

УДК: 616.995.7-612.002:023/26-579.881

МАКРОМІКРОСКОПІЧНА ТА УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРЦЯ ТА ЙОГО СУДИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЕРЛІХІОЗНІЙ ІНФЕКЦІЇ У МИШЕЙ

Похил С.І., Торяник І.І., Тимченко О.М.,
Чигиринська Н.А., Костира І.А., Килипко Л.В.

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України»
(ДУ «ІМІ НАМН»)

Вступ

Клінічна анатомія серцево-судинної системи сприяла тому, що гематогенний шлях передачі інфекційних збудників став провідним, а подекуди, головним, у разі розвитку її тяжких інфекційних ускладнень. Однак, деталізація морфологічних ознак інфекційної кардіопатології містить безліч питань. Останнє спричинене не відсутністю даних на користь структурно-функціональної специфіки серцевого м'язу, коронарних судин, особливостей патогенезу сучасної кардіоміопатії, кардіосклерозу, а складністю діагностичного алгоритму та структурного аналізу етіологічних факторів інфекційної патології серцево-судинної системи [1]. За висновками фахівців відома на сьогодні інфекційна кардіопатологія (міокардити) завжди надійно приховувалась за функціональними захворюваннями, сприяла збільшенню тяжкості супутніх захворювань, пригнічувала процеси реабілітації, вносила суттєвий внесок у зростання летальності серед кардіологічних хворих. Реєстрація випадків з підозрою на ерліхіозну інфекцію являється тому надійним підтвердженням та потребує всебічного вивчення з подальшою ґрунтовною морфологічною аргументацією [2, 3]. Отже, актуальність проблематики, що стосується дослідження макро-мікроскопічних та ультрамікроскопічних змін у серцевому м'язі та його судинах у нелінійних імунокомпрометованих тварин (мишей) за умов експерименту, не викликає жодного сумніву.

Мета дослідження: вивчити макро-мікроскопічну та ультрамікроскопічну характеристику серця та його судин при ерліхіозній інфекції (ЕІ) у мишей.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження стали шматочки серцевого м'язу та його судин (0,5×0,5 мм) у самців та самиць нелінійних імунокомпрометованих мишей, віком 4-6 тижнів, вагою 18-20 г. За для об'єктивізації результатів морфологічного дослідження аналізу піддавали зразки лише від тих тварин, у яких наявність ерліхіозної інфекції було попередньо підтверджено за допомогою ПЛР (полімеразної-ланцюгової реакції) [4, 5, 6]. Дослідження включало групи

інтактного контролю та імунокомпрометованих особин із встановленою анаплазмозної інфекцією. Групою порівняльного контролю (імунокомпрометованих тварин, де у ролі цитостатику виступав препарат з цитотоксичною, протипухлинною та імунодепресивною активністю- циклофосфан - міжнародна та хімічна назва: Cyclophosphamide) невілювали як такою, що результати її були представлені у друці попередньо [7].

Морфологічним дослідженням обов'язковим чином підлягали некропсії у вигляді шматочків органів-мішеней (серце) лабораторних тварин (білі нелінійні миші), інфікованих зразками біологічного матеріалу зі збудниками ЕІ інфекції [8]. Для отримання матеріалу експериментальних тварин моралізували, піддавали стандартному розтину, проводили детальну ревізію органів порожнин тіла останніх, застосовували ресурси макро-мікроскопічного препарування.

Розтин тварин та ревізія органів грудної, черевної порожнини. Тварин моралізували стандартно (протягом 15-20 хв) парами ефіру для наркозу "Etheris pro narcosi", 40%, 150 мл фірми "Здоров'я трудящих, Харків, Україна" (шляхом їхнього передозування). Для зазначеної мети використовували скло-керамічний лімічно стійкий лабораторний посуд (ексикатор лабораторний, об'ємом 1000 мм³, фірми Liebsa, Німеччина) із щільно притертими кришки. Факт смерті встановлювався лікарем ветеринарної медицини за клінічними ознаками зупинки серця, наявності гострої серцево-судинної та дихальної недостатності. За цим на депільованій поверхні передньої стінки грудної порожнини виконувався розтин, довжиною 2-2,5 см безпосередньо від верхнього краю incisura sterni до верхньої межі tuberculum pubicum. Акуратно відсепаровували cutis зазначених зон, tunica adiposa subcutanea, m.m. serratus anterior superior et inferior, rectus, externus, internus, transversus obliquus abdominis, fasciae; виконували широкий розтин плеври та очеревини. Детально, поверх за поверхом, визначали особливості топографоанатомічних домінант голо-, скелето-, син-, вазотопію. За цим проводили ретельну ревізію органів грудної порожнини, орієнтуючись на магістральні судини відповідних областей (arcus aortae, aorta thoracica, abdominalis, v.v. cavae superior et inferior, v. porta, v.v. azygos, hemiazygos, truncus lymphaticus), обережно, намагаючись не ушкодити, видаляли останні.

