

безмиелиновыми волокнами. Первые изменения ультраструктуры лучезарного венца наблюдаются уже через 2 недели введения налбуфину экспериментальным животным и нарастают на протяжении следующих сроков эксперимента. Основными проявлениями нейропатии лучезарного венца конечного мозга при условиях 6-недельного введения налбуфину является деструктированность осевых цилиндров нервных волокон, глиальных клеток. В звеньях гемомикроциркуляторного русла лучезарного венца происходят морфологические изменения, характерные для микроангиопатии. Работа является основой для дальнейших исследований, морфологов и невропатологов относительно разработки в перспективе новых методов диагностики и профилактики патологии мозга, предопределенной длительным применением опиоида.

**Ключевые слова:** лучистый венец, ультраструктура, опиоид, эксперимент.

formed by nonmyelinated fibers. The first changes in ultrastructure of the radiate crown are observe already after 2 weeks of injection of nalbupin to the experimental animals and keep growing throughout the following periods of the experiment. The main manifestations of neuropathy of the radiate crown of telencephalon after 6 weeks of injection of nalbupin is destructurization of the nerve fiber axons, glia cells. Morphological changes characteristic of microangiopathy take place in the links of hemomicrocirculatory bed of radiate crown. This work is the ground for further research of both, morphologists and neuropathologists in future development of the new methods of diagnosing and prevention of brain pathology associated with a long-term application of opioids.

**Key words:** radiate crown, ultrastructure, opioid, experiment.

Стаття надійшла 4.09.2014 р.

Рецензент Масловський С.Ю.

УДК 616.127:611.127-018.1:612.67

Т. Ю. Квитиницкая-Рыжова, П. П. Климентко, Г. В. Хаблак, Г. П. Парамонова, В. М. Кирик  
ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф.Чеботарёва НАМН Украины», г. Киев

### СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КАРДИОМИОПАТИИ И ЕЕ КОРРЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Целью работы было изучить возрастные структурные и ультраструктурные изменения (световая и электронная микроскопия, морфометрия) и уровень апоптоза (TUNEL-метод) в миокарде мышей при моделировании кардиомиопатии (введение изопротеренола (ИП) в дозе 100 мг/кг, 5 дней) и ее коррекции с помощью трансплантации стволовых клеток – мононуклеарных клеток костного мозга (МККМ) мышей (5 млн.).

Введение ИП вызвало гипертрофию миокарда – соотношение Масса сердца/Масса тела (МС/МТ) значительно увеличивалось по сравнению с контролем и у молодых (33 %) и у старых (11 %); отмечалось утолщение кардиомиоцитов (КМЦ) и миоцитов стенки артериол. Кроме того, развивались фиброз и очаговые повреждения миокарда с дистрофическими и деструктивными изменениями КМЦ и капилляров, что было в большей мере выражено у старых животных. Трансплантация МККМ животным с ИП-индуцированной кардиомиопатией оказывала нормализующее влияние на структуру КМЦ и капилляров, что в большей степени было выражено у молодых животных. У них отмечалось снижение индекса МС/МТ почти до нормального показателя, меньшая выраженность дистрофических и некротических изменений в КМЦ, а также уменьшение объема очагов повреждения. Кроме того, отмечено снижение уровня апоптоза, преимущественно у молодых животных. Апоптотический индекс снижался у них почти вдвое, а у старых – изменялся незначительно.

**Ключевые слова:** кардиомиопатия, старение, терапия стволовыми клетками, морфометрия.

*Работа является фрагментом НИР «Изучение возрастных структурных особенностей и механизмов клеточной гибели в разных органах при экспериментальной кардиомиопатии и ее коррекции» (№ ГР 0111U001485).*

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности во всём мире. Каждый год они приводят к смерти свыше 4 млн. человек в Европе и 1.9 млн. – в странах Евросоюза [7]. Однако если смертность от ССЗ в большинстве стран Европы в настоящее время несколько снижается, то в Украине этот показатель продолжает расти. Чаще всего ССЗ развиваются у людей старшего возраста. Количество мужчин с ССЗ увеличивается с 8 заболевших в возрасте 50-59 лет (на 1000 человек) до 66 заболевших в возрасте 80-89 лет. Аналогичные значения отмечены и для женщин (8 и 79 на 1000) [8]. Поэтому актуальными являются исследования, посвященные возрастным аспектам морфогенеза и лечения ССЗ, в частности кардиомиопатий (КМП). Под этим термином объединяют заболевания некоронароматоидного происхождения, различные по этиологии и патогенезу, но сходные по клиническому течению и морфологическим проявлениям.

