

УДК 616.12-073.432.19-02:616.127-035:615.277.3]-092.9

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ КАРДИОМИОПАТИИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ ЦИТОСТАТИКОВ

**Боднар Я.Я., Ваврух П.О., Ваврух Г.П.**

*ВГУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского  
Министерства здравоохранения Украины», Тернополь, e-mail: petro.vavrukh@gmail.com*

Проведен анализ особенностей ультраструктурных изменений кардиомиоцитов (КМЦ) при кардиомиопатии, индуцированной введением циклофосфана (ЦФ) на двух экспериментальных моделях, все изменения оценивались в трех временных интервалах (30, 60, 90 суток) и сравнивались с контрольной группой животных. При введении цитостатика наблюдаются изменения, характерные для регенераторно-пластической недостаточности кардиомиоцитов, а именно: инвагинации ядра, иногда глубокие, нарушение архитектоники и дезорганизация миофибрилл, часть из них истончается, другие сохранившиеся с отчетливым саркомерным строением, небольшие по размерам митохондрии. Установлено, что при совместном введении ЦФ и «Карболайна» оказывается положительное влияние применения последнего на структурные компоненты КМЦ на фоне улучшения микроциркуляции. Активизируются ядра КМЦ, лучше сохранен сократительный аппарат и структура миофибрилл, отмечается хорошая сохранность митохондрий, отражающая обеспечение энергией процесса сокращения.

**Ключевые слова:** кардиомиопатия, кардиомиоциты, циклофосфан, ультраструктура, митохондрии

## ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF CARDIOMYOCYTES AT CARDIOMYOPATHY INFLECTED INTRODUCTION OF CYTOSTATICS

**Bodnar Y.Y., Vavrukh P.O., Vavrukh H.P.**

*HSEI «Ternopil State Medical University by I.Y. Horbachevsky»,  
Ternopil, e-mail: petro.vavrukh@gmail.com*

We analyzed the features of ultrastructural changes in cardiomyocytes by cardiomyopathy inflicted introduction of cyclophosphamide. administration on two experimental models, all changes were assessed at three time intervals (30, 60, 90 days) and compared with a control group of animals. Were assessed all changes in two experimental models, at three time intervals (30, 60, 90 days) and were compared with a control group of animals. With the introduction of cytostatics we observed changes are characteristic of regenerative and plastic insufficiency of cardiomyocytes: invagination of the nucleus, sometimes profound; violation architectonics and disorganization of myofibrils, some of them become thinner, while others saved with clear sarkomere structure; small in size mitochondria. Was established that at joint introduction of cyclophosphamide and «Karbolayn» is a positive influence on the structural components of cardiomyocytes and improve microcirculation. Intensified nucleus of cardiomyocytes, better preserved contractile apparatus and structure of myofibrils, observed good preservation that of mitochondria, reflects the energy supply of the reduction process.

**Keywords:** cardiomyopathy, cardiac myocytes, cyclophosphamide, ultrastructure of mitochondria

Применение цитостатиков в составе различных схем полихимиотерапии позволило достичь значительного улучшения результатов лечения онкологических больных. Кроме терапевтического действия, все противоопухолевые антрациклиновые антибиотики вызывают ряд побочных эффектов, обусловленных низкой избирательностью действия, главным из которых является потенциально необратимая кумулятивная дозозависимая кардиотоксичность, которая ведет к развитию кардиомиопатии и застойной сердечной недостаточности в разные периоды после лечения [2, 7, 8, 9].

Циклофосфамид (ЦФ) – препарат, широко используемый в противоопухолевой терапии как оказывающий алкилирующее воздействие на ДНК и при трансплантации как индуктор толерантности [3, 10]. Отсутствие избирательности действия и выявляемые уро-, нефро- и кардиотоксические свойства ЦФ, его метаболитов, а также

нарушения репродуктивной функции создают в ряде случаев серьезную проблему для клинического использования этого препарата [4, 11]. В таких условиях при оценке паренхиматозно-стромальных соотношений в миокарде учитывается пролиферативная активность кардиомиоцитов и морфогенез кардиосклероза на месте диффузной гибели отдельных мышечных клеток сердца. Указанные морфологические проявления кардиомиопатии лежат в основе регенераторно-пластической недостаточности миокарда, которая имеет присущие ей морфологические особенности, отличающие ее от метаболических и ишемических повреждений сердца [1]. Однако характер структурных изменений миокарда при действии цитостатических препаратов практически не изучен. Не выяснены основные типы повреждений кардиомиоцитов, не установлены возможности и типы их регенерации.