Макро-мікроскопічне дослідження базувалось на принципах макроскопічного аналізу. Сутність останнього зводилась до структурно- функціональної характеристики макро-мікроскопічних показників органів-мішеней піддослідних тварин (білі нелінійні лабораторні миші) експериментальних та групи інтактного контролю, що доповнювалось органолептичними, біомеханічними, мікротопографічними,

органометричніми даними. У цілому дослідження складалось із трьох етапів:

- оцінка зовнішньої та макроструктури органу у кожній із експериментальних груп;
- оцінка мікроструктури органу кожної експериментальної групи;
- оцінка органометричних показників у тварин кожної із експериментальних груп.

Органолептично визначались зовній вигляд органу (ушкодження цілісності структури, мацерації, артефакти, кальцифікати, крововиливи), колір (гіперрагічний, ксенотичний, цианотичний, блідий), зміни у формі, об'ємі (атрофія, мегалія, набряк, гідратація, гіпо-, гіперволія), наявність стороннього, неприємного запаху (гнилісний, кислий, бродильний, гіркавий).

Біомеханічні показники зводились до визначення тургору органу, щільності, пружності, пластичності.

Мікрортопографічні особливості обумовлювались встановленням змін у співвідношеннях паренхіматозного та стромального компонентів, коркової та мозкової речовини; сегментарної будови органу, мікросин-, голо та вазотопії.

Органометричні дані визначали за стандартними методиками, у суворій відповідності до принципів медичної морфометрії.

Об'єктами макро- мікро- та ультрамікроскопічного досліджень стали шматочки серця (5×5×5 мм) самців та самок нелінійних мишей, віком від чотирьох до семи тижнів, вагою від 11 до 18 г, що утримувались у стандартних умовах "клімат-контроль" віварію ДУ "ІМІ НАМН".

Гістологічні методи дослідження

При виконанні мікроскопічного (гістологічного) аналізу структурних змін у органах піддослідних лабораторних тварин матеріал фіксували у 12 % розчині формаліну на фосфатному буфері з рН = 7,0-7,2 при $t=(18-20)^\circ\text{C}$ у скло-керамічному посуді із щільно притертими корками. Далі зразки секційного матеріалу зневоднювали методом проведення через батареї етилових спиртів підвищеної концентрації від 30 % до абсолютного спирту (100 %) включно, заливали у смоли (парафін, целоїдин за потребами завдання). Із парафінових, целоїдинових блоків виготовляли серії гістологічних зрізів, товщиною 10-15 мкм. Препарати різали за допомогою санного мікротому в одній із трьох взаємно перпендикулярних площин (фронтальній, горизонтальній, сагітальній), що надавало змогу більш ретельно вивчити будову речовини серця, мікросудин останнього, співвідношення окремих структур (cito-, міелоархитектоніку, локальні вогнища клітинних популяцій). Отримані зрізи забарвлювали у відповідності до ідеї та мети експерименту, завдань та головної стратегії пошуку (гематоксиліном-еозином, азор-еозином, за Ван-Гізеном, Браше, імпрегнували сріблом).

Мікроскопічний аналіз матеріалу проводили із застосуванням оптичної системи мікроскопу ЛОМО (×300; ×600; ×1350). Дослідженню піддавали серце, мікросудини та їхні сплетіння. У порівняльному аспекті характеризували контрольні зразки (від інтактних та імунокомпрометованих, не заражених біологічним матеріалом тварин) із експериментальними, де особливої уваги надавали вивченню феноменів інфільтрації, діapedезу еритроцитів, розм'якшення тканини, набряків, некрозів. Конкретизації належали зміни у вісцеральному мікросудинному руслі. Обов'язковій констатації піддавали факти наявності чи відсутності стазу, тромбозу, змін агрегатних властивостей еритроцитів, сладжування останніх. У разі виявлення схожих морфологічних ознак статистичну оцінку останніх проводили сумарно. Узагальнені результати зводили до уніфікованої схеми, за порівняльним аналізом яких будували висновки.

