



УДК: 591.3.615/078:616.152.21:616.12:611-018.11:59.082

## УЛЬТРАСТРУКТУРА МИОКАРДА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ГЕМИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

**И.В. ЗАДНИПРЯНЫЙ**  
**О.С. ТРЕТЬЯКОВА**  
**Т.П. САТАЕВА**

*Крымский государственный  
медицинский университет  
имени С.И. Георгиевского,  
г.Симферополь*

*e-mail: tanzcool@online.ua*

Целью данной работы явилось изучение ультраструктуры кардиомиоцитов новорожденных крысят в условиях хронической гемической гипоксии. Работа выполнена на 15 самках трехмесячных белых крыс линии Wistar, которым на протяжении всей беременности и в течение 3 дней после родов ежедневно внутрибрюшинно вводили нитрит натрия в дозе 5 мг/100 г веса. Забор материала проводился после достижения крысятами, которые вскармливались вышеуказанными самками, 3-дневного возраста. Было выявлено, что изменения ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда новорожденных крысят при хронической гемической гипоксии сопровождаются выраженным развитием митохондриальной дисфункции, которая структурно выражается в повреждении наружных мембран и лизисе крист митохондрий, а также подтверждается биохимическим дисбалансом, нарушением архитектоники сосудов, изменением структуры и очаговым лизисом миофибрилл.

Ключевые слова: гипоксия, нитриты, крысы, кардиомиоциты, новорожденные.

**Введение.** Проблема внутриутробной гипоксии плода по-прежнему является актуальной в перинатальной медицине. Особый интерес представляют последствия гипоксических состояний у детей, которые перенесли гипоксию в антенатальном периоде [2, 3, 5]. Антенатальная гипоксия приводит к замедлению роста капилляров органов и тканей, увеличивает их проницаемость, делает их более уязвимыми во время родов. При этом увеличивается проницаемость не только сосудистой ткани, но и собственно клеточных мембран, что может привести к выраженному ионному дисбалансу [1, 3, 5, 10]. Одной из причин антенатальной гипоксии является гипоксия различной этиологии, переживаемая непосредственно материнским организмом во время беременности [3, 7, 8]. Для изучения патогенеза антенатальной гипоксии используются различные экспериментальные модели внутриутробной гипоксии: содержание животных в гипобарической камере [6], в среде нейтрального азота, частичная перевязка преплацентарных сосудов [7]. Учитывая, что нитросоединения, загрязняющие среду обитания, играют значимую роль в развитии внутриутробной гипоксии и гипотрофии плода, а также обладают способностью проникать в материнское молоко, существует необходимость всестороннего изучения характера их воздействия на организм новорожденного [1, 8, 9].

В данной работе для экспериментального моделирования внутриутробной гипоксии был использован широко распространенный в современной среде обитания человека гипоксант – нитрит натрия [4]. Токсическое действие этого соединения связано с метгемоглинообразующим эффектом, развитием гемической и гистотоксической гипоксии, тяжесть которой определяется дозами нитрита натрия [6, 7]. Установлено, что метгемоглобинемия в два раза сильнее, по сравнению с простым падением уровня функционально активного кислорода, подавляет дыхательную функцию крови, поэтому превышение допустимых концентраций нитритов в естественных источниках поступления их в организм представляет определенную угрозу для потомства [1, 7].

**Целью** данной работы явилось изучение ультраструктуры кардиомиоцитов новорожденных крысят в условиях хронической гемической гипоксии.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 15 самках трехмесячных белых крыс линии Wistar массой 180-200 г. Беременность и подготовку к окоту проводили в соответствии с рекомендациями Ковалевского А.О. (1951). На протяжении всей беременности и в течение 3 дней после родов самкам ежедневно внутрибрюшинно вводили нитрит натрия в дозе 5 мг/100 г веса (доза, вызывающая гипоксию средней тяжести) [7]. После достижения 22-мя крысятами, которые вскармливались вышеуказанными самками, 3-дневного возраста под эфирным наркозом после проведения торако – и перикардотомии сердце вынималось и сразу же помещалось в кардиоплегический раствор (0,9% KCl при температуре 0° С), чем достигалась остановка сердца в диастолу. Разрез сердца проводился с учетом расположения магистральных путей проводя-

щей системы. Подготовка материала для ультрамикроскопического исследования проводилась по стандартной методике. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB (Швеция), красили толудиновым синим, контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом. Для определения проницаемости клеточных мембран при проводке материала в фосфатный буфер добавляли гидроокись лантана.

Содержание малонового диальдегида (МДА), как вторичного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ), определяли при помощи диагностических наборов ТБК-Агат по методике М. Mihara. Метод определения вторичных продуктов перекисного окисления липидов основан на реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой. Оптическую плотность измеряли при 535 и 570 нм на аппарате СФ-2000 [11].