**Цель исследования:** изучить ультраструктурные изменения миокарда при хронической интоксикации цитостатическими препаратами.

#### Материал и методы исследования

Исследование выполнено на 46 половозрелых крысах-самцах массой 180–250 г на стандартном содержании и питании вивария. Крысам вводили внутривентриально 1 раз в 5 дней «Циклофосфан» («Артемиум», Украина) в дозе 15 мг/кг массы тела. Вторая группа – животные, которым кроме введения циклофосфана с целью коррекции эндогенной интоксикации, вводили внутривентриально «Карболайн» в дозе 1 г/кг массы тела. Крысам контрольной группы вводили внутривентриально 0,9% раствор натрия хлорида соответственно. На 30, 60, 90 сутки после начала эксперимента, но не менее чем через 72 часа после последней инъекции [5, 6], животных наркотизировали тиопенталом и путем декапитации проводили их экзаназию. После декапитации и вскрытия грудной клетки проводили экстирпацию сердца. Ткань миокарда левого желудочка (ЛЖ) фиксировали в течение 30 мин в 2,5–3% растворе глутаральдегида, изготовленного на 0,1 молярном фосфатном буфере (рН 7,2–7,4). Затем фиксированный материал лезвием разрезали на кусочки размером 0,5–1,0 мм<sup>3</sup>, промывали их в трех порциях 0,1 молярного фосфатного буфера. Полученные кусочки миокарда фиксировали в 2% растворе тетраоксида осмия (OsO<sub>4</sub>) в течение 2 часов. Повторно материал промывали при комнатной температуре в трех порциях 0,1 молярного буфера, по 10 мин в каждой порции, с последующим обезвоживанием в серии спиртов нарастающей концентрации и абсолютном ацетоне по принятой схеме. После дегидратации кусочки миокарда заливали в смесь эпона 812 и аралдита. Полимеризацию проводили при температуре + 37°C в течение 48 часов. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме, монтировали их на сетки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по методу Рейнольдса. Препараты изучали на электронном микроскопе ПЭМ-125 К при различных увеличениях.

При проведении исследований придерживались международных принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и с другой научной целью» (Страсбург, 1986 г.) и национальных норм по биоэтике (1 национальный конгресс по биоэтике, Киев, 2001 г.) [8].

#### Результаты исследования и их обсуждение

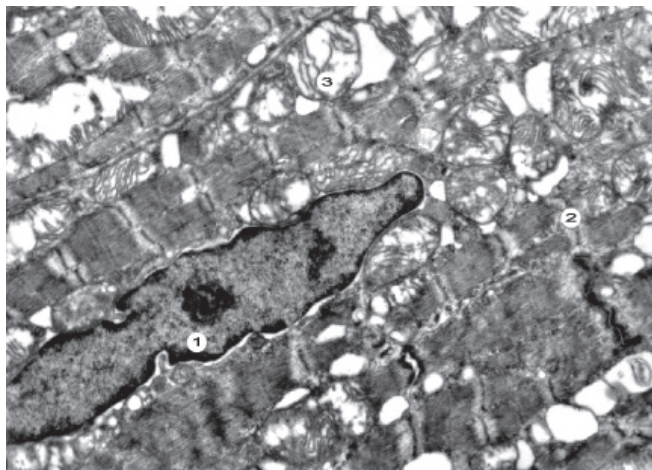
Субмикроскопические исследования миокарда левого желудочка при экспериментальном введении циклофосфана на 30 сутки эксперимента показало, что для кардиомиоцитов характерным является уменьшение размеров ядер. Они сохраняют продолговатую форму, однако их кариолема имеет инвагинации. Перинуклеарное пространство очагово увеличено, в ядерной оболочке мало ядерных пор. В кариоплазме имеются небольшие ядрышки. Осмиофильные гетерохроматиновые участки локализованы преимущественно возле внутреннего листка ядерной оболочки. Можем наблю-

