

В.П. Новоселов¹, С.В. Савченко¹, Д.А. Кошляк² и М.В. Воронковская¹

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРОЕНИЯ МИОКАРДА ПРИ УШИБЕ СЕРДЦА

¹ Новосибирское областное бюро судебно-медицинской экспертизы (нач. — проф. В.П. Новоселов); кафедра судебной медицины (зав. — проф. В.П. Новоселов) Новосибирского государственного медицинского университета; ² отделение судебно-медицинской экспертизы 80 (нач. — Е.Ю. Мальнина) Государственного центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз СибВО, г. Новосибирск, e-mail: sme@sibsme.ru

На крысах линии Вистар проведено экспериментальное моделирование ушиба сердца, сопровождавшегося развитием фибрилляции желудочков, с электрокардиографическим и последующим гистологическим и гистохимическим исследованием образцов миокарда. После ушиба сердца в миокарде отмечены острые расстройства кровообращения, фрагментация мышечных волокон, пересокращение или расслабление кардиомиоцитов. Выявлено также повышение суммарного и внутриклеточного содержания ионов кальция в миокарде. Предполагается, что механизм развития фибрилляции желудочков при ушибе сердца связан с повышением содержания кальция как в кардиомиоцитах, так и в межклеточном пространстве, приводящим к некоординированным сердечным сокращениям.

Ключевые слова: сердце, миокард, внутриклеточный Ca^{2+} , суммарный Ca^{2+} , ушиб.

Уточнение механизмов развития острой сердечной недостаточности — одна из актуальных проблем современной клинической медицины [1]. В настоящее время описаны два основных механизма развития сердечной недостаточности, которые определяются характером морфологических изменений кардиомиоцитов (КМ): в одних случаях острых альтеративных, в других — регенераторно-пластических [3, 6, 10–12]. Острая альтеративная недостаточность развивается в результате воздействия преимущественно экзогенных факторов — механического, гипоксического или токсического воздействия, а нередко их сочетания [6]. В этом случае КМ временно или окончательно утрачивают способность к сократительной деятельности. Сердечная недостаточность, не связанная напрямую с повреждением внутриклеточных структур, но обусловленная нарушением их воспроизводства, т.е. нарушением пластических процессов в сердце, когда изменения в миокарде имеют диффузный характер и проявляются снижением сократительной способности КМ, принято относить к регенераторно-пластической. Данные исследований этого вопроса достаточно подробно представлены в литературе [1, 3, 4, 6, 7, 10–12].

Учитывая, что вопросам морфологического обоснования механизмов острой сократительной недостаточности миокарда, согласно данным литературы, уделено недостаточно внимания, нам представилось целесообразным провести исследование, позволяющее уточнить механизм развития фибрилляции желудочков, как причины остановки сердца, в результате остро возникшей сократи-

тельной недостаточности миокарда. С этой целью мы осуществили экспериментальное моделирование ушиба сердца, сопровождавшегося развитием острой сократительной недостаточности миокарда и фибрилляции желудочков.

Материал и методы. Экспериментальное моделирование ушиба сердца было проведено в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Подопытную группу составили 25 белых крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г, содержавшихся в условиях вивария на стандартном пищевом рационе. Непосредственно перед экспериментом животных под легким эфирным наркозом фиксировали на специальном стенде в положении на спине. Используя игольчатые электроды, электрофизиологического комплекса LabLinc model V75-25A V72-25A (Coulbourn instruments, США), которые накладывали в стандартных отведениях, осуществляли регистрацию электрокардиограмм. Полученную информацию обрабатывали с помощью компьютерной программы LabVIEW 5.1.

Ушиб сердца воспроизводили под общей анестезией диэтиловым эфиром путем нанесения ударного травматического воздействия грузом массой 100 г, при ускорении свободного падения, с высоты 30 см и площади соударяющей поверхности 2 см², в точку максимального проявления сердечной пульсации, на передней поверхности грудной клетки. При помощи электрокардиографического контроля было установлено, что через 15–20 мин от начала эксперимента наступала фибрилляция желудочков, после чего животных декапитировали. Контрольную группу составили 3 интактных животных. У всех животных быстро вскрывали грудную клетку, отсекали сердце и брали кусочки миокарда для исследования.

Для проведения световой и поляризационной микроскопии часть образцов миокарда фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и после стандартной проводки залива-

ли в парафин, срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха — эозином и заключали в полистирол.

