№ 3 - 2016 г.
14.00.00 медицинские науки
(14.03.00 Медико-биологические науки)

УДК 616.127-005.4-018-092.9

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МИОКАРДА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРОЙ ИШЕМИИ

Р. В. Скребов, С. В. Савченко, В. П. Новоселов, А. С. Морозова, В. А. Грицингер, К. И. Ершов

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Новосибирск)

Цель исследования: провести оценку патоморфологических изменений миокарда при различных вариантах экспериментального моделирования острой ишемии мышцы сердца. Моделирование острой ишемии миокарда проведено на 40 крысах-самцах, масса животных составила 180–200 г. Всего было 3 группы (2 опытных и 1 контрольная). В каждую из опытных групп входило 15 животных, в контрольную группу вошло 3 животных (7 животных погибли в процессе эксперимента). Животным, составлявшим 1-ю группу, однократно вводили подкожно адреналин из расчета 0,5 мл 0,1 % раствора на 100 г массы тела. Животным 2-й группы прошивали иглой участок миокарда в проекции расположения основного ствола левой венечной артерии, который располагался между ушком левого предсердия и легочным стволом. Введение адреналина вызывало образование острых очаговых повреждений кардиомиоцитов миокарда, особенно отчетливо выявляемых в субэндокардиальных отделах левого желудочка, выраженность которых возрастала по мере увеличения времени прошедшего с момента введения катехоламина. При полной окклюзии левой венечной артерии было отмечено развитие очага ишемического повреждения, захватывающего переднюю и часть боковой стенки левого желудочка с последующим развитием инфаркта миокарда. Экспериментальное моделирование на крысах с использованием двух различных методик позволяет рекомендовать их для практического использования с целью изучения гистологических особенностей мышцы сердца при острой ишемии.

Ключевые слова: эксперимент, миокард, ишемия, морфология

Скребов Роман Владимирович — аспирант кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: hmaoe@sudmed.info

Савченко Сергей Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий курсом ФПК и ППВ кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: dr.serg.62@yandex.ru

Новоселов Владимир Павлович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: sme@sibsme.ru

Морозова Алина Сергеевна — ассистент кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: alina2008200820@yandex.ru

Грицингер Валентина Александровна — ассистент кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Ершов Константин Игоревич — кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: dr.serg62@yandex.ru

---

Введение. Развитие важнейших общепатологических процессов в сердце связано, в первую очередь, с ишемией миокарда [1–4]. Для уточнения и понимания механизмов и морфогенеза ишемической болезни сердца большое значение имеет экспериментальное моделирование этой патологии на лабораторных животных [5–7]. Экспериментальное моделирование позволяет оценить морфодинамику изучаемого патологического процесса и использовать при этом современные информативные методы морфологического исследования, которые не всегда возможно применить при изучении аутопсийного материала [8, 9].

Основу выполненной работы составили различные варианты экспериментального моделирования острой ишемии миокарда с последующим морфологическим исследование мышцы сердца с использованием гистологической окраски срезов миокарда гематоксилином и эозином. Для оценки патоморфологических изменений, наряду со световой, использовалась поляризационная микроскопия неокрашенных депарафинированных срезов.

Цель исследования: провести оценку патоморфологических изменений миокарда при различных вариантах экспериментального моделирования острой ишемии мышцы сердца.

Материалы и методы. В качестве экспериментальных животных были использованы белые крысы линии «Вистар». Выбор крыс в качестве лабораторных животных связан с определенной рациональностью и удобством проведения экспериментального моделирования острой ишемии миокарда. Кроме того, морфологическая оценка развивающихся при различной патологии острых очаговых повреждений миокарда у крыс достаточно подробно исследована и описана в литературных источниках, что также является удобным для планирования и проведения эксперимента именно на этих лабораторных животных [8, 9].

Эксперименты по моделированию острой ишемии миокарда проведены на 40 крысах-самцах, масса животных составила 180–200 г. Всего было 3 группы (2 опытных и 1 контрольная). Животных содержали в стандартных условиях в виварии, в одной клетке по 5 особей, которые имели свободный доступ к воде.

