

А.В. Чернявський

Запорізький державний
медичний університет


Надійшла: 12.11.2018

Прийнята: 09.12.2018

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.4.99-103>

УДК 611.127.018.63:612.647:615.357.08-599.323.45

ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ТА ДИНАМІКИ ВОЛОКОН СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ МІОКАРДА ШЛУНОЧКІВ ЩУРІВ В НОРМІ ТА ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО ВПЛИВУ ДЕКСАМЕТАЗОНУ

Cherniavskiy A.V.  ✉ Features of distribution and dynamics of the connective tissue fibers in the ventricles of rat's myocardium in normal conditions and after intranatal injection of dexamethasone.

Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine

ABSTRACT. Background. Any disturbance of the formation or organization of connective tissue such as undifferentiated connective tissue disease (UCTD) can lead to changes in extracellular matrix of the heart and deterioration of adaptive abilities in the future. The safety of using synthetic glucocorticoids in pregnant women is the subject of active discussions due to possible adverse effects of dexamethasone on the development of the fetus and, in particular, on connective tissue of the heart. **Objective.** The purpose of this research is to study the features of distribution and dynamics of the connective tissue fibers in the ventricles of rat's myocardium in normal conditions and after intranatal injection of dexamethasone. **Methods.** 144 hearts of laboratory rats were investigated. They were divided into 3 groups: the first group included intact rats, the second - control group, that get intrauterine injection of Sodium Chloride solution 0.9% 0.05 ml on the 18th day of antenatal development. The third group was formed by experimental animals, who were injected by 0.05 ml of dexametazone in a similar method. Serial sections were stained with orcein, van Gieson method and impregnation with silver carbonate by Lilly. **Results.** It was found that intrauterine administration of dexamethasone in rats causes a significant decrease of collagen fibers in the myocardium on 45-th day after birth comparison to control and intact groups by 30.8% and 29.1% respectively. In the structure of collagen fibers, the volume of type III fibers content at 14, 21 and 30 days were significantly higher in animals of intact and control groups than indexes of experimental group. **Conclusion.** Intranatal injection of dexamethasone may cause a violation in the development and lead to disorganisation of the connective tissue fibers in the ventricles of the heart. These changes may lead to development of UCTD and limitate the adaptive abilities of the heart in the future.

Key words: connective tissue, heart, intranatal injection, dexamethasone.

Citation:

Cherniavskiy AV. Features of distribution and dynamics of the connective tissue fibers in the ventricles of rat's myocardium in normal conditions and after intranatal injection of dexamethasone. *Morphologia*. 2018;12(4):99-103. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.4.99-103>

 Cherniavskiy A.V. 0000-0002-3902-8081

✉ yati66691@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

Останнім часом зростаючий інтерес морфологів викликають міжклітинні структури міокарда. Сполучна тканина, що формує екстрацелюлярний матрикс шлуночків, представлена головним чином еластичними та колагеновими волокнами, що оточують кардіоміоцити та судини, та виконують біомеханічну, трофічну та пластичну функції. Тому порушення формування або організації сполучної тканини, яке відбувається при синдромі недиференційованої дисплазії сполучної тканини (НДСТ), може призводити до змін сполучнотканинного каркаса серця та погіршення

адаптаційних можливостей у майбутньому [1]. Колагенові волокна III типу, які зустрічаються у міокарді, формують колагенові сітки – основу сполучнотканинної строми [2].

На сьогодні дуже гостро стоїть питання про доцільність застосування синтетичних глюкокортикоїдів у вагітних, зважаючи на можливий несприятливий вплив дексаметазону на серце майбутньої дитини [3]. Раніше було встановлено, що у щурів, після введення дексаметазону в перші дні після народження спостерігається достовірне підвищення відносної маси серця, передчасне дозрівання кардіоміоцитів та зниження їх пролі-

феративної активності [4]. У попередніх роботах спостерігали потовщення стінок шлуночків та міжшлуночкової перегородки після антенатального впливу дексаметазону [5]. Однак, зміни у структурі сполучнотканинного компонента, що відбуваються в серці щурів після внутрішньоутробного введення дексаметазону, залишаються не вивченими.

Мета: вивчити особливості розподілу та динаміки волокон сполучної тканини міокарда шлуночків щурів в нормі та після внутрішньоутробного впливу дексаметазону.

