

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК 611.12:611.018:611.013:576.311.348.3

ЯКІСНІ ЗМІН У УЛЬТРАСТРУКТУРІ ШЛУНОЧКОВОГО МІОКАРДА ЕМБРІОНІВ ЩУРІВ ПРОТЯГОМ 18-20-ОЇ ДОБИ ПРЕНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ДІЇ АЛКОГОЛЮ

Марченко Д.Г., Філімонова Л.А.

Дніпропетровська медична академія
Міністерства охорони здоров'я України

Стаття присвячена аналізу змін ультраструктури шлуночкового міокарду ембріонів щурів на пізніх етапах пренатального онтогенезу після дії етанолу. Для даного дослідження використовувалися методи електронної мікроскопії. Аналіз отриманих даних показав, що алкогольна інтоксикація призводила до прогресуючих змін у скоротливому апараті кардіоміоцитів (КМЦ) протягом всього розвитку ембріонів щурів. За допомогою електронних мікрофотографій були виявлені основні зміни у ультраструктурі А- та І-дисків міофібрил, порушення цілості саркомерів, зміни форми вставних дисків та Z-диска. В даній статті також акцентована увага на зміни у ультраструктурі елементів тріади, як у нормі так і після впливу етанолу.

Ключові слова: етанол, міокард, міофібрили, скоротливий апарат, Т-система.

Постановка проблеми. За статистичними даними високий відсоток смертності плодів, що пов'язаний з порушеннями формування основних скоротливих компонентів серця, обумовлює актуальність дослідження кардіогенезу. Тому у теперішній час посилюється значення морфологічних досліджень для пренатальної діагностики патології серцево-судинної системи. У деяких випадках спостерігати за розвитком вад серця неможливо, тому використання експериментальних моделей необхідно для аналізу змін у структурі серця при формуванні вроджених вад. Вплив численних тератогенних чинників, у тому числі і етанолу, призводить до порушення процесів формування елементів скоротливого апарату серця зі зміною їх структури та функцій. Тому вивчення механізмів формування елементів міофібрилярного апарату, а також системи тріади, як у нормі, так і під впливом етанолу допоможе сформулювати основні базисні аспекти для кардіоембріології.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Давно відомо, що процес формування скоротливого апарату у експериментальних тварин починається на ранніх етапах пренатального онтогенезу. Міофібрилогенез під час формування кардіоміоцита відзначений послідовним зв'язуванням основних компонентів міофібрил. Утворення міофібрил потребує впорядкованої взаємодії різноманітних білкових структур, що за допомогою угруповання формують актинові та міозинові філаменти, які утворюють саркомери-елементарні одиниці міофібрил [8, 10, 11, 12, 13, 14].

За даними багатьох досліджень було встановлено, що хронічна алкогольна інтоксикація викликає зміни у міокарді на всіх рівнях його структурної організації. Алкогольна кардіоміопатія, часто характеризується гіпертрофією серця, порушення у архітектурі міофібрил, зменшується скоротливість міокарда, фіброзом міокарда [5, 6, 7, 9]. За даними Т. В. Івашкіна, відбуваються наступні порушення: пошкодження і загибель

кардіоміоцитів; деструкція внутрішньоклітинних органел, скоротливих білків і порушення кальцієвого гомеостазу; порушення процесів збудження та проведення у міокарді; активація вільнорадикального окислення; розвиток апоптозу та некрозу [2].

Вплив етанолу на кардіоміоцити обумовлює її гіпертрофію та гіперплазію. За даними авторів, найчутливішими до дії етанолу елементами кардіоміоцитів є міофібрили та мітохондрії [5, 6, 7, 9].

Хоча дослідження останніх років дозволили отримати дані щодо формування міофібрилярного апарату серця [11, 12], однак формування компонентів серцевої м'язової тканини під впливом пошкоджуючих факторів залишається предметом значних суперечок.

Метою дослідження було визначення ультраструктурних змін скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів протягом 18-і-20-ї доби ембріонального розвитку після впливу етанолу.

