УДК 611.12:611.018:611.013:576.311.348.3

ХАРАКТЕРИСТИКА ЩІЛЬНОСТІ УПАКОВКИ МІОФИБРИЛ І ЯКІСНИХ ЗМІН УЛЬТРАСТРУКТУРИ ШЛУНОЧКОВОГО МІОКАРДА ЕМБРІОНА ЩУРІВ ПРОТЯГОМ 14-18-Ї ДОБИ ПРЕНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ У НОРМІ ТА ПІСЛЯ ДІЇ АЛКОГОЛЮ

Марченко Д.Г., Філімонова Л.А.
Дніпропетровська медична академія МОЗ України

Стаття присвячена аналізу структурних і функціональних особливостей розвитку скоротливого апарата міокарда в пренатальному онтогенезі. Механізми міофібрилогенезу в різних відділах серця і зонах серцевої стінки здійснюються принципово подібним чином, проте відомості про ступінь їх виразності, співвідношення і швидкість перебігу в різних ділянках міокарда мають суперечливий характер. Завдяки аналізу багатьох морфологічних та стереометричних характеристик існує можливість отримати найбільш повний обсяг даних щодо формування окремих структур скоротливого апарата. В статті розкривається питань щодо формування компонентів міофібрилярного апарата як у нормі, так і за умов впливу ендо- та екзогенних факторів.

Ключові слова: алкоголь, міокард, міофібрили, міофібрилогенез, скоротливий апарат.

Постановка проблеми. Серце - один з перших органів, який починає функціонувати під час ембріонального розвитку. Останні дані про розвиток серця дають можливість покращити діагностику патологій серцево-судинної системи ще в ембріональному періоді. Однак, незважаючи на численні дослідження в області кардіогенезу, захворювання серцево-судинної системи все ще залишаються головною причиною смертності в Україні і у світі в цілому, тому вивчення процесу формування скоротливого апарата є важливим базисним аспектом для кардіології. Скоротливий апарат серця являє собою високоорганізовану структуру, яка включає в собі міофібрили, елементи Т- та L-систем. Міофібрили посмугованого м'яза утворені групою білків, розташованих у спеціальних одиницях або саркомерах, які у свою чергу складаються з окремих субодиниць [1; 5; 8; 10]. Хоча саркомер поперечно-посмугованого м'яза змінюється за будовою та складом білків по всій довжині міофібрили, існують три головні компоненти: тонкі нитки, товсті нитки і Z-диски, кожний з яких формується за допомогою численних взаємодій з білками, які беруть участь у скороченні. Міофібрилогенез – це складний процес, який являє собою утворення і розподіл міофібрил у кардіоміоциті, формування скоротливих білків і утворення саркомерів [4; 11]. Порушення на одному з цих етапів розвитку ембріонального серця під дією ушкоджуючих речовин можуть призвести до формування численних патологій серцево-судинної системи, що надалі може викликати летальний результат.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Хоча дослідження останніх років дозволили отримати дані про основні етапи розвитку скорочувального апарату серця, механізм його енергозабезпечення [1; 8; 11], однак формування і розподіл міофібрил у кардіоміоцитах під впливом пошкоджуючих факторів залишається предметом значних суперечок. Складнощі полягають, очевидно, в ідентифікації подій міофібрілогенеза після введення отруйних речовин експериментальним тваринам. Нове вирішення актуальної задачі, що пов'язане з механізмом впливу етанолу на серця ембріонів, можна використати як базові знання для подальшого вивчення патологій та захворювань серцево-судинної системи, що пов'язані з тератогенною дією алкоголю.

Метою дослідження є визначення щільності упаковки міофібрил у різних зонах шлуночкового міокарда та надати якісну характеристику змінам ультраструктури скоротливого апарата серця щурів на ембріональному етапі розвитку.