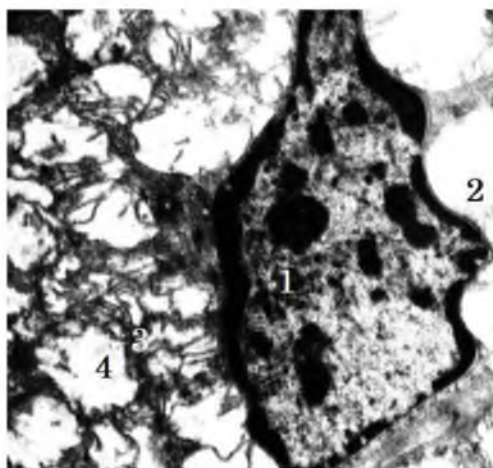
Цитохимические исследования включали в себя определение фермента сукцинатдегидрогеназы (СДГ) с помощью количественного метода по Нарциссову Р.П. [5].

Выведение крыс из опытов осуществлялось согласно положениям приказа МЗ РФ № 157 от 12.08.77 г под эфирным наркозом.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Электронно-микроскопическое исследование кардиомиоцитов новорожденных крысят выявило деструктивные и дистрофические нарушения, ведущим проявлением которых явилось нарушение типичной архитектоники митохондрий.

Наиболее выраженные изменения по литическому типу наблюдались в митохондриях, которые имели просветленный матрикс и многочисленные разрушенные кристы. В отдельных кардиомиоцитах наблюдалось полное разрушение митохондрий, остатки которых выявлялись лишь по периферии органелл. Значительное количество митохондрий имели разрушенные наружные мембраны. Выявлялась тенденция к слиянию митохондрий.

Наряду с этим, деструктивные процессы в кардиомиоцитах на ультраструктурном уровне проявлялись в исчезновении в их саркоплазме гранул гликогена, рибосом, редукцией комплекса Гольджи, деструкцией саркоплазматической мембраны, переходом большей части эухроматина в гетерохроматин. Ядерная мембрана большинства кардиомиоцитов образовывала выраженные остроконечные инвагинаты и содержала очаги лизиса. Перинуклеарные пространства были неравномерно расширены. Центральная область ядер, как и саркоплазма большинства кардиомиоцитов имела низкую электронную плотность, что свидетельствует о выраженном внутриклеточном отеке.



*Рис. 1.* Ультраструктура кардиомиоцита новорожденных крысят. Неравномерное распределение и конденсация ядерного хроматина (1), остроконечные инвагинаты (2), очаговый лизис (3), повреждение мембран и деструкция митохондрий (4). ТЭМ × 28000

Пучки миофибрилл были истончены и теряли параллельную ориентацию. Отмечался лизис миофибрилл и появление большого числа ригорных комплексов. Внутри миофибрилл, разрушенных митохондрий, а также в нуклеоплазме отмечалось накопление гранул  $La(OH)_3$ , что свидетельствовало о повышенной проницаемости и необратимом повреждении данных мембран.

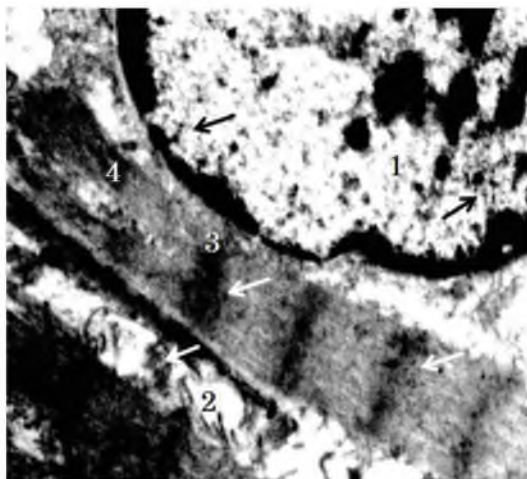


Рис. 2. Ультраструктура кардиомиоцита новорожденных крысят. Конденсация ядерного хроматина (1), очаговый лизис митохондрий (2), ригорные комплексы (3), разволокненность миофибрилл и нарушение структуры Z-дисков(4). Стрелками отмечены гранулы  $La(OH)_3$ . ТЭМ  $\times 26000$

Помимо этого, при гемической гипоксии наблюдаются патологические изменения архитектоники эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда. Ядра эндотелиоцитов кровеносных капилляров имели вытянутую форму. Ядерная мембрана образовывала большое количество глубоких инвагинаций. Конденсированный хроматин плотным кольцом концентрировался на ядерной мембране, образуя очаговые просветления в кариоплазме. Отмечалось набухание митохондрий, которые имели матрикс очень низкой электронной плотности. Кристы большинства митохондрий практически полностью разрушены, а наружные мембраны имели очаги лизиса. Гранулярный эндоплазматический ретикулум у значительного количества эндотелиальных клеток был подвергнут фрагментации, на его мембранах отсутствовали рибосомы. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи был редуцирован, цитоплазматическая мембрана сильно разрыхлена. В цитоплазме отростков эндотелиальных клеток отмечались микропиноцитозные пузырьки открытого, закрытого и смешанного типа (рис. 3).