Виклад основного матеріалу дослідження. Матеріали та методи. Матеріалом для даного дослідження були серця білих безпорідних щурів, яких отримували з віварію ДДМА і утримували у звичайних умовах, описаних у посібнику «Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте» [3]. Серця експериментальних тварин вивчалися на 18-у та 20-у добу пренатального розвитку. Ембріональний матеріал експериментальних тварин отримували у лабораторних умовах відповідно до рекомендацій, викладених у довідково-методичному посібнику «Объекты биологии развития», при використанні відповідних таблиць нормального розвитку.

Було проведено декілька етапів отримання щурами етанолу у різній концентрації та у різний проміжок часу (протягом цього часу вони знаходилися на звичайній дієті, але замість води використовувалася етанол у різній концентрації – 5%, 10%, 15%, 20%). Експеримент тривав протягом 2-х місяців, зміна концентрацій етанолу відбувалася

кожні два тижня, однак, 20% етанол надавався самка деякий час і після визначення вагітності.

Ультраструктурний аналіз скоротливих КМЦ шлуночків ембріонів щурів здійснювався за допомогою аналізу електронних мікрофотографій отриманих у лабораторії електронної мікроскопії ДЗ «ДМА МОЗ України». Для методу електронної мікроскопії маленькі шматочки шлуночкового міокарда фіксували у 2,5-3% розчині глутаральдегіду, постфіксували у 1% розчині тетраоксиду осмію на фосфатному буфері с рН 7,2-7,4, обезводнювали у спиртах і ацетоні і заливали сумішшю епоксидних смол. Полімеризацію блоків проводили у термостаті при 60°C протягом двох діб. З отриманих блоків на ультрамікромомі УМТП – ЗМ виготовляли ультратонкі зрізи, монтували їх на електролітичні сіточки і після контрастування цитратом свинцю вивчали під електронним мікроскопом [1, 4].

Вивчення стану кардіоміоцитів шлуночків при моделюванні хронічної алкольної кардіоміопатії етанолом різної концентрації виявляло численні зміни у ультраструктурі скоротливого апарата. На фоні нормальних кардіоміоцитів зустрічалися «дефектні структури» з яскраво вираженими змінами у своїй ультраструктурі. На 18-ту добу пренатального онтогенезу за допомогою електронної мікроскопії у частині КМЦ поєднувалися контрактурні та літичні пошкодження. Міофібрили у цих клітинах стонщувалися і втрачали свою цілісність, відбувався розрив окремих саркомерів (рис. 1), порушення орієнтації і лізис міофібрил, особливо в навколядерних зонах.

У міофібрилах виявлялися ділянки про-світлення, обумовлені розходженням міофібрил. У зонах набряку структура компонентів міофібрил була нечіткою. Більшість КМЦ перебувала у суперскороченому стані, що можливо було пов'язано з порушення вивільнення кальцію і механізму скорочення.



Рис. 1. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. Міофібрили з частковою їх фрагментацією. Електроннограма. $\times 5000$

За допомогою електронної мікроскопії ми спостерігали, що на 18-ту добу у кардіоміоцитах шлуночкового міокарда відбувався також розрив Z-дисків (рис. 2). Можливо данне явще

було пов'язано з чутливістю білків Z-дисків до дії етанолу.



Рис. 2. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. Розрив міофібрил у ділянках телофрагми. Електроннограма. $\times 10000$

За даними досліджень протягом 20-ї доби пренатального розвитку у багатьох районах серця дефектні міофібрили склалися з невеликих блоків одного або двох саркомерів (рис. 3). У тих ділянках серця, де розчинення скоротливих структур було більш вираженим, міофібрили спостерігалися у вигляді залишків, у яких не виявлені А- та І-диски. У таких міофібрил спостерігалися лише окремі Z-диски.