Матеріали та методи

У дослідженні були використані 144 серця білих лабораторних щурів, які були поділені на 3 групи: I - інтактна група, II – контрольна група тварин, котрим на 18 добу внутрішньоутробного розвитку шляхом лапаротомії було введено одноразово чрезматково, чрезоболонково, внутрішньооплодово, підшкірно у міжлопаткову ділянку фізіологічний розчин у кількості 0,05 мл; та III – експериментальна група щурів, котрим було введено 0,05 мл розчину Дексаметазону у розведенні 1:40 за описаним вище способом, на який отримано патент на корисну модель [6]. Тварин виводили з експерименту на 1, 3, 5, 9, 14, 21, 30 та 45 добу після народження. При роботі з лабораторними тваринами дотримувалися правил Страсбурзької «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей», Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2013).

Фіксацію матеріалу проводили у 10% нейтральному розчині формаліну з подальшим зневодненням у спиртах та заливанням у парафінові блоки. Зрізи товщиною 4 мкм забарвлювалися орсеїном для виявлення еластичних волокон, за Ван Гізоном – для виявлення колагенових волокон, а для диференціювання I та III типів колагенових волокон проводили реакцію імпрегнації карбонатом срібла за Лейдлоу (рецепти приготування розчинів були взяті з посібника Ліллі) [7]. Зображення обробляли у програмі ImageJ та оцінювали відносну площу (у %), зайняту сполучною тканиною. Отримані кількісні дані обробляли методами варіаційної статистики в програмі MS Excel та Statistica 6.0. Статистичну значимість відмінностей середніх величин оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента та вважали достовірною при $p \leq 0,05$. Числові дані результатів дослідження представлені у вигляді «середнє \pm похибка середньої».

Результати та їх обговорення

Встановлено, що у міокарді шлуночків новонароджених тварин інтактної групи колагенові волокна займають 2,775 \pm 0,478% площі, еластичні волокна - 0,578 \pm 0,149%. Надалі відносна пло-

ща, що зайнята волокнами сполучної тканини поступово зростає протягом наступних 6 тижнів і до 45 доби вміст колагенових збільшується на 290%, еластичних – на 308%. У складі колагенових волокон важливе місце посідають волокна III типу, адже саме вони формують сполучнотканинний матрикс, що оточує кардіоміоцити та сприяє підтримці форми та пружності міокарду при його скороченнях. Вміст колагену III типу у міокарді новонародженої інтактної тварини складає 2,118 \pm 0,320%, зменшується на третю добу, а надалі поступово збільшується, досягаючи 6,260 \pm 0,332% на 45 добу. На загал, за перші 6 тижнів життя частка сполучної тканини у міокарді шлуночків серця щурів збільшується у 2,93 рази (табл. 1).

Колагенові волокна у шлуночках спостерігалися у вигляді поодиноких звивистих смужок уздовж кардіоміоцитів та між ними, скупчень навколо судин та у субепікардіальному та субендокардіальному шарах міокарда (рис. 1).

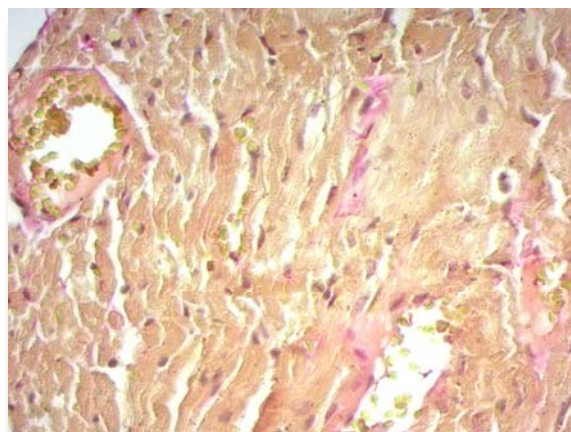


Рис. 1. Колагенові волокна у міокарді інтактної тварини. 45 доба після народження. Забарвлення за методом Ван Гізона: $\times 400$.

Еластичні волокна зустрічалися у значно меншій кількості, ніж колагенові та розташовувалися головним чином у стінках артерій, тонкими стрічками навколо них, під епікардом та ендокардом, а також між кардіоміоцитами (рис. 2).

В контрольній групі, тваринам якої проводили оперативне втручання і вводили фізіологічний розчин, у новонароджених щурів вміст колагенових та еластичних волокон складав 2,695 \pm 0,247% та 0,553 \pm 0,116% відповідно. Розподіл компонентів сполучної тканини був подібним до того, який спостерігався у інтактній групі, у той час, як об'єм колагенових волокон до 45 доби збільшився у 2,92 рази, а еластичних – у 3,12 рази. Таким чином, зважаючи на подібну динаміку об'єму сполучної тканини та відсутність значущих відмінностей між показниками обох груп на всіх термінах, можна зробити ви-

сновок, що оперативне втручання під час проведення експерименту не може бути причиною

виникнення змін у досліджуваних тканинах.