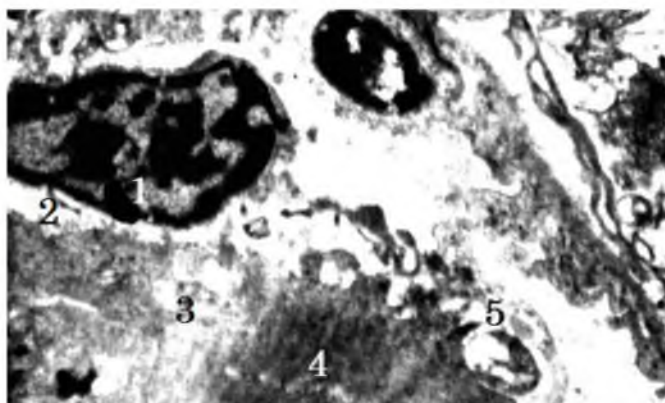


Рис. 3. Ультраструктура эндотелиальных клеток кровеносных капилляров миокарда новорожденных крысят. Конденсация хроматина (1), расширение перинуклеарного пространства (2) и перикапиллярного пространства, набухание митохондрий (3), множественные ригорные комплексы (4), пиноцитозные везикулы (5). ТЭМ  $\times 24000$

Изменения в виде конденсации хроматина ядер эндотелиоцитов, очаговой деструкции кариоплазмы, мембран митохондрий и цитоплазматической мембраны влекут за собой нарушения экстрацеллюлярного транспорта веществ и электролитов, что структурно проявляется снижением количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме отростков этих клеток.

Таким образом, хроническая гемическая гипоксия у новорожденных крысят сопровождается выраженным повреждением клеточных мембран, которая приводит к деструкции оргanelл как в кардиомиоцитах, так и в эндотелиоцитах кровеносных капилляров, а также отмечается разволокнением и локальным лизисом миофибрилл.

Исследование продуктов перекисного окисления липидов, в частности МДА в сыворотке крови, выявило его повышение в 3,2 раза по сравнению с нормой ( $8,73 \pm 0,27$  мкмоль/л при норме  $2,75 \pm 0,79$  мкмоль/л), что свидетельствует о повышении активности процессов перекисного окисления мембранных липидов, вызванных гидроксильными радикалами, ведущих к структурным изменениям клеточных и внутриклеточных мембран.

Доказано, что цитохимическое определение активности СДГ в лимфоцитах в мазке крови по восстановлению тетразолиевых красителей является информативным показателем уровня метаболизма в организме. В настоящее время лимфоциты рассматриваются не только как клетки специальной иммунной защиты, но и как элементы единой информационной системы, отражающей состояние митохондриальных функций всего организма. Определение активности СДГ лимфоцитов в ходе исследования выявило ее снижение до  $4,68 \pm 0,34$  ед. при норме –  $8,93 \pm 0,27$  ед., что свидетельствует о снижении интенсивности аэробных процессов.

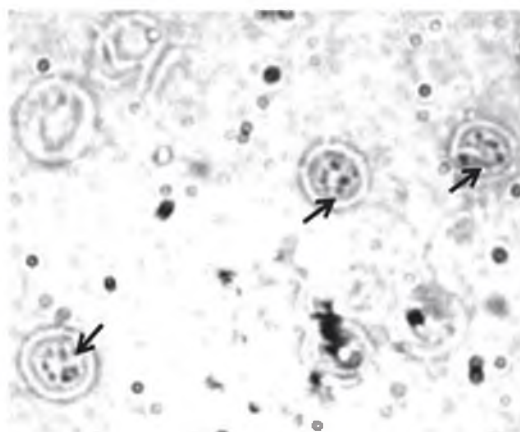


Рис. 4. Гранулы формазана в лимфоцитах периферической крови новорожденных крысят (отмечены стрелками). Ув. x 1000

**Выводы.** Таким образом, в ходе экспериментального исследования помимо ультраструктурных изменений кардиомиоцитов и эндотелиоцитов выявлены биохимические и цитохимические данные, подтверждающие развитие митохондриальной дисфункции.