дать пересокращение миофибрилл, и нарушено упорядоченное расположение саркомер. На отдельных участках вставные диски сохраняют свою структурированность, а у других установлено различие десмосом с образованием увеличенных промежутков. Упорядоченное расположение митохондрий сохраняется, но часть их гипертрофированные, имеют локально просветленный матрикс и поврежденные кристы. В саркоплазме обнаруживаются вакуолеподобные структуры, образованные за счет канальцев саркоплазматической сетки.

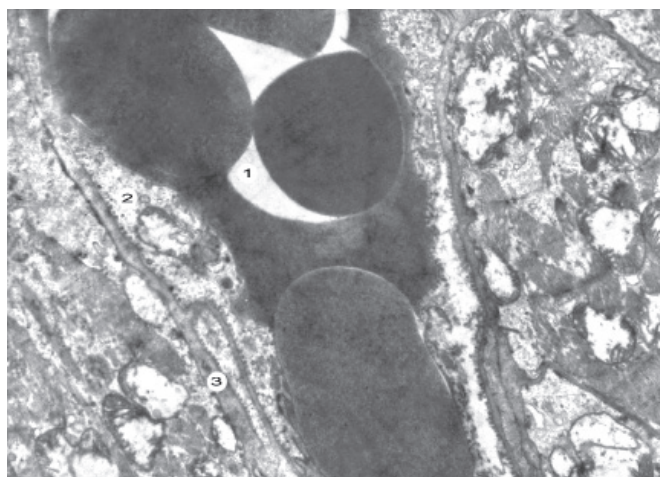
Для гемокapилляров в этот срок эксперимента характерны широкие просветы заполненные эритроцитами, имеется отек цитоплазмы эндотелиоцитов, их просветление, повреждения органелл. Часть митохондрий измененной формы с просветленным матриксом и деструкцией крист. Пиноцитоз хорошо выражен на отдельных участках эндотелиоцитов. Базальная мембрана на отдельных участках утолщена, локально имеются участки просветления. Такое состояние стенки гемокapилляра может свидетельствовать о нарушении транскапиллярного обмена.

Субмикроскопические изменения КМЦ, которые мы наблюдали при экспериментальном введении циклофосфана на 60 сутки эксперимента, имели следующий характер. В части кардиомиоцитов наблюдаются инвагинации ядра, иногда глубокие. Миофибриллы разволокненные, утолщенные. Нарушено четкое саркомерное строение, они разной величины, однако лизис миофиламентов выражен незначительно. Возле сарколеммы имеются просветленные участки саркоплазмы, отображающие ее отек. Имеются гипертрофированные митохондрии с просветленным матриксом и локально поврежденными кристами. Однако возле измененных органелл имеются небольшие и средней величины митохондрии с четко контурированными кристами.

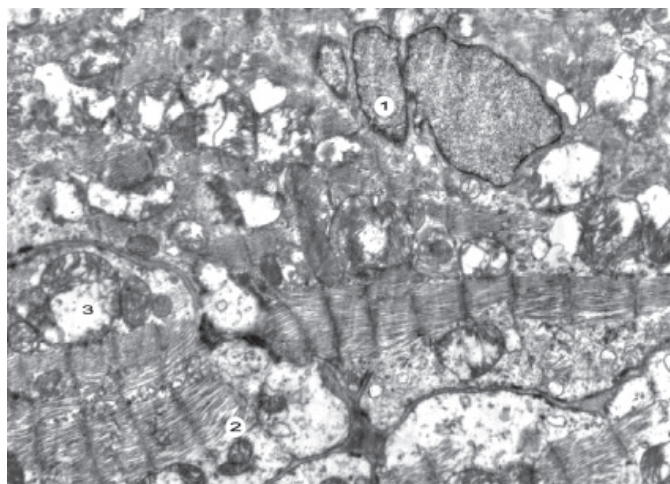
На 90 сутки эксперимента при введении ЦФ установлено, что часть миофибрилл истончается, другие сохранившиеся с четким саркомерным строением. Некоторые из них утолщены. В светлых участках саркоплазмы, где миофибриллы были лизированы, имеются признаки репаративной регенерации с новообразованием миофибрилл или замещением дефекта фибриллярными структурами соединительной ткани. Между миофибриллами митохондрии расположены упорядоченно. Кристы относительно сохранены, имеются участки их локального повреждения. Отмечаются скопления таких органелл под сарколеммой возле участка дефекта. Наблюдаются также небольшие по размерам митохондрии, что может свидетельствовать о гиперплазии органелл.



