длина ядра – $10,8 \pm 0,3 \text{ мкм}$, ширина ядра – $2,6 \pm 0,1 \text{ мкм}$ (табл. 1). При окраске ГОФП по Lie отмечали крупные, сливающиеся между собой поля фуксинофильного миокарда. Доля кардиомиоцитов в состоянии ишемии составила $51,9\% \pm 1,8$ (рис. 2б).

Строма вокруг пучков клеток имеет нечеткие границы, отмечаются признаки выраженного интерстициального отека. Выражены неравномерное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла, полнокровие капилляров и венул. Стенка артерий утолщена за счет отека и набухания.

На 2-е сутки постгипотермического периода ткань сердца выглядела умеренно отечной, явления миолиза, просветление цитоплазмы, утрата исчерченности, нечеткость границ

мышечных волокон сохранялись. Ядра кардиомиоцитов были с нечеткими границами, пикнотичные. Явления интерстициального отека уменьшались (рис. 3а). Площадь ядер кардиомиоцитов увеличивалась до $29,5 \pm 1,5$ мкм², периметр ядер возрастал до $26,7 \pm 0,9$ мкм, длина ядра составила $11,9 \pm 0,5$ мкм и ширина ядра была равна $3,1 \pm 0,09$ мкм (табл. 1). Окраска по ГОФП свидетельствовала об уменьшении ишемического повреждения кардиомиоцитов. Доля фуксинофильных кардиомиоцитов составила $45,5\% \pm 5,1$ (рис. 3б).

На 7-е сутки постгипотермического периода ткань миокарда находилась в состоянии умеренно выраженного отека. Явления миолиза и неравномерности просветления цитоплазмы уменьшались. Ядра мышечных волокон выглядели увеличенными (рис. 4а). Площадь ядер кардиомиоцитов составила $45,3 \pm 1,2$ мкм², периметр ядер – $30,2 \pm 0,6$ мкм, длина ядра – $13,1 \pm 0,3$ мкм, ширина ядра – $4,4 \pm 0,1$ мкм (табл. 1). Отмечалось дальнейшее уменьшение фуксинофилии кардиомиоцитов, доля фуксинофильных мышечных волокон составила $10,8\% \pm 2,5$ (рис. 4б).

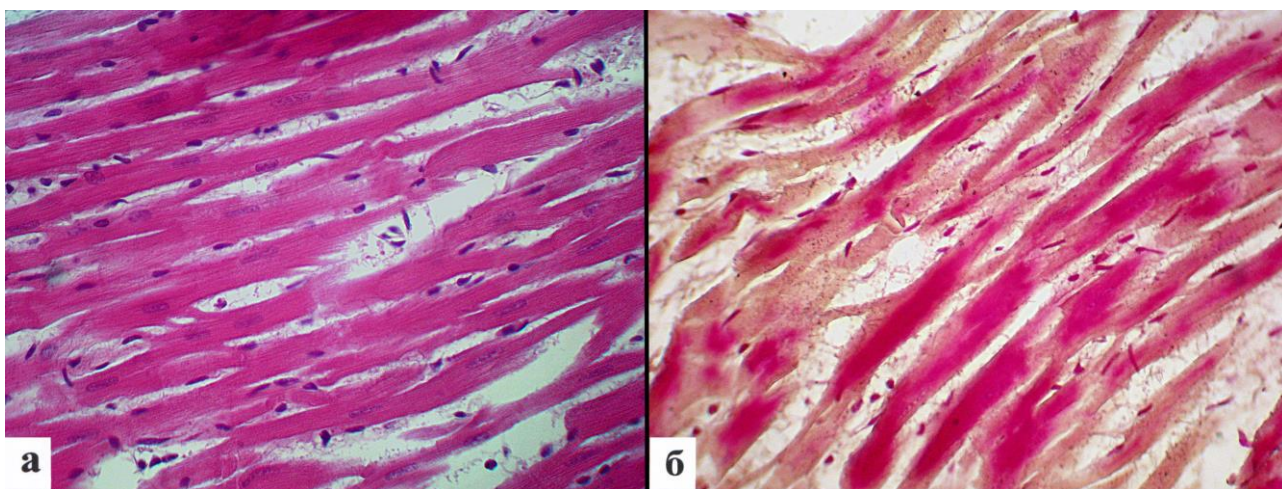


Рис. 3. Морфология миокарда крыс на 2-й день после однократной глубокой иммерсионной гипотермии: явления интерстициального отека уменьшаются.