Виклад основного матеріалу дослідження. Матеріали та методи. В якості об'єкта дослідження були обрані серця білих безпородних щурів в ембріональному періоді розвитку. Лабораторних тварин утримували в стандартних умовах [6]. Дослідження було проведено відповідно до законодавства України (Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12.2009 року № 1759-VI), а саме використовувалися ті розділи і положення, що стосуються використання тварин у наукових дослідженнях. В якості моделі експеримента була застосована модель, описана у статті «Animal models of excessive alcohol consumption in rodents» [3]. Було проведено декілька етапів отримання щурами етанолу у різній концентрації та у різний проміжок часу. Тривалість першого етапу становила два тижні. Протягом цого часу вони знаходилися на звичайній дієті, але замість води у поїлках знаходився 5% розчин етанолу. На другому етапі, який тривав також 2 тижні, 5% розчин етанолу замінювався 15% розчином. Після запліднення починався третій період, у якому 15% розчин етанолу замінювався на 20% розчин. Даний період тривав 2 тижні після запліднення. При цьому була використана стандартна процедура підготовки тваринного матеріалу до електронномікроскопічних досліджень [7; 9]. Дослідження проводили в лабораторії електронної мікроскопії ДЗ «ДМА МОЗ України» за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 («SELMI», Україна) при напрузі прискорення 75-85 кВ і первинних збільшеннях від 1500 до 80000.

Кількісну оцінку ультраструктурних змін проводили методом підрахунку морфометричного показника - щільності упаковки міофібрил. Розрахунок морфометричного показника виробляли за методом Автанділова [2]. Морфометричні дані

статистично оброблялися. Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили з урахуванням параметричного t-критерію Стьюдента. Для більш швидкого підрахунку було використано ліцензійну програму Statistica.

Для аналізу впливу етанолу на елементи скоротливого апарата на органному рівні вивчали морфологічні характеристики субепікардіальної, інтрамуральної і субендокардіальної зон стінки лівого та правого шлуночків, а також лівої та правої частин міжшлуночкової перетинки.

Результати та обговорення. Починаючи з 14-ї доби ембріонального онтогенезу, найбільші зміни такого морфометричного показника, як щільність упакування міофібрил після дії етанолу, були характерні для субендокардіальної зони. Введення етанолу сприяло гальмуванню наростання усіх процесів міофібрилогенезу, у тому числі збільшенні кількості міофібрил на об'єм кардіоміоцитів, і тому даний морфометричний показник у порівнянні з нормальним розвитком у СЕН зменшувався на 42,9% ($p<0,05$) у ЛШ та на 41,7% ($p<0,05$) у ПШ (рис. 1).

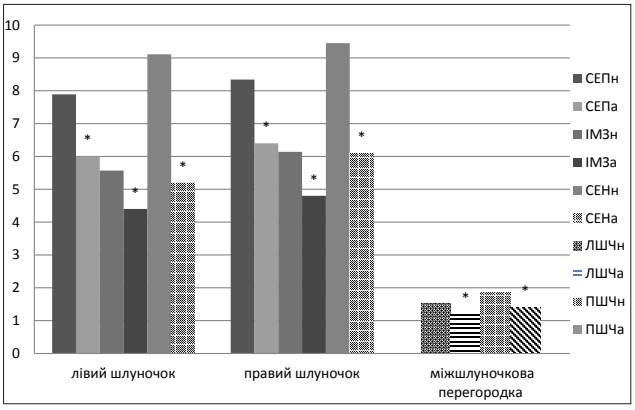

Рис. 1. Щільність упакування міофібрил (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів різних зон шлуночкового міокарда щурів на 14-у добу пренатального онтогенезу в нормі та після дії алкоголю

Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від норми. СЕП (СЕПн – норма, СЕПа – алкоголь) – субепікардіальна зона; ІМЗ (ІМЗн – норма, ІМЗа – алкоголь) – інтрамуральна зона; СЕН (СЕНн – норма, СЕНа – алкоголь) – субендокардіальна зона; ЛШЧ (ЛШЧн – норма, ЛШЧа – алкоголь) і ПШЧ (ПШЧн – норма, ПШЧа – алкоголь) – лівошлуночкова і правошлуночкова частини міжшлуночкової перегородка.