*Рис. 1. Субмикроскопические изменения миокарда при экспериментальном введении ЦФ. 30 сутки эксперимента. Ядро продолговатой формы с инвагинациями кариолеммы (1), поврежденные миофибриллы (2), деструктивно изменены митохондрии (3). x 17 000*

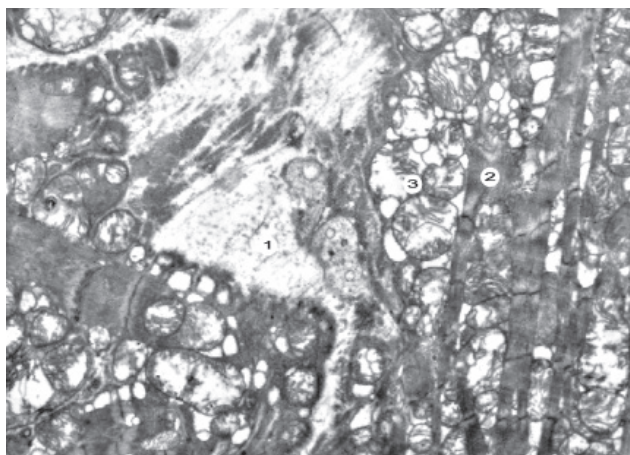


*Рис. 2. Субмикроскопические изменения кровеносного капилляра. Миокард животного при экспериментальном введении ЦФ на 30 сутки эксперимента. Широкий просвет гемокapилляра с форменными элементами крови (1), отечная цитоплазма эндотелиоцита (2), базальная мембрана (3). x14 000*

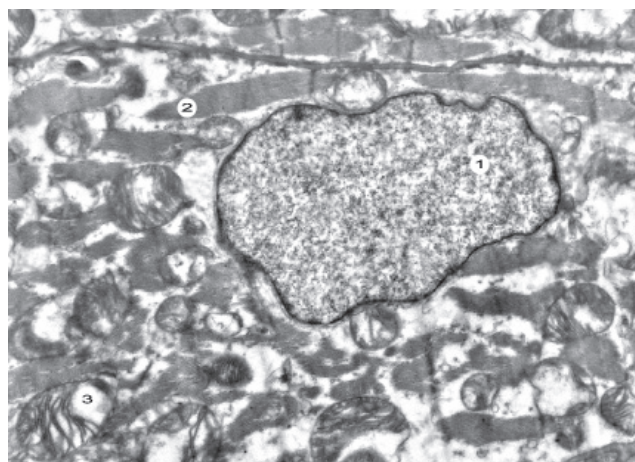


*Рис. 3. Субмикроскопические изменения миокарда при экспериментальном введении ЦФ. 60 сутки эксперимента. Ядро с инвагинациями кариолеммы (1), поврежденные миофибриллы (2), деструктивно изменены митохондрии (3). x14 000*





*Рис. 4. Субмикроскопические изменения миокарда при экспериментальном введении ЦФ. 90 сутки эксперимента. Саркоплазма (1), поврежденные миофибриллы (2), деструктивно изменены митохондрии (3). x15 000*



*Рис. 5. Субмикроскопические изменения миокарда при экспериментальном введении ЦФ и КЛ. 30 сутки эксперимента. Ядро с неглубокими инвагинациями кариолеммы (1), миофибриллы (2), митохондрии (3). x14 000*

На 30 сутки эксперимента при введении циклофосфана в сочетании с введением «Карболайна» наблюдалась лучшая сохранность структурных компонентов кардиомиоцитов по сравнению с группой животных, которым вводили только цитостатик.