Семь животных — 4 из первой группы и 3 из второй погибли в процессе выполнения эксперимента, поэтому в каждую из опытных групп вошло 15 животных, в контрольной

группе было 3 животных. Лабораторных животных содержали в стандартных условиях вивария при строгом соблюдении Международных правил биоэтики, предложенных международными организациями и ассоциациями, в том числе Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013).

На первом этапе эксперимента определяли массу животного для последующего расчета дозы хлоралгидрата, который с целью общего обезболивания вводили внутрибрюшинно из расчета 300 мг/кг веса [5]. После наступления общей анестезии животным выбривали переднюю поверхность груди, располагали на спине в стендовом устройстве для фиксации лапок. На этом этапе экспериментального моделирования оценивали сердечную деятельность с помощью электрокардиографии. Регистрация электрокардиограмм осуществлялась с помощью электрофизиологического комплекса Coulbourn Instruments LabLinc model V75-25A V72-25A, имеющего игольчатые электроды, которые накладывались в стандартных отведениях. Запись и обработка информации проводилась с помощью компьютерной программы LABVIEW 5.1. Электрокардиографический контроль выполняли перед экспериментальным моделированием, после его завершения, а также непосредственно перед выводом животного из эксперимента.

Для формирования острых очаговых метаболических повреждений миокарда в соответствии с имеющимися по этой экспериментальной модели данными 19-ти животным, составляющим 1-ю группу, однократно вводили подкожно адреналин из расчета 0,5 мл 0,1 % раствора на 100 г массы тела. Из 15-ти животных по 1-й крысе прожили 10, 20, 30 и 45 минут. Остальные 15 животных были выведены из эксперимента через 3, 6, 12 и 24 часа (по 3 животных в первых двух временных интервалах и 2 — в последнем интервале).

У животных 2-й экспериментальной группы острую ишемию миокарда осуществляли в ходе эксперимента, который начинали с рассечения кожи левее срединной линии тела по условной среднеключичной линии, затем грудных мышц с обнажением реберных дуг и межреберных мышц; производили рассечение межреберных мышц в 4–5-м межреберье на протяжении 1 см. У крыс развивался левосторонний пневмоторакс, поэтому осуществляли искусственную вентиляцию легких при помощи груши по типу Амбу, соединенной с раструбообразной маской. При вхождении в грудную полость аккуратно вскрывали перикард по левой боковой поверхности органа для исключения образования правостороннего пневмоторакса, так как в ряде случаев при манипуляциях с сердцем возможно было повреждение тонкого межплеврального листка, соединенного с перикардом. На следующем этапе эксперимента осуществляли отведение ватным тампоном вверх и кнаружи ушка левого предсердия и прошивали иглой участок миокарда в проекции расположения основного ствола левой венечной артерии, который располагался между ушком левого предсердия и легочным стволом.

После выполнения окклюзии левой венечной артерии оперативно ушивали стенку грудной клетки. При этом перед наложением последнего шва на грудную стенку путем активного сдавливания грудной клетки в боковых направлениях дренировали воздух из левой грудной полости с его последующим дополнительным удалением путем пунктирования шприцем. После эксперимента на хвост крысы наносили маркировку, животных помещали в отдельные клетки с кормом и водой.

В процессе проведения экспериментального моделирования 3 животных погибло, одно — по причине кровотечения из области ушка левого предсердия в момент прошивания и наложения лигатуры, у двух других животных после манипуляций в грудной полости

возникло стойкое апноэ. Остальные 15 животных были выведены из эксперимента через 1, 3, 6, 12 и 24 часа (по 3 животных в каждом временном интервале).

У выведенных из эксперимента животных 2-х опытных групп и крыс контрольной группы вскрывали грудную и брюшную полости, осматривали все внутренние органы, отсекали сердце, которое еще сокращалось, и помещали его в чашку Петри со льдом для предотвращения фибрилляции до момента завершения последних сокращений.