Для моделирования КМП широко применяется изопротеренол (ИП) – агонист бета-адренорецепторов, вызывающий повреждение миокарда, связанное с фиброзом и гипертрофией кардиомиоцитов (КМЦ) [4, 6, 9]. Степень повреждения может быть увеличена путём повторных инъекций ИП [5]. Неотъемлемым звеном морфогенетических исследований миокарда при моделировании КМП является изучение клеточной гибели, в частности апоптоза как звена патогенеза ряда ССЗ [2]. Особое значение приобретает возрастной аспект этих исследований, поскольку при старении существенно меняется степень выраженности и распространенности процессов деструкции и

адаптации, клеточной гибели, а также уровень «неизменности» клеточных и тканевых структур, что отражается на характере течения возрастной патологии и возможных способах ее коррекции [1,2].

Для лечения ССЗ применяется широкий спектр лекарственных препаратов и немедикаментозных методов, в том числе и терапия стволовыми клетками (СК) [3]. Считается, что они способны реагировать на сигналы из пораженных тканей, мигрировать в очаг повреждения и дифференцироваться в специализированные клетки для компенсации нарушенных функций. Интенсивные исследования направлены на возможности клеточной терапии, замедляющей смерть КМЦ и способствующей восстановлению миокарда. Для оценки эффективности такого подхода к лечению кардиологической патологии следует определить не только структурные характеристики всех компонентов миокарда, но и степень угнетения апоптотической гибели клеток.

**Целью** работы была оценка возрастных структурных и ультраструктурных изменений миокарда, а также уровня апоптоза в нем, у мышей двух возрастных групп (молодые - 5 мес и старые - 25 мес) при моделировании кардиомиопатии (введение изопротеренола) и ее коррекции с помощью стволовых клеток.

**Материал и методы исследования.** Мышам линии СВА двух возрастных групп (5 и 25 мес) вводили подкожно ИП в дозе 100 мг/кг один раз в сутки на протяжении 5 дней. Через 2 недели после последнего введения ИП внутривенно трансплантировали 5 миллионов моноклеарных клеток костного мозга (МККМ), полученных от 3-месячных мышей той же линии. Фракцию МККМ, содержащих гематопозитические стволовые клетки, выделяли путем центрифугирования, отмывали и доводили до необходимой концентрации с помощью среды RPMI-1640 (Sigma, США). Трансплантацию клеток производили в хвостовую вену в объеме 100 мкл. Контрольным животным тех же возрастных групп вводили аналогичным образом среду RPMI-1640 в том же объеме. Исследования миокарда выполнены с применением световой, электронной микроскопии и морфометрии. Подсчитывали площадь соединительной ткани в очагах повреждения, количество малодифференцированных КМЦ, а также площадь эндотелиальных клеток (ЭК) и количество закрытых кровеносных капилляров в миокарде. Во всех экспериментальных группах вычисляли соотношение массы сердца к массе тела (МС/МТ).

Для выявления апоптоза применялся TUNEL – метод с использованием Apor Tag Plus Peroxidase in situ Apoptosis detection kit S 7101 фирмы Chemicon, США). Апоптотический индекс вычислялся по стандартной формуле. Статистический анализ проводился с помощью t-критерия Стьюдента.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Проведенное исследование показало, что при введении ИП (через 4 недели после последней инъекции) происходило существенное увеличение соотношения Масса сердца/Масса тела (МС/МТ). У молодых животных этот показатель увеличивался на 33 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными, а у старых – на 11 %. Увеличение массы сердца под влиянием ИП, более выраженное у молодых мышей, по сравнению со старыми, связано с разрастанием соединительной ткани на месте некротизированных КМЦ и гипертрофией оставшихся клеток, что подтверждено нашими гистологическими исследованиями. При моделировании КМП реакция соединительной ткани оказалась более демонстративной у молодых животных, чем у старых (рис. 1). У молодых она проявлялась в виде формирования крупных очагов молодой, грануляционной соединительной ткани, у старых – волокнистой соединительной ткани, преимущественно, развитием фиброза.