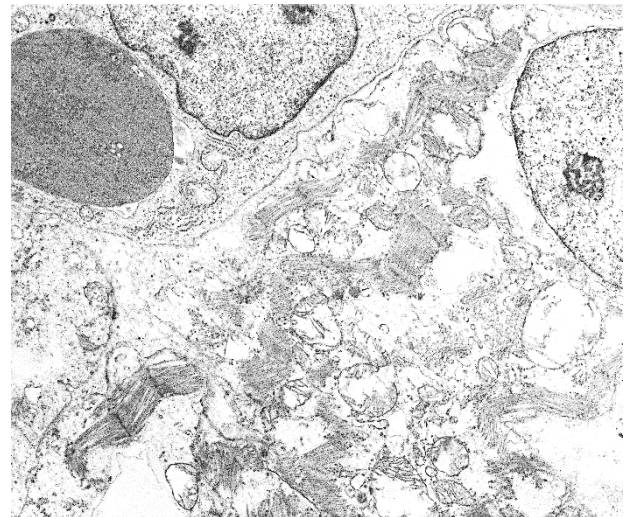


Рис. 3. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Розрив міофібрил на окремі саркомери. Електроннограма. $\times 5000$

Поступовий лізис призводив до того, що простір, де немає міофібрил заповнюється гранулами і численними мітохондріями (рис 4). Дане явище можливо було пов'язано з компенсаторними механізмами викликаними дією етанолу на компоненти кардіоміоцитів. Збільшення кількості мітохондрій, на нашу думку, пов'язано з гіпертрофією органу і більшою необхідністю кількості АТФ для функціонування серцевої м'язової тканини. Однак, мітохондрії були дефектні, їх мембрани втрачали

свою цілісність, кількість крис зменшувалося. Таким чином серце не мало можливість нормально скорочувало, що призводило до летальних випадків. При наших дослідженні 15% щурів через деякий час після народження вмирали.

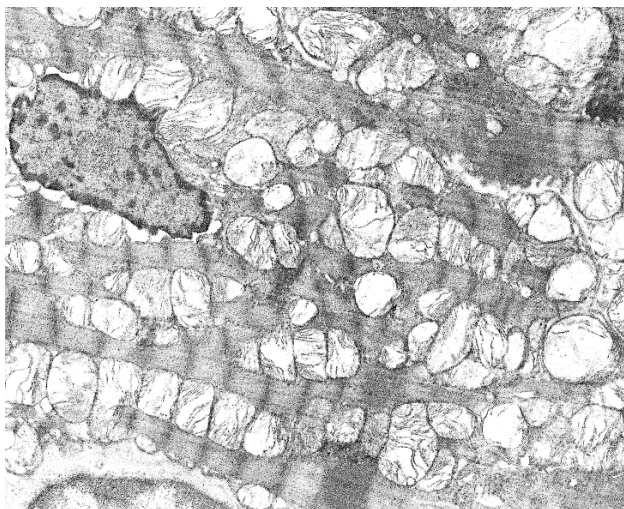


Рис. 4. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Велика кількість мітохондрій, що розташованих у проміжках відсутності міофібрил. Електроннограма. $\times 6000$

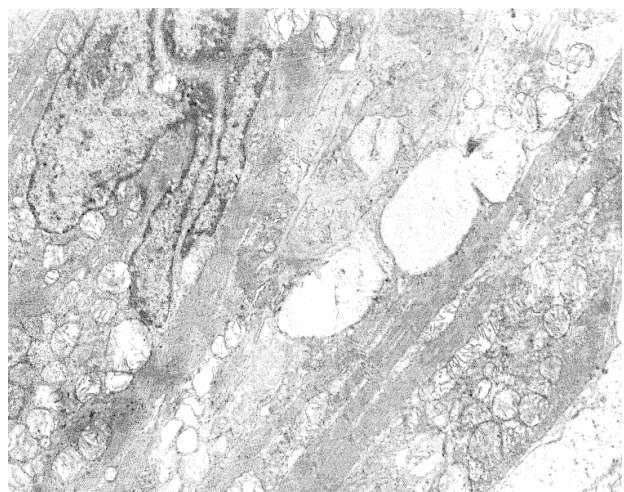


Рис. 5. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Розширення термінальних цистерн. Електроннограма. $\times 5000$