По полученному материалу экспериментальных животных проведены гистологические исследования, для этого сердца фиксировали в 10 % забуференном формалине (Biovitrum, Россия) в течение 24 часов. После завершения фиксации сердце рассекали во фронтальной плоскости на 3 части, вырезали фрагменты толщиной около 5 мм. Затем производили стандартную проводку материала в гистопроцессоре (STP-200, Leica). На ротационном микротоме из заключенных в парафин образцов изготавливали срезы толщиной около 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

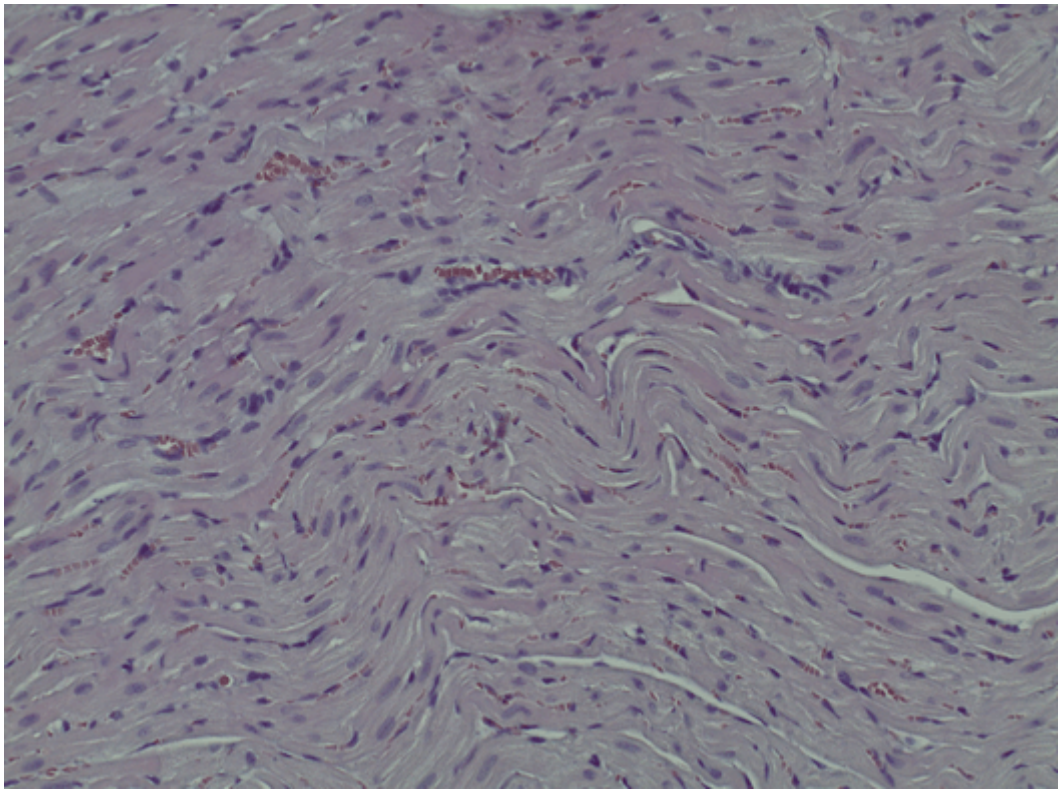
Результаты исследования и их обсуждение. При вскрытии животных 1-й группы макроскопических изменений сердца не отмечали. При вскрытии животных 2-й группы обращали внимание на выраженные макроскопические изменения сердца. Уже через 1 час просматривались изменения окраски миокарда по передней поверхности левого желудочка в виде отечного бледного очага с нечеткими контурами. Через 12 часов на передней поверхности левого желудочка просматривался бледный, отечный очаг, захватывающий почти всю переднюю поверхность левого желудочка и часть левой боковой стенки, с нечеткими, но вполне просматривающимися контурами.