Другую часть образцов миокарда обоих желудочков контрольной и подопытной групп животных для выявления ионных изменений, развивающихся в миокарде в результате ушиба сердца, фиксировали в 4% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч при температуре 20 °С. После этого из кусочков миокарда при температуре 20 °С приготавливали криостатные срезы толщиной 15 мкм, которые окрашивали флюоресцирующим красителем — кальцеином (Sigma-aldrich, США) [13, 14], после чего их исследовали с помощью микроскопа AxioCam HRC (Carl Zeiss, Германия) в режиме экспозиции автоматической камеры AxioCam MRc. Для анализа уровня включения кальцеина использовали Filter set-09 (поглощение 492 нм, испускание 513 нм) (Carl Zeiss, Германия). С помощью программного обеспечения Axiovision 3.1 определяли интенсивность флюоресценции (в усл. ед.) кальцеина в градациях красного, зеленого и синего цвета.

В контрольной и подопытной группе определяли суммарное и внутриклеточное содержание ионов Ca^{2+} в миокарде желудочков. Суммарное содержание ионов Ca^{2+} измеряли путем оценки интенсивности флюоресценции кальцеинового зонда со всей площади полученных изображений. Для оценки внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} использовали метод точечного счета интенсивности флюоресценции, вблизи ядра КМ (по 100 точек с одного изображения). Статистическая обработка результатов включала определение средней арифметической и ее стандартной ошибки. О значимости различий судили по t-критерию Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. При оценке препаратов миокарда, окрашенных гематоксилином Эрлиха — эозином, в группе животных с моделированным ушибом сердца обращали на себя внимание острые расстройства кровообращения в виде спазма артерий и пареза вен, кроме этого, была отмечена агрегация и сладжирование форменных элементов крови в микрососудах, во

многих полях зрения хорошо была видна фрагментация мышечных волокон (рис. 1).

Степень выраженности фрагментации волокон в различных срезах была неодинаковой — от имеющих вид поперечных трещин КМ до полного разделения групп мышечных волокон с признаками пересокращения или расслабления КМ. При поляризационной микроскопии было установлено, что саркомеры, располагающиеся по краю фрагментированных участков миокарда, находятся в состоянии контрактуры. В срезах миокарда отчетливо просматривались распространенные субсегментарные контрактуры в сочетании с очагами релаксации и диссоциации мышечных волокон. В строме миокарда часто располагались очаговые мелкофокусные кровоизлияния.

Гистохимическое исследование миокарда позволило получить данные о морфологических изменениях в миокарде и интенсивности возникшей флюоресценции, отражающей состояние и распределение Ca^{2+} в миокарде (рис. 2).

Сравнительная оценка интенсивности флюоресценции кальцеинового зонда при определении суммарного и внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} в миокарде желудочков контрольной и подопытной группы животных позволила выявить значимое увеличение содержания ионов Ca^{2+} в миокарде животных с ушибом сердца (рис. 3). Отмечено повышение суммарного содержания ионов Ca^{2+} в миокарде желудочков на 36,5%, а увеличение содержания внутриклеточного Ca^{2+} в миокарде желудочков по сравнению с таковым в контрольной группе составило 26,2%.

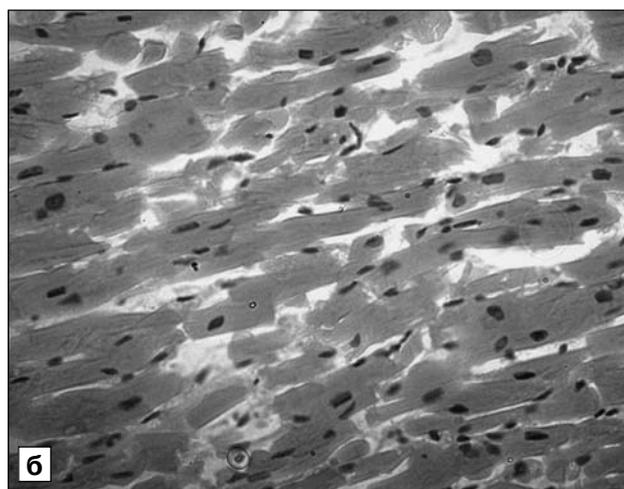
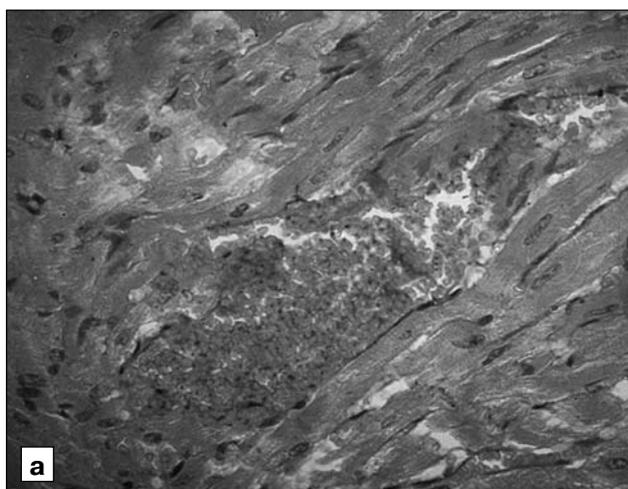


Рис. 1. Миокард крысы с моделированным ушибом сердца.