Протягом 14-ї доби ембріонального розвитку у кардіоміоцитах як експериментальної групи так і групи контролю (норма) спостерігалися лише невеликі осередки саркомерогенезу. Міофібрили, які утворювали невеликі хаотично розташовані пучки по 6-8 ниток у товщину, зосереджені в основному на периферії кардіоміоцита. Дуже часто у кардіоміоцитах зустрічались актинові та міозинові філаменти, які не були включені до складу міофібрил. Також частою знахідкою на електронограмі були пучки міофіламентів, прикріплених до зон злипання зародкових вставних дисків. Однак, у кардіоміоцитах шлуночкового міокарда експериментальних тварин, на відміну від норми, міофібрили розташовувались більш хаотично і на даний період розвитку ще не мали чіткого упорядкування. Серед цих структур траплялися міофібрили, які не мали поперечної посмугованості. У цих клітинах порушувалась цілісність і відбувався лізис та стоншення окремих саркомерів. Саркомери деяких міофібрил були розщеплені у зоні одних з основних білків – титина та небуліна. Тобто дані білки були найбільш чутливими до дії етанолу.

Гранулярна й агранулярна ендоплазматичні сітки на чотирнадцяту добу розвитку виражені слабо, що було характерним і для нормального розвитку шлуночкового міокарда ембріонів щурів. Гранулярна ендоплазматична сітка була представлена короткими трубочками, агранулярна – дрібними везикулами. Т-система скоротливого апарата кардіоміоцитів була слабо розвинена і представлена лише невеличкими сферичними структурами.

На 16-у добу розвитку патологічні зміни, викликані впливом алкоголю на шлуночковий міокард ембріонів щурів, спричинили затримку темпів формування елементів міофібрилярного апарата, що було найбільш характерним для субендокардіальної зони, і характеризувалося значним зниженням, у порівнянні з нормою, значенням даного параметра: щільність упакування знижувалась у СЕН на 40,6% у ЛШ та на 40,8% у ПШ (рис. 2).

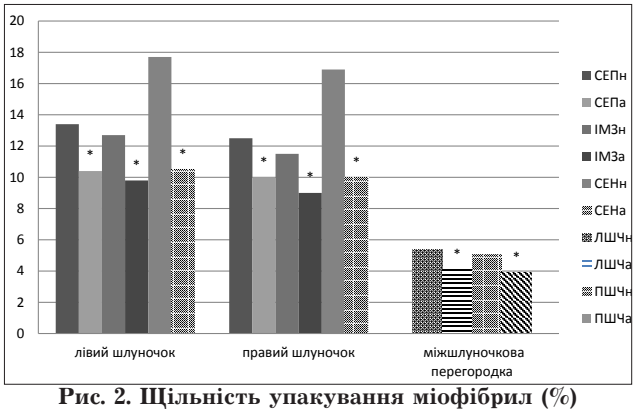

Рис. 2. Щільність упакування міофібрил (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів різних зон шлуночкового міокарда щурів на 16-у добу пренатального онтогенезу в нормі та після дії алкоголю

Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від норми. СЕП (СЕПн – норма, СЕПа – алкоголь) – субепікардіальна зона; ІМЗ (ІМЗн – норма, ІМЗа – алкоголь) – інтрамуральна зона; СЕН (СЕНн – норма, СЕНа – алкоголь) – субендокардіальна зона; ЛШЧ (ЛШЧн – норма, ЛШЧа – алкоголь) і ПШЧ (ПШЧн – норма, ПШЧа – алкоголь) – лівошлуночкова і правошлуночкова частини міжшлуночкової перегородки.

Для змін в ультраструктурі міокарда експериментальних тварин , як і на 14-у добу розвитку, було характерне хаотичне, невпорядковане розташування міофібрил. Відбувався лізис деяких актинових та міозинових філаментів, при цьому спостерігалося стоншення деяких саркомерів. Зустрічались поодинокі міофібрил зі зміненою Z-лінією, вона ставала менш вираженою, а у деяких випадках зовсім зникала. А- та І-диски були слабо виражені, що не було характерним для нормального розвитку.