При микроскопии материала на первом этапе оценивали структуру миокарда на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Миокард животных контрольной группы сохранял характерное гистологическое строение, кардиомиоциты имели равномерную окраску цитоплазмы и ядер, в ряде полей зрения отмечали признаки начавшейся фрагментации отдельных групп мышечных клеток и неравномерное кровенаполнение сосудов.

При оценке состояния структуры срезов миокарда, окрашенных гемотоксилином и эозином, через 1 час с момента окклюзии во всех наблюдениях в строме отмечался отчетливо просматриваемый умеренно выраженный межмышечный отек в сочетании с острыми расстройствами кровообращения в виде сладжирования эритроцитов в сосудах микроциркуляторного русла. Мелкие артерии находились в состоянии спазма, вены были расширенными, полнокровными. В ряде сосудов отмечали штифтиковое вытягивание эндотелиоцитов. Основная часть миокардиальных клеток сохраняла нормальную структуру, в отдельных полях зрения были умеренно выраженные признаки метахромазии.

Через 3 часа с момента окклюзии морфология срезов, окрашенных гемотоксилином и эозином, характеризовалась нарастанием признаков расстройств кровообращения, выраженными явлениями сладжирования в сосудах микроциркуляторного русла, а также в мелких артериях и венах. В артериях на фоне сладжирования отмечали начавшуюся сепарацию плазмы. По мере нарастания ишемии миокарда после окклюзии левой венечной артерии в течение 3 часов можно было отметить появление более выраженного периваскулярного отека. Спастические изменения сосудов артериального русла сменялись парезом, при этом сохранялось полнокровие вен. По сравнению с патоморфологическими изменениями предыдущей группы отмечалась более выраженная волнообразная деформация мышечных волокон.

При ишемии миокарда, достигшей 6 часов, прогрессировали острые расстройства кровообращения с явлениями сладжирования в мелких артериях, венах, а также в сосудах микроциркуляторного русла. Отчетливо просматривалось отечное расширение периваскулярных пространств. В различных полях зрения был выявлен отек стенок интрамуральных артерий, при этом большая часть артерий находилась в состоянии пареза, вены были расширенными, полнокровными. Отмечали набухание кардиомиоцитов в сочетании с неравномерной окрашенностью цитоплазмы (см. рис.).



Острые расстройства кровообращения, неравномерно выраженное набухание кардиомиоцитов, волнообразные изменения мышечных волокон, отек стромы миокарда левого желудочка через 6 часов после окклюзии левой венечной артерии. Окр. гемотоксилином и эозином. Ув. ×200.

Острая ишемия миокарда в течение 12 часов сопровождалась еще большими расстройствами кровообращения, нарастал отек стромы и периваскулярных пространств. При поляризационной микроскопии выявляли большое количество контрактурных повреждений кардиомиоцитов. Наряду с контрактурами первой и второй степени наблюдали контрактуры третьей степени, в этих случаях изотропные диски отсутствовали, а сближение анизотропные дисков сердечных миоцитов достигало того уровня, когда они сливались в сплошной светящийся конгломерат.

При продолжительности острой ишемии 24 часа клеточные ядра у кардиомиоцитов отсутствовали, наблюдался глыбчатый распад кардиомиоцитов, который при поляризационной микроскопии был представлен множественными мелкими глыбками анизотропной субстанции, которые хаотично чередовались с участками цитоплазмы, лишенными анизотропии. В части клеток цитоплазма была лишена исчерченности, прилегающие к ним мелкие участки ее сохраняли, что характерно для внутриклеточного миоцитолизиса. Наряду с описанными очаговыми повреждениями кардиомиоцитов встречались множественные контрактуры III степени. В этих случаях анизотропные диски сливались в светящийся конгломерат при отсутствии изотропных дисков.

При световой микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечали множественные кровоизлияния из различимых эритроцитов в сочетании с единичными очагами выпадения фибриновых масс. Выявлена диффузная лейкоцитарная инфильтрация. Сосуды микроциркуляторного русла находились в состоянии пареза, в отдельных сосудах отмечалась сепарация плазмы. Перифокально отмечали выраженную волнообразную деформацию с участками релаксации и пересокращения мышечных волокон в сочетании с выраженным отеком стромы миокарда.