Применение ИП вызвало структурные изменения в миокарде, вполне адекватные кардиомиопатии. Оно приводило к развитию гипертрофии КМЦ и их ядер, а также миоцитов стенки артериол, более выраженной у молодых животных. Также происходило формирование очагов повреждения, преимущественно в стенке левого желудочка, что носило более выраженный характер у старых.

При моделировании КМП в очагах повреждения наблюдалось нарушение архитектоники миокарда и развитие деструктивных и дистрофических процессов (контрактура, вакуолизация, отек), вплоть до некробиоза и некроза клеток, с исходом в петрификацию и организацию. У старых животных степень повреждения оказалась большей, значительно чаще формировались очаги деструкции и кальцификации. На ультраструктурном уровне повреждающее действие ИП проявлялось дистрофическими и деструктивными нарушениями КМЦ – внутриклеточным отеком, контрактурными повреждениями миофибрилл, накоплением липофусцина в цитоплазме. У старых животных эти процессы были выражены в большей степени, чем у молодых, и приводили к более глубоким нарушениям миокарда.

После введения ИП количество TUNEL- позитивных ядер КМЦ возрастало у животных обеих возрастных групп. Апоптотический индекс возрастал у молодых животных более, чем в 10 раз, а у старых – приблизительно в 4 раза, тогда как у старых контрольных животных он почти вдвое превышал этот показатель у молодых (рис. 2 ). Согласно нашим предыдущим исследованиям, при экспериментальном сахарном диабете наибольшим апоптотическим изменениям подвергались ЭК капилляров миокарда [1]. При моделировании КМП более уязвимыми оказались КМЦ. На электронномикроскопическом уровне отмечены выраженные деструктивно-дистрофические изменения стенки гемокapилляров миокарда при моделировании КМП, более демонстративные у старых животных. Наряду с характерными возрастными перестройками, у них отмечался более выраженный очаговый отек цитоплазмы ЭК и более частое закрытие капилляров, в основном, вследствие набухания ядер ЭК (рис. 3). Результаты исследований указывают на существенную роль нарушений микроциркуляторного русла (МЦР) в патогенезе экспериментальной КМП, а также свидетельствуют о его большей повреждаемости у старых животных. Введение стволовых клеток животным с ИП-индуцированной КМП оказывает определенное нормализующее воздействие на миокард, что в большей степени проявляется у молодых. Если у молодых мышей с экспериментальной КМП такой показатель, как МС/МТ, увеличивался на 33 %, по сравнению с контрольными, что свидетельствует о развитии выраженной гипертрофии, то при введении МККМ – лишь на 11 %. У старых же это соотношение оставалось практически неизменным: при введении ИП оно увеличилось на 11%, а при последующей трансплантации МККМ – на 9 %.

У молодых животных при введении СК в меньшей степени выражены дистрофические и некротические изменения в КМЦ и усилены проявления репаративных процессов. Кроме того, в миокарде отмечается уменьшение объема очагов повреждения, а также снижение уровня апоптоза, преимущественно у молодых животных (см. рис. 2). Апоптотический индекс у них снижается почти вдвое, а у старых – не изменяется.

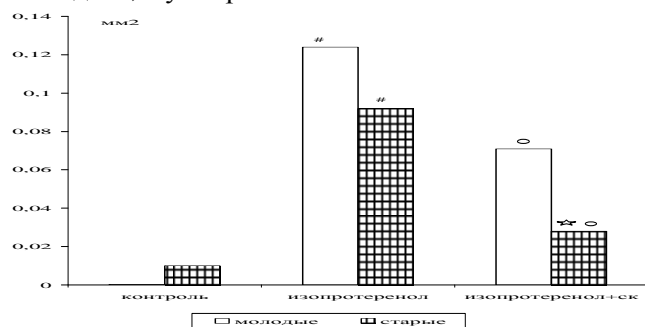


Рис. 1. Площадь соединительной ткани в очагах повреждения миокарда при моделировании кардиомиопатии и ее коррекции стволовыми клетками: - старые по сравнению с молодыми.

# - для экспериментальной группы (ИП) по сравнению с контролем; о - для группы ИП + СК по сравнению с ИП; - для группы ИП + СК по сравнению с контролем.