Протягом 18-ї доби зміни в ультраструктурі міокарда були більш видимі на електронограмах кардіоміоцитів. Це явище було пов'язане з

майже сформованими міофібрилами та чітким розподілом на А-, І-диски, М- та Н-лінії, які спостерігалися при нормальному розвитку скоротливого апарата шлуночкового міокарда ембріонів щурів.

Аналіз електронограм шлуночкового міокарда експериментальної групи у порівнянні з нормою показав, що збільшувалась частка міофібрил, які мають значні відмінності у своїй ультраструктурі. У кардіоміоцитах експериментальних тварин міофібрили виявлялися протягом усієї цитоплазми, однак розподіл міофібрил по кардіоміоциту був нерівномірний, зустрічалися ділянки, у яких були зовсім відсутні впорядковані актинові та міозинові міофіламенти, спостерігалася часткова фрагментація деяких міофібрил з фрагментацією Z-дисків (рис.4,5). Було чітко видно різну товщину міофібрил. Так міофібрили, які мали товщину в 2 рази більшу від норми, межували з міофібрилами, товщина яких була в 2-3 рази менша за збільшені структури. Ці зміни не були характерні для нормального розвитку (рис. 3).

Дещо змінюється і величина щільності упакування в різних зонах шлуночкового міокарда. Після 18-ї доби ембріонального розвитку шлуночкового міокарда щурів після закриття міжшлуночкового отвору відбувається збільшення навантаження на лівий шлуночок. При цьому найбільшого тератогенного ефекту після цієї доби зазнає саме ЛШ. Значення щільності упакування міофібрил у субепікардіальній та інтрамуральній зонах шлуночкового міокарда набирали темпи при нормальному розвитку, і тому саме на ці зони етанол впливає найбільше.

Висновки. Протягом пренатального розвитку у серцях щурів відбулося закономірне зменшення величини щільності міофібрил на об'єм кардіоміоцитів (щільність упакування міофібрил).

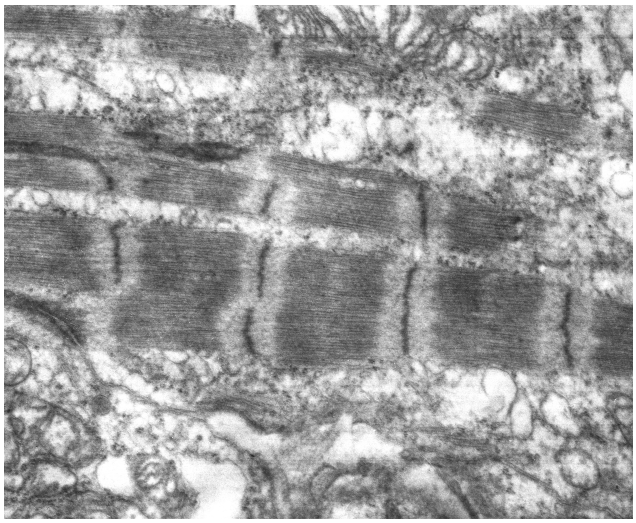

Рис. 3. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. Фрагментація Z-дисків. Електронограма.×10000

Після дії етанолу поряд зі зниженням величин даного параметра відбулися зміни в ультраструктурі самого скоротливого апарата. При цьому хронічна алкогольна інтоксикація спричинила неспецифічні якісні зміни в усіх структурних компонентах шлуночкового міокарда серця – міофібрилах, Т-системі, мітохондріях. Вираженість змін у даних структурах залежить від зони та терміну розвитку ембріона. Найбільш виражені зміни відбулися на ранніх етапах розвитку і викликані прямою дією етанолу.

Перспективи подальших розробок пов'язані з вивченням формуванням скоротливого апарата кардіоміоцитів щурів після дії етанолу на етапах постнатального онтогенезу.