Видна утрата исчерченности, ядра кардиомиоцитов пикнотичные. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$; число фуксинофильных мышечных волокон уменьшается. Окраска по ГОФП. Ув. $\times 400$

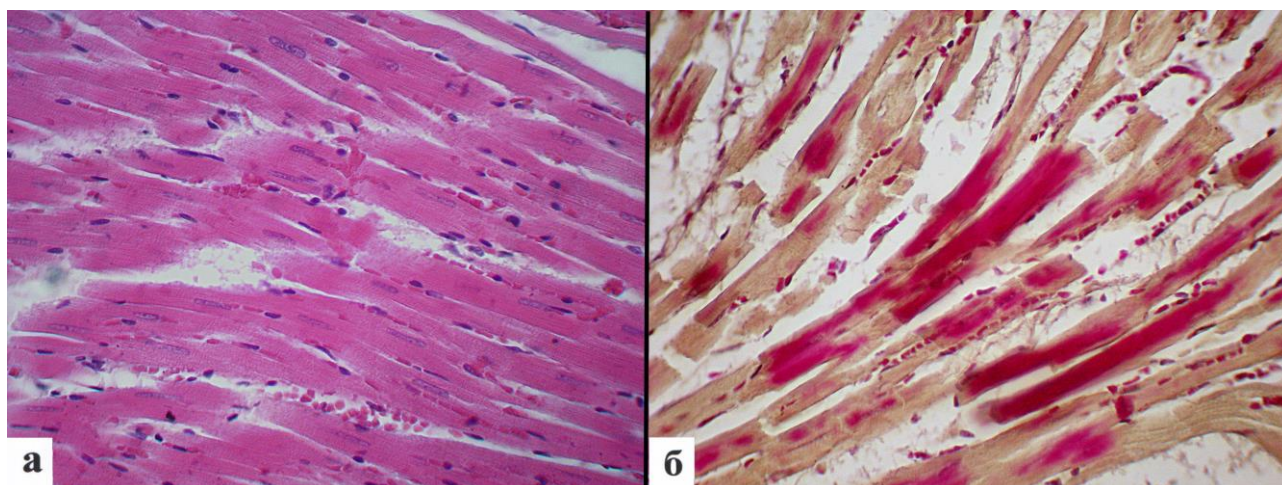


Рис. 4. Морфология миокарда крыс на 7-й день после однократной глубокой иммерсионной гипотермии: а – ткань миокарда в состоянии умеренно выраженного отека, явления миолиза и просветление цитоплазмы выражены слабо, ядра кардиомиоцитов увеличены.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400; б – уменьшение фуксинофилии кардиомиоцитов. Окраска по ГОФП. Ув. x400

На 14-е сутки после однократной водной глубокой гипотермии в миокарде явления отека были выражены слабо. Размеры ядер кардиомиоцитов по сравнению с предыдущим сроком имели тенденцию к уменьшению (рис. 5а). Площадь ядер составила $28,1 \pm 0,9$ мкм², периметр ядер – $27,5 \pm 0,6$ мкм, длина ядра – $12,6 \pm 0,3$ мкм, ширина ядра – $2,8 \pm 0,1$ мкм (табл. 1). При окрашивании по ГОФП была отмечена фуксинофилия отдельных мышечных волокон, доля фуксинофильных кардиомиоцитов составила $4,4 \pm 1,2$ (рис. 5а).