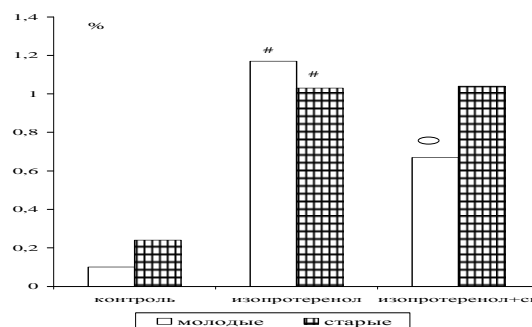


Рис. 2. Апоптотический индекс КМЦ при моделировании кардиомиопатии и ее коррекции стволовыми клетками.

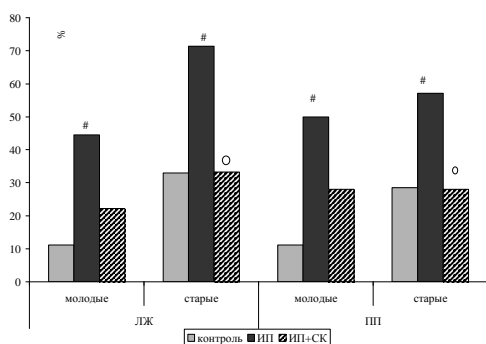


Рис.3 Процентное содержание закрытых капилляров в миокарде при моделировании кардиомиопатии и ее коррекции стволовыми клетками (ЛЖ - левый желудочек, ПП - правое предсердие)

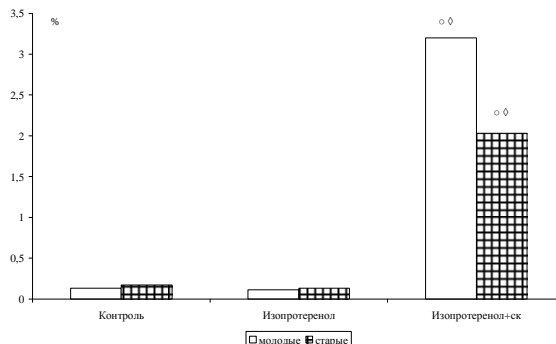


Рис. 4. Объемная доля малодифференцированных КМЦ в миокарде левого желудочка мышей при моделировании кардиомиопатии и ее коррекция стволовыми клетками

При введении МККМ животным с КМП вблизи очагов повреждения, преимущественно у молодых животных, встречаются своеобразные, нетипичные КМЦ в виде крупных гипертрофированных клеток со светлой цитоплазмой, крупным сферическим слабо базофильным

ядром, що містить еухроматин (рис. 4). Такі малодифференційовані клітини, в якій-то ступені нагадують ембріональні, розташовані серед звичайних КМЦ і з'єднані з ними вставочними дисками. Реакція з'єднаних клітин навколо цих КМЦ не виражена. Оскільки ні в контролі, ні у тварин з КМП, такі клітини практично не визначаються, їх можна розглядати як проявлення репаративних і проліферативних процесів, викликаних впливом МККМ, що виділяють велику кількість цитокінів і інших біологічно активних речовин. Існує точка зору, що трансплантація МККМ викликає паракринне дію на пошкоджений міокард [3].

На сьогоднішній день існує велика кількість досліджень, в яких доведено, що навіть у дорослому серці існують власні СК і клітини-предшественники серцевих міоцитів. Їх кількість може зростати при гострому і, в меншій ступені, при хронічному пошкодженні серця [3]. Результати наших досліджень показали, що СК, введені тварині з ИП-індукованою КМП, викликають певне нормалізуюче вплив на структуру капілярів у тварин обох вікових груп. Нормалізується площа ядер ЕК, відсоток закритих капілярів зменшується, перикапілярний набряток зменшується. У старих тварин, незважаючи на зменшення площі ядер ЕК і зменшення відсотка закритих капілярів, відновлення ультраструктурних характеристик МЦР було менш демонстративним.

#### Висновок

Таким чином, введення стовбурових клітин тварині з ИП-індукованою кардіоміопатією викликає певне нормалізуюче вплив на структурні і ультраструктурні характеристики КМЦ і капілярів міокарда молодих тварин, однак у старих – нормалізуючий ефект був суттєво меншим, ніж у молодих.