Компоненти саркоплазматичного ретикулу-му міокарда експериментальних тварин, протягом 20-ї доби, також зазнавали значних змін у своїй ультраструктурі. Так, при електронно-мікроскопічному дослідженні були виявлені значні розширення саркоплазматичного ретикулу-ма

і Т-системи (рис. 5), деформація мембран саркоплазматичного ретикулу-ма. Це явище було пов'язано зі змінами у вивільненні та надходженні кальцію з термінальних цистер, що відбувалося після дії етанолу на скоротливий апарат серця.

На 18-20-у добу пренатального онтогенезу за допомогою електронної мікроскопії була чітко видна різна товщина міофібрил (рис. 6). Так міофібрили, які мали товщину у 2 рази більшу від норми, межували з міофібрилами, товщина яких була у 2-3 рази менша за збільшені структури. Ці зміни не були характерні для нормального розвитку. Описані явища можливо пов'язані з впливом етанолу на формування та угруповання білків у товсті та тонкі нитки міофібрил.

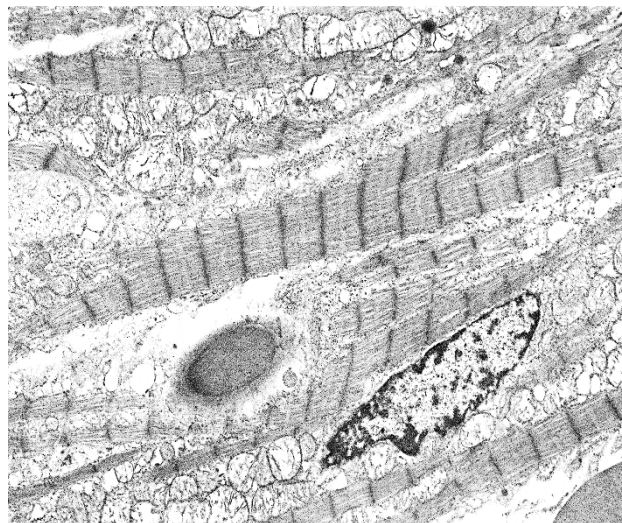


Рис. 6. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Різна товщина міофібрил. Електроннограма. $\times 6000$

Висновки. Аналіз електронних мікрофотографій шлуночкового міокарда показав, що серед міофібрил, які мали нормальну будову, зустрічалися структури з яскраво вираженими деструктивними процесами. При цьому хронічна алкогольна інтоксикація спричиняла неспецифічні якісні зміни у усіх структурних компонентах шлуночкового міокарда серця – міофібрилах, Т-системі, мітохондріях. У даний період у «аномальних» кардіоміоцитів відбувалися наступні порушення: пошкодження структури кардіоміоцитів з частковою або повною фрагментацією саркомерів, нерівномірність товщини міофібрил, збільшення розмірів Т-цистер, збільшення кількості мітохондрій у ділянках відсутності міофібрил.

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

Список літератури:

1. Зевайль А. Трёхмерная электронная микроскопия в реальном времени / А. Зевайль, Дж. Томас; пер. с англ. А. В. Сухова. – Долгопрудный: «Интеллект», 2013. – 326 с.
2. Ивашкин В. Т. Алкоголь и сердце / В. Т. Ивашкин, О. М. Драпкина, Я. И. Ашихмин // Русские Медицинские Вести. – 2008. – Т. 8, № 2. – С. 69-76.
3. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / Западнюк И. П. [и др.]. – [3-е изд.]. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
4. Устройство и принцип работы просвечивающего электронного микроскопа: Электронное учебно-методическое пособие / Бобров А. И. [и др.]; под ред. Д. А. Павлова. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 31 с.