Ядра имеют овальную форму с незначительными инвагинациями кариолеммы, четкими контурами их мембран. В кариоплазме преобладает эухроматин и много рибосомальных гранул. Установлены изменения миофибрилл, но они не столь значительны, как наблюдалось в предыдущих исследованиях. Сохраняется их саркомерное строение, менее выражено разволокнение миофиламентов. Часть митохондрий с признаками деструкции, об этом свидетельствует просветленный матрикс и очагово поврежденные кристы. Четко контурированы сарколеммы, отечные явления менее выразительные.

Кровеносные капилляры в этот и последующие сроки эксперимента имеют умеренные просветы, в которых расположены

эритроциты преимущественно в один ряд. Цитоплазма эндотелия имеет просветленные утолщенные участки, однако на значительных участках она сохранена и не утолщена, хорошо выражен пиноцитоз. Базальная мембрана относительно равномерна, в отдельных местах утолщена. Такое состояние стенки гемокapилляров свидетельствует об удовлетворительном транскапиллярном обмене.

В условиях совместного введения циклофосфана и «Карболайна» на 60 сутки эксперимента субмикроскопически отмечается сохранность миофибрилл, упорядоченное расположение в них саркомеров. Участки их чрезмерного сокращения наблюдаются не часто. Хорошо сохранены

вставные диски, в них четко выражены десмосомальные контакты. Имеется упорядоченное расположение митохондрий ленточками между миофибриллами, но часть

их гипертрофирована с очагово просветленным матриксом и умеренной деструкцией крист. Однако имеющиеся органеллы – с четкими плотно упакованными кристами.

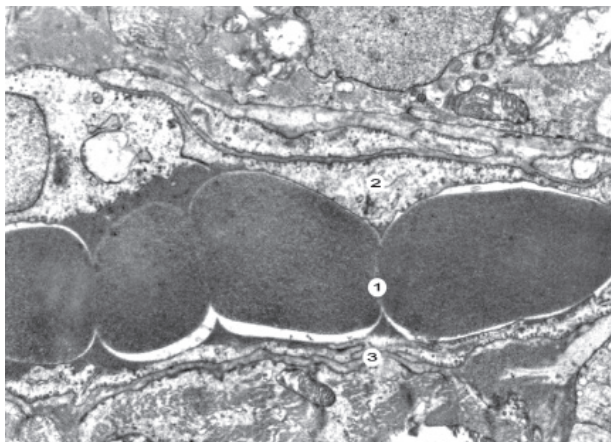


Рис. 6. Субмикроскопические изменения кровеносного капилляра. Миокард животного при экспериментальном введении ЦФ и КЛ на 30 сутки эксперимента. Просвет капилляра (1), цитоплазма эндотелиоцита (2), базальная мембрана (3). x9 000

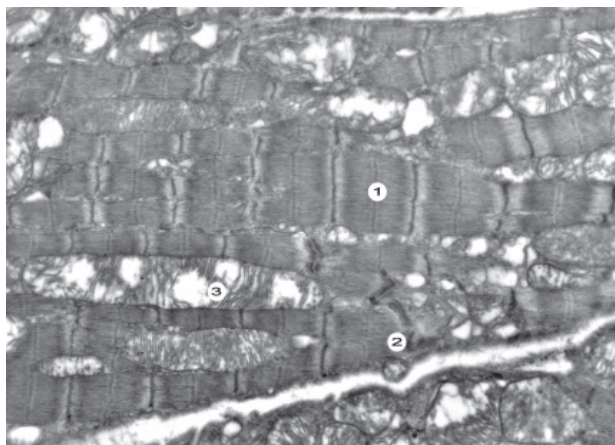


Рис. 7. Субмикроскопические изменения миокарда при экспериментальном введении ЦФ и КЛ. 60 сутки эксперимента. Миофибриллы (1), вставной диск (2), гипертрофированная митохондрия (3). x17 000