Список літератури:

1. Allwork S.P. Heart Muscle: Ultrastructural Studies. J. Anat. 1988;159:200–206.
2. Avtandilov G.G. Meditsinskaya morfometriya: rukovodstvo [Medical morphometry: guideline]. Moscow: Meditsima; 1990. 384 p. Russian.
3. Becker H.C. Animal models of excessive alcohol consumption in rodents. Curr Top Behav Neurosci. 2013;13:355–377.
4. Du A., Sanger J.M., Sanger J.W. Cardiac myofibrillogenesis inside intact em-bryonic hearts. Developmental Biology. 2008;318:236–246.
5. Ehler E., Gautel M. The sarcomere and sarcomerogenesis. Adv Exp Med Biol. 2008;642:3–14.
6. Hedrich H.J. The Laboratory Mouse. Second Edition. London: Academic Press; 2012. 845 p.
7. Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols. Totowa, New Jersey : Humana Press Inc; 2007. 608 p.
8. Manasek F.J. Embryonic development of the heart. Embryol. exp. Morph. 1969; 22(3):333–348.
9. Mironov A.A., Komissarchik Yu.Ya., Mironov V.A. Metodyi elektronnoy mikroskopii v biologii i meditsine: Metodicheskoe rukovodstvo. [Electron microscopy methods in biology and medicine : Methodological Guide]. St. Petersburg: Science; 1994. 400 p. Russian.
10. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyocytes. Cardiovascular Research. 2008;77:659–666.
11. Sanger J.W., Kang S., Siebrands C.C. How to build a myofibril. Journal of Muscle Research and Cell Motility. 2005;26:343-354.

Марченко Д.Г., Филимонова Л.А.
Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛОТНОСТИ УПАКОВКИ МИОФИБРИЛЛ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕ-НЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЖЕЛУДОЧКОВОЙ МИОКАРДА ЭМБРИОНОВ КРЫС В ТЕЧЕНИЕ 14-18-Х СУТОК ПРЕНАТАЛЬНОЙ ОНТОГЕНЕЗА В НОРМЕ И ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ

Аннотация
Статья посвящена анализу структурных и функциональных особенностей развития сократительного аппарата миокарда в пренатальном онтогенезе. Механизмы миофибриллогенеза в различных отделах сердца и зонах сердечной стенки осуществляются принципиально подобным образом, однако сведения о степени их выраженности, соотношение и скорость течения в различных участках миокарда имеют противоречивый характер. Благодаря анализу многих морфологических и пространственных характеристик существует возможность получить наиболее полный объем данных по формированию отдельных структур сократительного аппарата. В статье раскрывается вопросов о формировании компонентов миофибриллярного аппарата как в норме, так и при воздействии эндо- и экзогенных факторов.
Ключевые слова: алкоголь, миокард, миофибриллы, миофибриллогенез, сократительный аппарат.

Marchenko D.G., Filimonova L.A.
Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine

CHARACTERISTIC OF THE PACKING OF MYOFIBRIL AND QUANTITY OF CHANGING VENTRICULAR ULTRASTRUCTURE OF MYOCARDIA EMBRYO RATS DURING 14-18-TH DAY PRENATAL ONTOGENESIS IN NORM AND AFTER INFLUENCE OF ALCOHOL

Summary
The article describes question of structural and functional features of the contractive apparatus development of myocardium in the prenatal and postnatal ontogenesis. Miofibrillogenesis mechanisms in different heart chambers and areas of the cardiac wall are primarily similar, but information on their degree of gravity, balance and speed of the various myocardial sections are controversial. Thanks to analysis of numerous morphological and stereometric features may be able to find the most complete amount of information about the formation of certain structures of the contractive apparatus. The article describes question of the formation of the myofibrillar apparatus components in both normal and under the influence of endogenous and exogenous factors remains significant today.
Keywords: alcohol, myocardium, myofibril, miofibrillogenesis, contractive appa-ratus.