5. Alcohol and the heart / L. D. Segel [et al.] // *Med Clin North Am.* – 1984. – Vol. 68, № 1. – P. 147-161.
6. Alcoholic cardiomyopathy / G. Guzzo-Merello [et al.] // *World J Cardiol.* – 2014. – Vol. 6, № 8. – P. 771-781.
7. Davidson D. M. Cardiovascular Effects of Alcohol // *The Western Journal of Medicine.* – 1989. – Vol. 151. – P. 430-439.
8. Knaapen M. W. Ultrastructural changes of the myocardium in the embryonic rat heart / M. W. Knaapen, B. C. Vrolijk, A. C. Wenink // *Anat Rec.* – 1997. – Vol. 248, № 2. – P. 233-241.
9. Mall G. Ultrastructural morphometric study on the rat heart after chronic ethanol feeding / G. Mall, T. Mattfeldt, B. Volk // *Virchows Archiv A.* – 1980. – Vol. 389, № 1. – P. 59-77.
10. Manasek F. J. Embryonic development of the heart // *Embryol. exp. Morph.* – 1969. – Vol. 22, № 3. – P. 333-348.
11. Molecular mechanisms of myofibril assembly in heart / D. Auerbach [et al.] // *Cell Struct Funct.* – 1997. – Vol. 22, № 1. – P. 139-146.
12. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyocytes / S. Morimoto // *Cardiovascular Research.* – 2008. – Vol. 77. – P. 659-666.
13. Tsyplenkova V. G. Histological and ultrastructural characteristics of myocardium in heart failure // *Kardiologija.* – 2013. – Vol. 53, № 9. – P. 52-55.
14. Ultrastructural uncoupling between T-tubules and sarcoplasmic reticulum in human heart failure / H. B. Zhang [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2013. – Vol. 98. – P. 269-276.

Марченко Д.Г., Филимонова Л.А.

Днепропетровская медицинская академия
Министерства здравоохранения Украины

КАЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЖЕЛУДОЧКОВОЙ МИОКАРДА ЭМБРИОНОВ КРЫС В ТЕЧЕНИЕ 18-20-х СУТОК ПРЕНАТАЛЬНОЙ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ

Аннотация

Статья посвящена анализу изменений ультраструктуры желудочкового миокарда эмбрионов крыс на поздних этапах пренатального онтогенеза после действия этанола. Для данного исследования использовались методы электронной микроскопии. Анализ полученных данных показал, что алкогольная интоксикация приводила к прогрессирующим изменениям в сократительной аппаратуре кардиомиоцитов (КМЦ) в течение всего развития эмбрионов крыс. С помощью электронных микрофотографий были выявлены основные изменения в ультраструктуре А- и I-дисков миофибрилл, нарушения целостности саркомеров, изменения формы вставочных дисков, Z-диска. В данной статье также акцентировано внимание на изменениях в ультраструктуре элементов триады, как в норме так и после воздействия этанола.

Ключевые слова: этанол, миокард, миофибриллы, сократительный аппарат, Т-система.

Marchenko D.G., Filimonova L.A.

Dnipropetrovsk Medical Academy
of the Ministry of Health of Ukraine

QUANTITY OF CHANGING VENTRICULAR ULTRASTRUCTURE OF MYOCARDIA EMBRYO RATS DURING 18th-20th DAY PRENATAL ONTOGENESIS AFTER CHRONIC ALCOHOL INFLUENCE

Summary

This article analyzes changes in ventricular myocardium ultrastructure of rat embryos at later stages of prenatal ontogenesis after exposure to ethanol. For the rest of this study we used by electron microscopy. Analysis of the data showed that alcohol intoxication led to progressive changes in the contractile apparatus in cardiomyocytes throughout embryonic development in rats. With electronic micrographs were found major changes in the ultrastructure of A- and I-band myofibrils, violations of integrity sarcomers, changing the shape of plug drives and Z-band. In this article also accentuated attention to changes in the ultrastructure elements of the triad as normal and after exposure to ethanol.

Keywords: ethanol, myocardium, myofibrils, the contractile apparatus, T system.