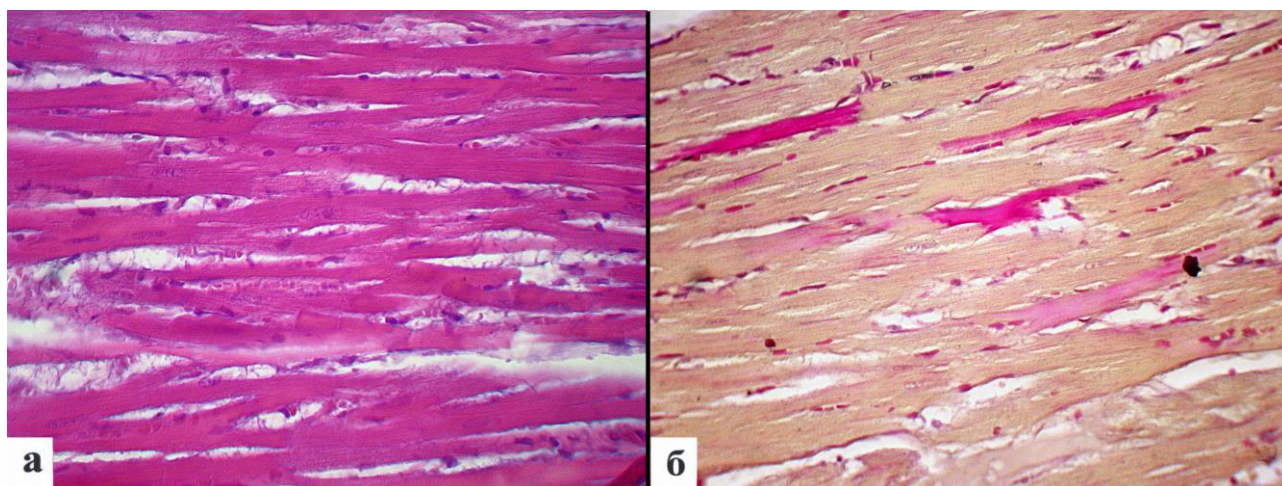


Рис. 5. Морфология миокарда крыс на 14-й день после однократной глубокой иммерсионной гипотермии: а – явления отека выражены слабо, размеры ядер кардиомиоцитов уменьшены. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400; б – мелкие очаги фуксинофилии мышечных волокон. Окраска по ГОФП. Ув. x400

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400; б – мелкие очаги фуксинофилии мышечных волокон. Окраска по ГОФП. Ув. x400

Заключение

В исследовании был проведен сравнительный анализ морфофункциональной реорганизации миокарда крыс после однократной водной глубокой гипотермии. Результаты исследования показали, что гипотермия как неблагоприятный физический фактор окружающей среды оказывала выраженное повреждающее действие на кардиомиоциты сердечной мышцы экспериментальных животных. При этом сразу после воздействия холодового фактора отмечали выраженные морфологические изменения стромы и ядер кардиомиоцитов крыс: сморщивание, кариопикноз, что может быть связано с повреждающим действием холода. Кариометрические измерения позволили обнаружить, что сразу после воздействия стрессового фактора площадь ядер кардиомиоцитов уменьшилась на 40%, периметр ядер кардиомиоцитов уменьшился на 12% и объемная доля кардиомиоцитов в состоянии ишемии достигала 51,9% по сравнению с контрольной группой. Выявленные изменения могут являться следствием метаболической депрессии миокарда, инактивации анаболических процессов, активации свободнорадикального окисления липидов и гипоксии. В постгипотермическом периоде ядра кардиомиоцитов увеличивались в размере, они были набухшие, светлые, число кардиомиоцитов в состоянии ишемии уменьшалось. На 7-й день постгипотермического периода морфометрические параметры ядер были наиболее высоки, что может быть объяснено адаптивной компенсаторно-приспособительной реакцией и активацией синтетических процессов в ядерном аппарате, число кардиомиоцитов в состоянии ишемии при этом уменьшалось в 4,8 раза и составило $10,8\% \pm 2,5$. На 14-й день эксперимента кариометрические показатели практически приходили к норме, кардиомиоциты с ишемическими повреждениями были единичны.