Изменения ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда новорожденных крысят при хронической гемической гипоксии сопровождаются выраженным развитием митохондриальной дисфункции, которая структурно выражается в повреждении наружных мембран и лизисе крист митохондрий, а также подтверждается повышением уровня МДА в сыворотке крови и снижением активности СДГ лимфоцитов. Деструктивные процессы в органеллах кардиомиоцитов новорожденных крысят являются следствием их мембранного повреждения. Наиболее выраженные повреждения отмечаются в митохондриальных мембранах, а также сопровождаются нарушением структуры и очаговым лизисом миофибрилл. Нарушения в архитектонике эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда, такие как конденсация ядерного хроматина, очаговая деструкция ядерных, митохондриальных и цитоплазматических мембран влечёт за собой снижение активности трансцеллюлярного транспорта. Таким образом, гемическая гипоксия матери оказывает выраженное токсическое действие на миокард новорожденного.

### Литература

1. Абдурахманова, М. К. Влияние профессионального контакта с пестицидами на функцию фетоплацентарной системы / М. К. Абдурахманова, А. Э. Каспарова, Ф. М. Абдурахманов // Акушерство и гинекология. – 2003. – № 1. – С. 46-49.
2. Афанасьев, В. В. Отравление метгемоглобинообразователями. Клиническая токсикология детей и подростков / В. В. Афанасьев. – СПб.: Интермедика, 2003. – Ч. 2. – С. 240-249.
3. Кактурский, Л. В. Внезапная сердечная смерть: современное состояние проблемы / Л. В. Кактурский // Архив патологии. – 2005. – Т. 67. – № 3. – С. 8-11.
4. Нарциссов, Р. П. Применение пара-нитротетразолия фиолетового для количественного цитохимического определения дегидрогеназ лимфоцитов человека / Р. П. Нарциссов // Архив анат. – 1969. – № 5. – С. 85-91.
5. Покровский, В. А. Продовольственная безопасность России / В. А. Покровский, Е. Н. Беляев, В. А. Тутельян // Вестн. РАМН. – 2006. – № 1. – С. 9-12.



6. Третьякова, О. С. Вторинна мітохондріальна недостатність кардіоміоцитів як маркер енергетичної неспроможності міокарду за умов перинатальної гіпоксії / О. С. Третьякова, І. В. Задніпр'яний // Перинатол. та педіатрія. – 2002. – № 4. – С. 15-17.
7. Черкесова, Д. У. Экспериментальная модель внутриутробной нитритной гипоксии / Д. У. Черкесова, С. А. Омаров М. // Бюллетень. «Медицина. Наука и практика». ДНЦ РАМН. – 1995. – № 1. – С. 44-46.
8. Toxicity and persistence of low level PSB in adult Wistar rats, fetuses and young / F. D.Bacer [et al.] // Arch. Environ. Contam. and Toxicol. – 1997. – Vol. 5. – № 2. – P. 143-156.
9. Bobak, M. Pregnancy outcomes and outdoor air pollution: an ecological study in districts of the Czech Republic 1986-1988 / M. Bobak, D. A. Leon // Occup. Environ. Med. – 2006. – Vol. 56. – № 8. – P. 539-543.
10. Malhotra, R. Glucose uptake and glycolises reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes / R. Malhotra, F. C. Brosius // The Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274. – P. 12567-12575.
11. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, Uchiyama M. // Anal Biochem. 1978. – Vol. 86(1). – P. 271-278.

## ULTRASTRUCTURE OF NEWBORN RATS MYOCARDIUM IN TERMS OF CHRONIC HEMIC HYPOXIA

The aim of the research was to study the ultrastructure of neonatal rat cardiomyocytes in terms of chronic hemic hypoxia. In the experiment were involved 15 white females three-month rats Wistar which were daily intraperitoneally administered sodium nitrite at a dose of 5 mg/100 g body weight throughout the pregnancy and for three days after giving birth to pups. Myocardium was taken from the pups that were fed the by above females and reached age of 3 days. It was found out that changes in the ultrastructural organization of cardiomyocytes and endothelial cells of capillaries of the myocardium of newborn rats with chronic hemic hypoxia are accompanied by a very vivid the mitochondrial dysfunction which is structurally expressed in the outer membrane damage and lysis of cristae of mitochondria confirmed by biochemical disbalance. The most pronounced damage occurs in the mitochondrial membranes accompanied by destructive structural vascular changes and focal lysis of myofibrils.

Key words : hypoxia, nitrite, rats, cardiomyocytes, newborns .

**I.V. ZADNIPRYANY**  
**O.C. TRETYAKOVA**  
**T.P. SATAIEVA**

*Crimea State Medical University*

*e-mail: tanzcool@online.ua*