#### Список літератури

1. Kvitnitskaya-Ryzhova T.Yu. Otsenka vozrastnykh strukturnykh izmeneniy kletok i tkaney s pomoschyu matematicheskogo apparata, sozdanogo na baze teorii nechetkikh mnozhestv / T.Yu. Kvitnitskaya-Ryzhova, A.G. Butenko, S.A. Mihalskiy // Problemy stareniya i dolgoletiya. – 2007. – Т. 16 (4). – С. 321-332.
2. Kvitnitskaya-Ryzhova T.Yu. Vozrastnyye osobennosti proyavleniy apoptoza v gisto-gematischeskikh barerakh razlichnykh organov pri eksperimentalnom saharanom diabete / T.Yu. Kvitnitskaya-Ryzhova, A.S. Stupina, G.V.Hablak [i dr.] // Problemy stareniya i dolgoletiya. – 2010. – Т. 19 (4). – С. 329-338.
3. Chaykovskiy Yu.B. Stovburoviy klityny / Yu.B. Chaykovskiy, O.I. Dyeltsova, S.B. Geraschenko // Ivano-Frankivsk: Misto NV, - 2014. – 500 s.
4. Balakumar P. Rodent models of heart failure / P. Balakumar, A.P. Singh, M. Singh // J.Pharmacol.Toxicol.Methods. – 2007. – Vol. 56 (1). – P. 1-10.
5. Brooks W. W. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: Structural and functional correlates / W.W. Brooks, C.N. Conrad // Comparative Medicine. – 2009. – Vol.59 (4). – P. 339-343.
6. Galindo C.L. Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure / C.L. Galindo, M.A. Skinner, M. Errami [et al.] // BioMed Central Physiology. – 2009. – Vol.9. – P. 1-23.
7. Nichols M. European cardiovascular disease statistics. 2012 edition / M. Nichols, N. Townsend, P. Scarborough [et al.] // University of Oxford, - 2012. – 125 p.
8. Tendera M. The epidemiology of heart failure / M. Tendera // J. Renin-Angiotensin-Aldosterone System. – 2004. – Vol.5 (S2). – P.S1-S5.
9. Peng D.-F. Pathophysiological model of chronic heart failure complicated with renal failure caused by three-quarter nephrectomy and subcutaneous injection of isoprenaline / D.-F. Peng, S.-Y. Tang, Y.-J. Hu [et al.] // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2013. – Vol.5. – P. 835-839.

#### Реферат

##### СТРУКТУРНІ ЗМІНИ МІОКАРДУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ КАРДІОМІОПАТІЇ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ

Квітницька-Рижова Т.Ю., Клименко П.П., Хаблак Г.В., Парамонова Г.І., Кірик В.М.

Метою дослідження було вивчення вікових структурних та ультраструктурних змін при моделюванні кардіоміопатії (введення ізопроterenолу (ІП) в дозі 100 мг/кг, 5 днів) та її корекції за допомогою трансплантації стовбурових клітин – мононуклеарних клітин кісткового мозку (МККМ) мишей (5 млн.). Введення ІП викликало гіпертрофію міокарду – співвідношення Маса серця/Маса тіла (МС/МТ) значно збільшилось порівняно з контролем і у молодих (33 %), і

##### STRUCTURAL CHANGES OF MYOCARDIUM UNDER MODELING OF CARDIOMYOPATHY AND ITS CORRECTION WITH STEM CELLS IN ANIMALS OF DIFFERENT AGE

Kvitnitskaya-Ryzhova T.Yu., Klimenko P.P., Khablak G.V., Paramonova G.I., Kirik V.M.

This study aimed to investigate the age-related structural and ultrastructural changes and the level of apoptosis (TUNEL – assay) in mice myocardium (5 and 25 mo.) after administration of Isoproterenol (IP) (100 mg/ kg body weight, 5 days) and further transplantation of stem cells – mice bone marrow-derived mononuclear cells (BM-MNCs) (5 mil.). IP administration created cardiac hypertrophy in experimental animals. Heart weight/ body weight ratios (HW/BW) increased significantly, compared to sedentary animals for both young (33 %) and old (11 %) mice. Cell

у старих (11 %) тварин; відмічалось потовщення кардіоміоцитів (КМЦ) і міоцитів стінки артеріол. Крім того, розвивались фіброз та вогнищеві ушкодження міокарду з дистрофічними та деструктивними змінами КМЦ і капілярів, що було в більшій мірі виражено у старих тварин. Трансплантація МККМ тваринам із ІІ-індукованою кардіоміопатією справила нормалізуючий вплив на структуру КМЦ і капілярів, що було в більшій мірі виражено у молодих. У них відмічалось зниження індексу МС/МТ майже до контрольного рівня, менша вираженість дистрофічних та некротичних змін в КМЦ, а також зменшення об'єму вогнищ ушкодження. Крім того, відмічено зниження рівня апоптозу, переважно у молодих тварин. Апоптотичний індекс знижувався у них майже вдвічі, а у старих – його зміни були незначними.