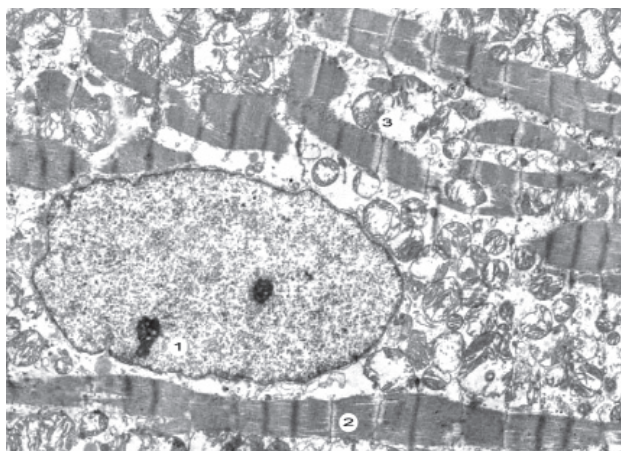


Рис. 8. Субмикроскопические изменения миокарда при экспериментальном введении ЦФ и КЛ. 90 сутки эксперимента. Ядро с ядрышками (1), миофибриллы (2), митохондрии (3). x9 000



На 90 сутки эксперимента при совместном введении ЦФ и «Карболайна» отмечаются кардиомиоциты, в которых ядра имеют присущее им строение, продолговатые овальной формы, с четкими контурами кардиолепеллы и небольшими инвагинациями. Их кариоплазма электронносветлая, в ней преобладает хроматин, имеются одно или два ядрышка и рибосомальные гранулы. Сократительный аппарат умеренно изменен. Большинство миофибрилл имеют четкое саркомерное строение, сохраненные миофиламенты, но на отдельных участках наблюдаются их разволокнение и повреждение. Отмечаются перинуклеарные скопления митохондрий, имеющих различные размеры, отображающие гипертрофию и гиперплазию таких органелл. Между миофибриллами эти органеллы расположены относительно упорядоченно, они имеют меньшую степень поражения.

### Выводы

Таким образом, при введении цитостатика наблюдаются изменения, характерные для регенераторно-пластической недостаточности кардиомиоцитов, а именно инвагинации ядра, иногда глубокие, нарушение архитектоники и дезорганизация миофибрилл, часть из них истончается, другие сохранившиеся с отчетливым саркомерным строением, небольшие по размерам митохондрии. При ультрамикроскопическом исследовании кардиомиоцитов установлено, что при совместном введении ЦФ и «Карболайна» оказывается положительное влияние применения последнего на структурные компоненты КМЦ на фоне улучшения микроциркуляции. Активизируются ядра КМЦ, лучше сохранен сократительный аппарат и структура миофибрилл, отмечается хорошая сохранность митохондрий, которая отражает энергообеспечение процесса сокращения.

### Список литературы

1. Ваврух П.О., Боднар Я.Я. Гістостереометрична характеристика міокардіопатії, індукованої цитостатичними препаратами // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. – 2012. – № 1. – С. 20–22.
2. Гнатюк М.С. Кількісна морфологія поразеного серця (лекція) / М.С. Гнатюк, В.В. Франчук. – Тернопіль, 1996. – 24 с.
3. Лушнікова Е.Л., Непомнящих Л.М., Толстикова Т.Г. Патоморфологія мышечных клеток сердца при действии циклофосфамида и тригерпеноидов. – М.: Изд-во РАМН, 2009. – 272 с.
4. Морфогенез и гистостереологический анализ гепатопатии, индуцированной циклофосфамидом / Л.М. Непомнящих, О.П. Молодых, Е.Л. Лушнікова, Ю.А. Сорокина // Бюл. экпер. биол. – 2010. – № 1. – С. 113–120.
5. Новочадов В.В. Моделирование хронического эндотоксикоза в экспериментальной патологии // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2005. – № 1. – С. 32–33.
6. Новочадов В. В., Писарев В. Б. Эндотоксикоз: моделирование и органопатология. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005. – 240 с.
7. Семенов Д.Е. Особенности антрациклиновой модели кардиомиопатии: снижение синтеза белка, нарушение внутриклеточной регенерации и безнекротическая элиминация кардиомиоцитов / Д.Е. Семенов, Е.Л. Лушнікова, Л.М. Не-

помнящих // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – № 5. – С. 594–600.