В отличие от изменений миокарда, выявленных при исследовании срезов мышцы сердца животных второй группы, при катехоламиновых повреждениях было отмечено образование острых очаговых повреждений кардиомиоцитов миокарда, которые носили мозаичный характер и особенно отчетливо просматривались в субэндокардиальных отделах левого желудочка. Выраженность гистологических изменений, обусловленных острой ишемией миокарда при исследовании срезов обеих групп, возрастала по мере увеличения времени, прошедшего с момента моделирования этого вида патологии.

Заключение. Введение адреналина вызывало образование острых очаговых повреждений кардиомиоцитов миокарда, особенно отчетливо выявляемых в субэндокардиальных отделах левого желудочка, выраженность которых возрастала по мере увеличения времени, прошедшего с момента введения катехоламина. При полной окклюзии левой венечной артерии было отмечено развитие очага ишемического повреждения, захватывающего переднюю и часть боковой стенки левого желудочка с последующим развитием инфаркта миокарда. Экспериментальное моделирование на крысах с использованием двух различных методик позволяет рекомендовать их для практического использования с целью изучения гистологических особенностей мышцы сердца при острой ишемии.

Список литературы

1. Кактурский Л. В. Клиническая морфология острого коронарного синдрома / Л. В. Кактурский // Архив патологии. — 2007. — Т. 69, № 4. — С. 16–19.
2. Рыбакова М. Г. Морфологическая диагностика острого коронарного синдрома / М. Г. Рыбакова, И. А. Кузнецова, И. А. Порсуков // Вестник педиатрической академии. — 2007. — № 7. — С. 87–89.
3. Rubin E. Pathology / E. Rubin, J. L. Farber. — Philadelphia-New York : Lippincott-Raven Publishers, 1999. — P. 577–581.
4. Савченко С. В. Патоморфологические исследования в судебно-медицинской практике на современном этапе / С. В. Савченко // Вестник судебной медицины. — 2015. — Т. 4, № 2. — С. 21–24.
5. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo / D. L. Sterling, J. D. Thornton, A. Swafford [et al.] // Circulation. — 1993. — Vol. 88. — P. 1931— 1936.
6. Модификация метода ишемии/реперфузии миокарда [Электронный ресурс] / К. И. Ершов, А. В. Ноговицин, М. А. Галунская, А. А. Серяпина, К. В. Егорова, К. И. Бахарева // Медицина и образование в Сибири : сетевое научное издание. — 2014. — № 3. — Режим доступа : (http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1411_). — Дата обращения : 14.06.2016.
7. Непомнящих Л. М. Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце / Л. М. Непомнящих. — Новосибирск : Наука, 1991. — 349 с.
8. A new technique of coronary artery ligation : experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality / Jian Ye, Luojia Yang, Rajat Sethi [et al.] // Mol. Cell. Biochem. — 1997. — Vol. 176. — P. 227–233.

9. Гистологическая оценка межклеточных контактов кардиомиоцитов при ишемии миокарда / С. В. Савченко, В. П. Новоселов, А. С. Морозова, Р. В. Скребов, В. А. Грицингер, Т. А. Агеева, Е. И. Воронина, К. И. Ершов // Вестник судебной медицины. — 2016. — Т. 5, № 3. — С. 26–29.

HISTOLOGICAL ASSESSMENT OF MYOCARDIUM AT VARIOUS OPTIONS OF EXPERIMENTAL MODELLING OF ACUTE ISCHEMIA

R. V. Skrebov, S. V. Savchenko, V. P. Novoselov, A. S. Morozova, V. A. Gritsinger, K. I. Yershov

FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University» of the Ministry of Health of Russia (Novosibirsk)