а — полнокровие сосудов, отек стромы; б — фрагментация кардиомиоцитов. Окраска гематоксилином — эозином. Об. 40, ок. 10.

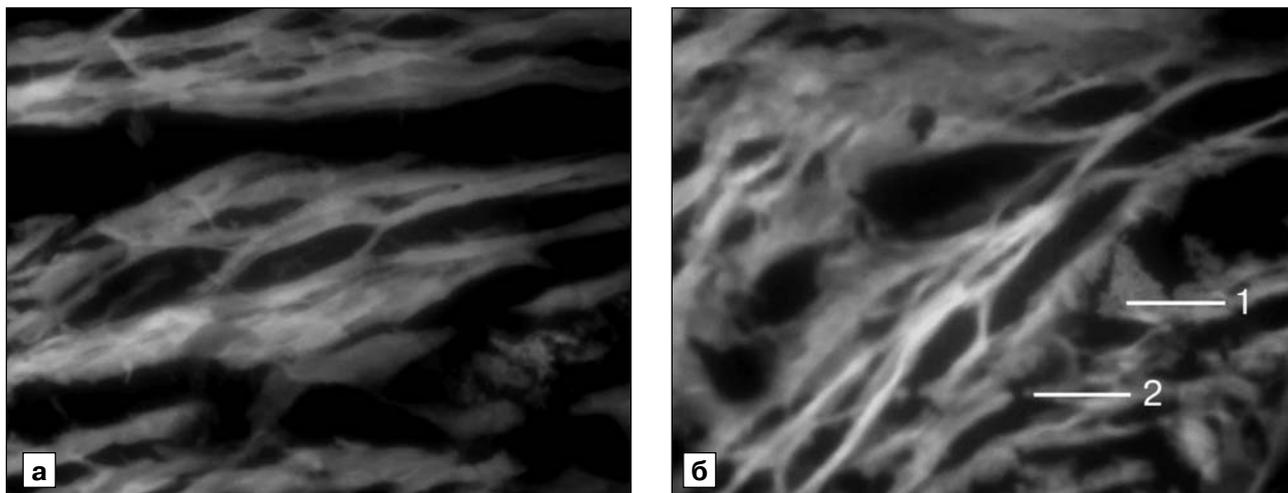


Рис. 2. Миокард левого желудочка крысы контрольной группы (а) и после моделированного ушиба сердца (б).

а — интенсивность флюоресценции внутриклеточного Ca^{2+} (I) (в усл. ед.) 186,7; б — интенсивность флюоресценции внутриклеточного Ca^{2+} (I) (в усл. ед.) 235,68. Наблюдаются очаговые кровоизлияния в строму миокарда (1) и участки фрагментации кардиомиоцитов (2). Об. 40, ок. 10.

Обсуждение полученных данных. Таким образом, морфологические данные, полученные нами с применением световой и поляризационной микроскопии, свидетельствуют об адекватности проведения экспериментального моделирования ушиба сердца с развитием острой сократительной недостаточности миокарда, сопровождавшейся фибрилляцией желудочков [5]. Согласно данным литературы, эти морфологические изменения характерны при отчетливо выраженной фибрилляции желудочков [2, 5, 6, 8, 9].

Использование электрокардиографического контроля при экспериментальном моделировании ушиба сердца позволило установить, что при механической травме грудной клетки развивается острая сократительная недостаточность миокарда, приводящая к фибрилляции желудочков [8, 9]. Нами получены данные, которые позволяют судить о причине развития электрической нестабильности миокарда и фибрилляции желудочков. По-нашему мнению, ведущую роль в остановке сердца, в результате фибрилляции желудочков, играют остро развившиеся ионные нарушения за счет повышения содержания Ca^{2+} как в самих КМ, так и в межклеточном пространстве, что приводит к развитию некоординированных сердечных сокращений. Это согласуется с данными других исследователей [1, 6]. Однако характер выявленных морфогистохимических изменений при ушибе сердца не является специфическим, его следует рассматривать как один из типологических процессов, происходящих в сердечной мышце при развитии острой сократительной