Метод трансмісійної електронної мікроскопії

Метод електронної трансмісійної мікроскопії був використаний для виявлення ультрамікρο-структурних змін у серці експериментальних тварин (нелінійних мишей). Ключові фрагменти зазначених досліджень виконувались на базі відповідного підрозділу науково-дослідної лабораторії кафедри патоморфології Харківського національного медичного університету МОЗ України (завідувач кафедри: професор, доктор медичних наук Марковський В.Д.). Для проведення електронної трансмісійної мікроскопії шматочки вищезазначеного органу, розміром (0,5×0,5) см, фіксували у 2 %-у розчині глутарового альдегіду на фосфатному буферному розчині з рН = 7,3-7,4, потім їх фіксували у 1%-у оксиді осмію на фосфатному буферному розчині рН = 7,3-7,4, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, ацетоні, заливали в епон-аралдит. Отримані блоки міцно фіксували за допомогою утримувача, надалі різали (у двох-трьох взаємно перпендикулярних площинах), застосовуючи можливості ультрамікротому (ООО "Сумський оптико-механічний завод", Україна). Ультратонкі зрізи контрастували ураніл-ацетоном, цитратом свинцю, досліджували при збільшенні (×3600; ×6000) за допомогою електронної трансмісійної мікроскопії "Olympus" ("Siemens", Німеччина). Ідентичні морфологічні зміни оцінювали сумарно.

Результати та їх обговорення

Макроскопічне дослідження серця довело стабільність його анатомо-топографічної будови, сталість скелето, син, голо, вазотопії. Орган звичайної конусоподібної форми, розташований у передньому середостінні, орієнтований з праворуч-наліво, зверху-вниз, без ушкоджень поверхневої будови. Перикард цілісний за своєю структурою, з чіткою межею. Серце з характерною макроскопією, темно-червоного забарвлення, пружне, щільне, без помітних дефектів шарів стінок ad oculi. Порожнини передсердь та

шлуночку добре візуалізовані, стінки камер структуровані, без ознак розшарувань, склерозу, кальцинозу, крововиливів. На дотик стінки камер серця пружні, щільні, шари з чіткими контурами, на поперековому зрізі містять відповідним чином окреслені отвори судин. Останні містять конгломерати згустків крові. Оболонки гладкі, блискучі, без ушкоджень поверхневої архітекtonіки. У окремих випадках вони надто пружні, крихкотливі, містять незначну кількість серозного ексудату.

Гістологічно: мікроскопічна будова тканин перикарду, стінок камер серця відповідає статеві-віковим показникам експериментальних нелінійних мишей. Серозна оболонка перикарду дещо витончена, утворена клітинами епітеліального походження, без склеротичних вогнищ. Інтракапсулярні простори із певним вмістом серозного ексудату, гіперемічні, в окремих випадках з ознаками мілкоточечних, краплинних крововиливів, без вогнищ кальцинозу та дегенеративно-деструктивних зон. Запальні процеси виражені помірно, без ознак генералізації, тенденцій до спричинення та розвитку гіпопластичних процесів, глибокої деструкції, некрозу. Зазначені вище феномени носили локальний характер. Яскравим підтвердженням чого стали препарати окремих спостережень, що нараховували зони вогнищевої дистрофії, заміни епітеліального прошарку з'єднанотканинним компонентом, подекуди пре склеротичні процеси, метаморфоз епітеліальних клітин. У відповідь на виявлені у серіях препаратів зміни відбувалась активація запальних процесів з їхнім подальшим поглибленням та мікротопографічною генералізацією вогнищ. Стадійність запалення зберігалась, інфільтративна фаза (лімфо-лейкоцитарна, у переважній більшості зразків), поступово витиснювалась проліферацією лімфоїдного компоненту підслизових мембран. У найбільш позначених випадках запальні реакції розповсюджувались на сталій з'єднанотканинний компонент оболонкових структур, окремих судин мікроциркуляторного русла, спричиняючи набряк, паравазальний випіт ріднини, геморагії. На збільшенні у $\times 600$; $\times 1350$ добре позначались у таких зразках розшарування стінок судин, гідратація серицитів, ушкодження контактів між ними та ендотеліальним шаром клітин, набухнення ретикулярних волокон. На поперекових зрізах судин у згаданий період характерні картини тромбоемболії, стазу, що, без сумніву, пояснює загальну картину змін у перикарді на тлі розвитку ЕІ.