**Ключові слова:** кардіоміопатія, старіння, терапія стовбуровими клітинами, морфометрія.

Стаття надійшла 11.10.2014 р.

cross-sectional area in H&E stained sections was also significantly increased in mice treated with IP; cardiomyocytes (CMC), as well as myocytes in arteriole wall appeared to be thicker. Besides there developed fibrosis and numerous focal injuries (with dystrophic and destructive changes in CMC and capillaries) predominantly in the left ventricle and septum wall that appeared to be more severe in old animals. Transplantation of BM-MNCs to the animals with IP-induced cardiomyopathy has produced definite normalizing effect on CMC and capillaries structure, being more pronounced in the young mice. The latter displayed HW/BW decrease and less marked dystrophic and necrotic changes in CMC as well as the lower amount of the injury foci. Besides, it is shown the apoptotic level decrease predominantly in the young animals. The apoptotic index in these animals was almost two-fold lower while it remained almost unchanged in the old ones.

**Key words:** cardiomyopathy, aging, stem cell therapy, morphometry.

Рецензент Шепітько В.І.

УДК 616-006.327-091:616.1/8:57.017.3:77.026.34

Г. А. Квятковская, Е. А. Квятковский, Г. В. Федоринчик  
ІЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпропетровськ

### АДАПТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ФИБРОЗНЫХ ОБОЛОЧЕК НЕКОТОРЫХ ОРГАНОВ ПО ДАННЫМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Методом сканирующей электронной микроскопии исследована поверхность фиброзных оболочек почек, селезенки, печени, поджелудочной и щитовидной желез, яичка, мочеоточника, пищевода, кавернозных тел полового члена. Выявленный характер их складчатости зависит от интенсивности кровотока и концентрации напряжений в органе.

**Ключевые слова:** фиброзная оболочка, электронная микроскопия.

*Робота являється фрагментом НІР «Морфофункціональні особливості судинного русла та регенераторні можливості сечостатевої системи після органозберігаючих оперативних втручань, кореляції кровотоку та імуностимуляції», державна реєстрація № 0114U000763.*

Фиброзная оболочка органов является частью их соединительнотканного каркаса, находится в тесной взаимосвязи с их морфофункциональным состоянием и играет формообразующую роль [5].

**Целью** работы было изучение строения поверхности фиброзной оболочки ряда паренхиматозных органов (почек, селезенки, печени, поджелудочной и щитовидной желез, яичка), трубчатых органов (мочеоточника и пищевода), а также кавернозных тел полового члена методом сканирующей электронной микроскопии.

**Материал и методы исследования.** Материалом послужили участки органов вместе с фиброзной оболочкой площадью 5×10 мм, взятые от 4 трупов людей, погибших от травм в результате несчастного случая. Образцы органов фиксировали в 1% забуференном растворе глутарового альдегида, 2% OsO<sub>4</sub>, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, высушивали путем перехода через критическую точку эфира, напыляли золотом и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-35 (Япония). На сканограммах определяли расстояние между вершинами складок на поверхности капсул органов (50 измерений на одной сканограмме).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Было установлено, что фиброзные капсулы органов имели складчатую поверхность. Наличие складок определялось извитым ходом коллагеновых волокон, образующих капсулу и имеющих преимущественно упорядоченную архитектуру. Образцы фиброзной капсулы почки в области полюсов и вдоль латерального края содержали хорошо выраженные, расположенные рядами складки полукруглой формы с расстоянием между вершинами 11,89±0,57 мкм. На передней и задней поверхности почки на уровне ворот складчатость была менее выражена. Складки также были представлены рядами, но были уплощены, а расстояние между вершинами было меньшим – 4,38±0,23 мкм. Почка заметно изменяет свой объем в зависимости от уровня физиологического кровенаполнения. Учитывая, что спонтанные разрывы почки наиболее часто встречаются в области полюсов и по латеральному