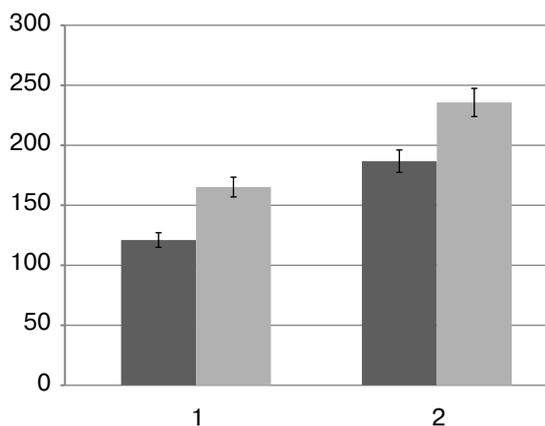


Рис. 3. Интенсивность флюоресценции кальциевого зонда в миокарде желудочков крыс в норме и при ушибе сердца.

По оси абсцисс: 1 — суммарное содержание ионов Ca^{2+} ; 2 — внутриклеточное содержание ионов Ca^{2+} ; темные столбики — контроль; светлые столбики — при ушибе сердца; по оси ординат — величина флюоресценции (усл. ед.); различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

недостаточности миокарда, сопровождавшейся фибрилляцией желудочков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кактурский Л.В. Внезапная сердечная смерть. М., Медицина, 2000.
2. Капустин А.В. О морфологическом признаке фибрилляции желудочков сердца. Суд.-мед. эксперт., 1999, № 4, с. 10–12.
3. Капустин А.В., Непомнящих Л.М., Семенова Л.А. и Синельщиков В.В. Гистопатология и ультраструктура очаговых повреждений миокарда при скоропостижной смерти от

- ишемической болезни сердца. Суд.-мед. эксперт., 1981, № 3, с. 28–31.
4. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М. и Роземберг В.Д. Морфология и молекулярно-генетические основы дилатационной кардиомиопатии. М., Изд-во РАМН, 2004.
 5. Мартынюк Р.А. Гистопатология миокарда при фибрилляции желудочков сердца: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1970.
 6. Непомнящих Л.М. Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце. Новосибирск, Наука, 1991.
 7. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л. и Семенов Д.Е. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца. Морфологические основы и молекулярные механизмы. М., Изд-во РАМН, 2003.
 8. Новоселов В.П., Савченко С.В., Романова Е.А. и Циммерман В.Г. Патоморфология миокарда при ушибах сердца. Новосибирск, Наука, 2002.
 9. Савченко С.В. Патоморфология и судебно-медицинская оценка изменений эндокарда и миокарда при ушибах сердца: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Новосибирск, 2002.
 10. Саркисов Д.С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. М., Медицина, 1987.
 11. Семенов Д.Е., Семенова Л.А., Непомнящих Л.М. и Целлариус Ю.Г. Феномен «исчезновения» кардиомиоцитов при пластической недостаточности миокарда. Бюл. экспер. биол., 1984, т. 97, № 5, с. 629–633.
 12. Целлариус Ю.Л., Непомнящих Л.М. и Семенова Л.А. Клеточные основы сократительной недостаточности миокарда. Сов. мед., 1985, № 2, с. 37–42.
 13. Jacob J., Chandran D. and Sasidharan R. Chlortetracycline, a fluorescent probe for pH of calcium stores in cells. *Curr. Sci.*, 2003, v. 84, № 5, p. 671–674.
 14. Mullins L.J. *Ion transport in heart*. N.Y., Raven Press, 1987.

Поступила в редакцию 17.09.08
Получена после доработки 07.07.09

HISTOCHEMICAL STUDY OF MYOCARDIUM STRUCTURE IN HEART CONTUSION

V.P. Novosyolov, S.V. Savchenko, D.A. Koshlyak and M.V. Voronkovskaya

The experimental modeling of heart contusion which was accompanied by ventricular fibrillation development was performed in Wistar rats, with the electrocardiographic study and subsequent histological and histochemical examination of the myocardium samples. Following heart contusion, acute circulatory disturbances, muscle fiber fragmentation, cardiomyocyte overcontraction or relaxation were detected in the myocardium. Also, the increase of total and intracellular calcium ion content in the myocardium was demonstrated. It is suggested that the mechanism of ventricular fibrillation development after heart contusion is associated with the increase of calcium concentration in both the cardiomyocytes and intercellular spaces leading to uncoordinated cardiac contractions.

Key words: *heart, myocardium, total Ca^{2+} , intracellular Ca^{2+} , contusion.*

Novosibirsk Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Department of Forensic Medicine, Novosibirsk State Medical University, Department of Forensic Medical Examination, Siberian Military Region 80 State Center for Forensic and Criminalistic Examinations, Novosibirsk.