Морфологічний аналіз гістологічних зрізів серця довів, що його загальна внутрішня будова відповідає показникам фізіологічної норми, шари стінок добре диференційовані, епікард, міокард, ендокард відповідним до мікротопографії органу чином визначені. Цитоархітекtonіка без грубих порушень, доволі стала. Пригранична межа кожного із шарів чітка, виразна. Однак, не без ознак змін об'єму прилеглих до неї структур (набряк, локальні крововиливи). Останні факти не мали узагальнюючий характер.

Міокард - типовий за будовою шарів стінок. Чітко визначений у кожній із досліджених камер серця, без порушень цілісності. Циркулярний, повздовжній, косий прошарки набряклі, дещо крихкотливі, з елементами серозного та (у 2-х випадках) геморагічного ексудату, дистрофічні. М'язові веретена гіпохромні, подекуди збільшені у об'ємі. Проміжки між деякими із них заповнені фрагментами з'єднанотканинного компоненту. Перетинки диференційовані не чітко. На збільшеннях $\times 300$; $\times 600$: типові ознаки кардіоміопатії, кардіодистрофії, склерозу. Лімфоїдний компонент з ознаками гіперпластичних процесів, проліферації (не виключена Т-лімфоцитарна активність), активації Т-клітинної ланки імунітету, інтенсивного накопичення плазматичних клітин з формуванням «розеток» (плазматична клітина по центру, лімфоцити з периферії). Мікроциркуляторне русло з типовими для запальних процесів змінами: тромбоз, стаз, порушення мікроциркуляції. Останні тягли за собою трофічні зміни, дистрофію, апластичні явища. У найбільш виразних випадках це призводило до локальних деструктивно-дегенеративних змін та поступового розвитку некрозу.

Субмікроскопічно: набряк цитоплазми та її органел (рибосоми, мембранний компонент ендоплазматичного ретикулу), гіперхроматоз, пікнотичні зміни, поява еухроматину у ядрах клітин. Метаморфоз із зміною ядерно-цитоплазматичних співвідношень. Чисельні розриви мембран, порушення щільності та цілісності міжклітинних контактів, діapedез клітин.

Висновки:

Отже, вплив ерліхіозної інфекції на серцевий м'яз та його судини на тлі попередньо проведеної імунокомпрометації позначався розвитком макромікроскопічних та ультрамікроскопічних змін: набряк, дистрофія, деструктивно-дегенеративні зміни міокарду з розволокненням з'єднанотканинних компонентів, виникненням мукоїдного, фібриноїдного набухання, міопатії, кардіосклерозу, тромбозами, стазом, розладами мікроциркуляції.

References

1. Winslow, G. M. Infection of the laboratory mouse with the intracellular pathogen *Ehrlichia chaffeensis* [Text] / G. M. Winslow, E. Yager, K. Shilo, D. N. Collins, F. K. Chu // *Infect. and Immun.* - 2003. - Vol. 71, No. 8. - P. 4229-4237.
2. Feng, H. M. Mechanisms of immunity to *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis [Text] / H. M. Feng, D. H. Walker // *Infect. and Immun.* - 2004. - Vol. 72, No. 2. - P. 966-971.
3. Ganta, R. R. Differential clearance and immune responses to tick cell-derived macrophage culture-derived *Ehrlichia chaffeensis* in mice [Text] / R. R. Ganta, C. Cheng, E. C. Miller [et al] // *Infect. Immun.* - 2007. - Vol. 75, No. 1. - P.135-145.