Результаты проведенного исследования подтверждают важность и практикоориентированность изучения морфологических изменений, происходящих в органах и тканях при холодовом стрессе. Системное изучение морфофункциональных особенностей реорганизации ткани в условиях холодовой травмы способствует более полному пониманию особенностей развития компенсаторно-приспособительных реакций, формирующихся на фоне гипотермического повреждения, определению наиболее четких критериев (морфологических признаков), подтверждающих смерть от переохлаждения.

Список литературы

1. Карпин В.А. Медицинская экология Севера: актуальность, достижения и перспективы (обзор литературы) // Экология человека. 2021. № 8. С. 4-11.

2. Заднипрятый И.В., Сатаева Т.П., Третьякова О.С. Патоморфологические изменения миокарда крыс при воздействии гипобарической холодовой гипоксии // Оперативная хирургия и клиническая анатомия. 2019. № 2. С. 13-18.
3. Грибанов А.В., Аникина Н.Ю., Гудков А.Б. Церебральный энергообмен как маркер адаптивных реакций человека в природно-климатических условиях Арктической зоны Российской Федерации // Экология человека. 2018. № 8. С. 32-40.
4. Салтыкова М.М. Физиологические механизмы адаптации к холоду // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2016. № 4. С. 5-12.
5. Бобров И.П., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Крючкова Н.Г., Бакарев М.А., Молодых О.П. Влияние среды охлаждения на плоидометрические параметры гепатоцитов белых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. № 2. С. 163-168.
6. Бобров И.П., Лепилов А.В., Крючкова Н.Г., Долгатов А.Ю., Гулдаева З.Н., Орлова О.В., Шепелева Н.В., Лушникова Е.Л., Бакарев М.А., Молодых О.П. Морфофункциональная характеристика ядер гепатоцитов печени крыс после воздействия гипотермии // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29375> (дата обращения: 02.08.2022).
7. Шигеев В.Б., Шигеев С.В., Колударова Е.М. Холодовая смерть. М., 2004. 184 с.
8. Витер В.И., Халиков А.А. Смерть от действия низкой температуры // Судебная медицина в лекциях. Уфа, 2003. С. 159-163.
9. Збруева Ю.В., Джувалыков П.Г., Букешов М.К., Богомоллов Д.В., Федулова Судебно-медицинская оценка танатогенеза при переживания механической и термической травмы // Судебно-медицинская экспертиза. 2012. № 5. С. 24-26.
10. Фролова И.А. Судебно-медицинская диагностика действия холодового фактора в случаях наступления смерти поступивших в стационаре // Судебная медицина. 2016. Т. 2. № 4. С. 18-20.
11. Бобров И.П., Лепилов А.В., Гулдаева З.Н., Долгатов А.Ю., Алымова Е.Е., Крючкова Н.Г., Лушникова Е.Л., Молодых О.П. Тучноклеточная инфильтрация легких крыс после гипотермии // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 1. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28446> (дата обращения: 02.08.2022).
12. Луценко М.Т., Луценко М.М., Шматок М.И. Повреждающее действие низких температур на миофибриллы кардиомиоцитов // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2013. Т. 48. С. 56-62.
13. Трофимова А.В., Чиж Н.А., Белочкина И.В., Волина В.В., Сандомирский Б.П. Морфологические характеристики сердца после индукции терапевтической гипотермии и

введения мезенхимальных стволовых клеток в терапии экспериментального инфаркта миокарда // Морфология. 2016. № 3. С. 288-292.

14. Бобров И.П., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Корсигов Н.А., Гулдаева З.Н., Крючкова Н.Г., Соседова М.Н., Долгатова Е.С., Лушникова Е.Л., Бакарев М.А. Тучные клетки миокарда при воздействии гипотермии // Современные проблемы науки и образования. 2021. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31160> (дата обращения: 02.08.2022).

15. Lie J.T., Holley K.E., Kampa W.R., Titus J.L. New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia. Mayo Clinic Proceedings. 1971. Vol. 46. P. 319-327.