The research objective: to carry out assessment of pathomorphologic changes of myocardium at various options of experimental modeling of acute ischemia of muscle of the heart. Modeling of acute ischemia of myocardium is carried out on 40 rats males, mass of animals was 180–200 g. There were 3 groups (2 experience and 1 control). 15 animals were each of experienced groups, 3 animals were in control group (7 animals during the experiment). The animal of the 1st group were once administered subcutaneously an adrenaline at the rate of 0,5 ml of 0.1% of solution for 100 g of body weight. An animal of the 2nd group the site of myocardium was stitched with a needle in a projection of locating of the main trunk of the left coronal artery which is situated between left atrial appendage and a pulmonary trunk. Administration of adrenaline caused formation of acute focal damages of the cardiomyocytes of myocardium which are especially clearly revealed in subendocardial departments of left ventricle which expression increased in process of augmentation of time elapsed after introduction of catecholamin. The development of the center of the ischemic damage occupying a frontal and a part of a sidewall of a left ventricle with the subsequent development of myocardial infarction was registered at a full occlusion of the left coronal artery. Experimental modeling on rats with usage of two various techniques allows recommending them for practical usage for the purpose of studying of histological features of a muscle of heart at acute ischemia.

***Keywords**:* experiment, myocardium, morphology, ischemia.

About authors:

Skrebov Roman Vladimirovich — post-graduate student of forensic medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University», e-mail: hmaoe@sudmed.info

Savchenko Sergey Vladimirovich — doctor of medical science, professor, head of course of FAT & PDD of forensic medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University», e-mail: dr.serg.62@yandex.ru

Novoselov Vladimir Pavlovich — doctor of medical science, professor, head of forensic medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University», e-mail: sme@sibsme.ru

Morozova Alina Sergeyevna — assistant of forensic medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University», e-mail: alina2008200820@yandex.ru

Gritsinger Valentina Aleksandrovna — assistant of forensic medicine chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University», e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Yershov Konstantin Igorevich — candidate of biological science, assistant professor of pharmacology chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University», e-mail: dr.serg62@yandex.ru

List of the Literature:

1. Kaktursky L. B. Clinical morphology of n acute coronary syndrome / L. B. Kaktursky // Archive of pathology. — 2007. — Vol. 69, N 4. — P. 16–19.
2. Rybakova M. G. Morphological diagnostics of acute coronary syndrome / M. G. Rybakova, I. A. Kuznetsov, I. A. Porsukov // Messenger of pediatric academy. — 2007. — N 7. — P. 87–89.
3. Rubin E. Pathology / E. Rubin, J. L. Farber. — Philadelphia-New York : Lippincott-Raven Publishers, 1999. — P. 577–581.
4. Savchenko S. V. Pathomorphologic researches in medicolegal practice at the present stage / S. V. Savchenko // Messenger of forensic medicine. — 2015. — Vol. 4, N 2. — P. 21–24.
5. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo / D. L. Sterling, J. D. Thornton, A. Swafford [et al.] // Circulation. — 1993. — Vol. 88. — P. 1931–1936.
6. Modification of method of ischemia / reperfusion of myocardium [electron resource] / K. I. Yershov, A. V. Nogovitsin, M. A. Galunskaya, A. A. Seryapina, K. V. Egorova, K. I. Bakhareva // Medicine and education in Siberia : online scientific publication. — 2014. — N 3. — Access mode : (http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1411). — Access date : 14.06.2016.
7. Nepomnyashchy L. M. Morphgenesis of the major all-pathological processes in heart / L. M. Nepomnyashchy. — Novosibirsk : Science, 1991. — 349 p.
8. A new technique of coronary artery ligation : experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality / Jian Ye, Luojia Yang, Rajat Sethi [et al.] // Mol. Cell. Biochem. — 1997. — Vol. 176. — P. 227–233.
9. Histological assessment of intercellular contacts of cardiomyocytes at myocardium ischemia / S. V. Savchenko, V. P. Novoselov, A. S. Morozova, R. V. Skrebov, V. A. Gritsinger, T. A. Ageeva, E. I. Voronina, K. I. Ershov // Messenger of forensic medicine. — 2016. — Vol. 5, N 3. — P. 26–29.