4. Bakaletz, L. O. Developing animal models for polymicrobial diseases [Text] / L. O. Bakaletz // Microbiology. – 2004. – Vol. 2, No. 7. – P. 552-568.
5. Sotomayor, E. A. Animal model of fatal human monocytotropic ehrlichiosis [Text] / E. A. Sotomayor, V. L. Popov, H.-M. Feng [et al.] // Am. J. Pathol. - 2001. - No. 158. - P. 757-769.
6. Kawahara, M. Comparison of Ehrlichia muris strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and animals with E. muris antigen [Text] / M. Kawahara, T. Ito, C. Suto [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 1999. - Vol. 37, No. 4. - P. 1123-1129.
7. Pokhil S. I. Structural and functional parallels of the anaplasmosis manifestations influence on cardiac muscle of unlinear immunocomprometive laboratory mice in experiment [Text] / I. I. Torianik, N. A. Chigirinsky, I. A. Kostyria, T. A. Kruglova // Ukrayins'kiy medychniy al'manach, – 2012. – Vol. 15, № 5. – P. 213-215.
8. Vozianova, Zh. I. Infectious and parasitic diseases [Text] // Kyiv. – Zdorov'ya. - 2001. – V. 2. – 656 p.

УДК: 616.995.7-612.002:023/26-579.881
МАКРОМІКРОСКОПІЧНА ТА УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРЦЯ ТА ЙОГО СУДИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЕРЛІХІОЗНІЙ ІНФЕКЦІЇ У МИШЕЙ

Похил С.І., Торяник І.І., Тимченко О.М., Чигиринська Н.А., Костиця І.А., Килипко Л.В.

В статті представлена характеристика макромікроскопічних, ультрамікроскопічних змін у серцевому м'язі та його судинах у нелінійних імунокомпрометованих мишей при ерліхіозній інфекції за умов експерименту. Встановлена наявність деструктивно-дегенеративних порушень, ознак кардіоміопатії, кардіосклерозу у серцевому м'язі експериментальної групи тварин. Виявлені наслідки дезорганізації ендотеліального шару коронарних судин, явища стазів, тромбозів.

Ключові слова: макромікроскопічні, ультрамікроскопічні зміни, самці та самиці нелінійних імунокомпрометованих лабораторних мишей, ерліхіоз, серцевий м'яз та судини, кардіоміопатія, стаз, тромбоз.

УДК: 616.995.7-612.002:023/26-579.881
МАКРОМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ И УЛЬТРАМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРДЦА И ЕГО СОСУДОВ ПРИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭРЛИХИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ

Похил С.И., Торяник И.И., Тимченко Е.Н., Чигиринская Н.А., Костиця И.А., Килипко Л.В.

В статье представлены характеристика макромикроскопических и ультрамикроскопических изменений в сердечной мышце и её сосудах у самцов и самок нелінійних імунокомпрометированных лабораторных мышей при эрліхіозной инфекции в условиях эксперимента. Установлено наличие деструктивно-дегенеративных нарушений, признаков кардиомиопатии, кардиосклероза в сердечной мышце экспериментальной группы животных. Выявлены последствия дезорганизации эндотелиального слоя сосудов, явления стазов, тромбозов.

Ключевые слова: макромикроскопические, ультрамикроскопические изменения, самцы и самки нелінійних імунокомпрометированных лабораторных мышей, эрліхіоз, сердечная мышца и сосуды, кардиомиопатия, стаз, тромбоз.

УДК: 616.995.7-612.002:023/26-579.881
MACROMICROSCOPIC AND ULTRAMICROSCOPIC CHARACTERISTICS OF THE HEART AND ITS BLOOD VESSELS IN MICE EHRLICHIOSIS INFECTION

Sergey I. Pokhil, Inna I. Torianik, Olena M.

Timchenko, Nila A. Chigirinsky, Irina A. Kostyria, Ludmila V. Kylypko

The macromicroscopic, ultramicroscopic studying change's in the heart and its blood vessels in unlinear immunocomprometive laboratory male and female mice with the experimental ehrlichiosis is presented in this article. The cardiac destructive and degenerative changes, cardiomyopathy, cardiosclerosis had been established in experimental animal group's. The blood vessels endothelial lieyr disorganization, stasis, thrombosis has been noted.

Key words: macromicroscopic, ultramicroscopic changes, the unlinear immunocomprometive laboratory male and female mice, ehrlichiosis, cardiac muscles and blood vessels, cardiomyopathy, stasis, thrombosis.