8. Этические принципы при работе с лабораторными животными / В.Е. Чадаев, О.А. Кузьмина, И.Ю. Кузьмина и др. // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2008. – № 3. – С. 162–164.

9. Ashrafian H, Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications cardiomyopathies: therapeutics based on molecular phenotype // J Am. Coll. Cardiol. – 2007. – Vol. 27, № 49, № 12. – P. 1251–1264.

10. High-dose busulfan and cyclophosphamide as a conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in childhood non-hodgkin lymphoma patients: a long-term follow-up study / M. Andion, B. Molina, M. Gonzalez-Vicent et al. // J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 2011. – Vol. 33(3). – P. 89–91.

11. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress / M.A. Rezvanfar, R.A. Sadrkhanlou, A. Ahmadi et al. // Hum. Exper. Toxicol. – 2008. – Vol. 27. – P. 901–910.

### References

1. Vavrukh P.O., Bodnar Y.Y. Histostereometrychna kharakterystyka miokardiopatii, indukovanoyi tsytostatychnymy preparatamy. Zdobutky klinichnoyi ta eksperymentalnoyi medytsyny. 2012, no. 1, pp. 20–22.
2. Hnatyuk M., Franchuk S.V. Kilkisna morfolohiya porazhenoho sertsya (lektsiya). Ternopil, 1996. 24 p.
3. Lushnykova E.L., Nepomnyashchykh L.M., Tolstykh T.H. Patomorfolohiya myshechnykh kletok serdtsa pry deystvyy tsyklofosfamyda y tryterpenoydov. Moscow, Yzd-vo RAMN, 2009. 272 p.
4. Nepomnyashchykh L.M., Molodykh O.P., Lushnykova E.L., Sorokina Yu.A. Morfohenez y hystostereolohycheskyy analiz hepatopaty, yndutsyrovannoy tsyklofosfamydom. Byul. eksper. byol., 2010, no. 1, pp. 113–120.
5. Novochadov V.V., Modelyrovanye khronycheskoho endotoksykoza v eksperymentalnoy patologiy. Byulleten Volhogradskoho nauchnoho tsentra RAMN, 2005, no. 1, pp. 32–33.
6. Novochadov V.V., Pysarev V.B. Endotoksykoz: modelyrovanye y orhanopatolohiya. Volhograd, Yzd-vo VolHMU, 2005. 240 p.
7. Semenov D.E., Lushnykova E.L., Nepomnyashchykh L.M., Osobennosty antratsyklynovoy modeli kardyomyopaty: snyzhenye synteza belka, narushenye vnutykletochnoy reheneratsyy y beznekroticheskaya elymynatsyya kardyomyotsytov. Byulleten eksperymentalnoy byolohyy y medytsyny. 2001, no. 5, pp. 594–600.
8. Chadaev V.E., Kuzmyna O.A., Kuzmyna Y.Yu. [y dr.], Etycheskiye pryntsypy pry rabote s laboratornyimi zhyvotnyimi. Eksperymentalna i klinichna medytsyna, 2008, no. 3, pp. 162–164.
9. Ashrafian H., Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications cardiomyopathies: therapeutics based on molecular phenotype. J Am. Coll. Cardiol., 2007. Vol. 27, no. 49, no. 12, pp. 1251–1264.
10. Andion M., Molina B., Gonzalez-Vicent M. et al., High-dose busulfan and cyclophosphamide as a conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in childhood non-hodgkin lymphoma patients: a long-term follow-up study. J. Pediatr. Hematol. Oncol., 2011. Vol. 33(3), pp. 89–91.
11. Rezvanfar M.A., Sadrkhanlou R.A., Ahmadi A. et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Hum. Exper. Toxicol., 2008. Vol. 27, pp. 901–910.

### Рецензенты:

Гнатюк М.С., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского», г. Тернополь;

Герасимюк И.Е., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной анатомии ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского», г. Тернополь.

Работа поступила в редакцию 17.10.2013.