Таблиця 1

Відносна площа сполучної тканини у міокарді шлуночків, %

	Всі колагенові волокна			Колагенові волокна III типу			Еластичні волокна		
	I група	II група	III група	I група	II група	III група	I група	II група	III група
1 доба	2,775± 0,478	2,695± 0,247	2,380± 0,316	2,118± 0,320	2,097± 0,178	1,783± 0,144	0,578± 0,149	0,553± 0,116	0,594± 0,093
3 доба	3,460± 0,460	3,244± 0,264	2,935± 0,376	1,977± 0,150	1,906± 0,227	2,069± 0,317	0,675± 0,201	0,647± 0,107	0,659± 0,133
5 доба	3,726± 0,392	3,742± 0,389	3,045± 0,337	2,788± 0,282	2,552± 0,261	2,902± 0,311	0,787± 0,097	0,705± 0,079	0,730± 0,160
9 доба	4,312± 0,349	4,362± 0,322	3,438± 0,345	3,979± 0,396	3,597± 0,290	2,878± 0,343	1,036± 0,115	0,808± 0,091	0,810± 0,109
14 доба	5,401± 0,465	5,170± 0,423	4,112± 0,644	4,934± 0,344	4,867± 0,356	3,159± 0,187*	1,140± 0,142	0,996± 0,107	0,872± 0,116
21 доба	5,900± 0,397	5,688± 0,428	4,729± 0,320	5,530± 0,326	5,566± 0,379	4,318± 0,477*	1,223± 0,280	1,035± 0,131	1,069± 0,155
30 доба	6,818± 0,747	6,797± 0,907	5,151± 0,488	5,920± 0,679	5,818± 0,314	4,739± 0,345*	1,394± 0,272	1,436± 0,191	1,212± 0,234
45 доба	8,071± 0,754	7,879± 0,337	5,583± 0,485*	6,260± 0,332	5,916± 0,217	5,198± 0,290	1,781± 0,291	1,730± 0,280	1,475± 0,180

Примітка: * - показники статистично достовірно порівняно з контрольною групою.

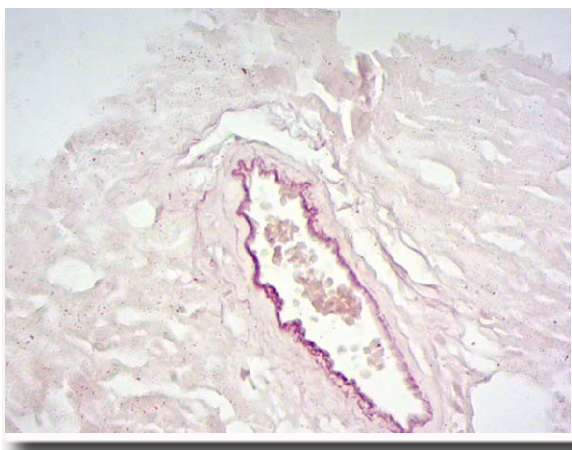


Рис. 2. Еластичні волокна у міокарді інтактної тварини. 45 доба після народження. Забарвлення орсеїном: $\times 400$.

Після внутрішньоутробного введення дексаметазону площа міокарда, що займається сполучною тканиною статистично не відрізнялась від показників контрольної та інтактної групи протягом першого місяця після народження. На 45 добу вміст колагенових волокон був достовірно меншим, ніж у інтактній та контрольних групах на 30,8% та 29,1% відповідно (табл. 1). Необхідно відзначити, що частка колагенових волокон III типу в експериментальній групі достовірно менше на 14, 21 та 30 добу, ніж у контрольній та інтактній групах у 1,56, 1,28 та 1,24 рази відповідно (табл. 1). Зменшення об'єму колаге-

нових та еластичних волокон у експериментальній групі може свідчити про порушення формування сполучнотканинної стромі міокарду.

Об'єм еластичних волокон в міокарді тварин експериментальної групи від народження до 45 доби збільшується у 2,48 рази та статистично не відрізняється від показників перших двох груп.

Слід звернути увагу, що у складі колагенових волокон міокарда на різних термінах постнатального життя, вміст колагену III типу має певну динаміку, та відрізняється у порівнюваних групах (табл. 2).

Так, частка волокон III типу у структурі всіх колагенових волокон була найменшою на третю добу у всіх групах, але найбільших показників в експериментальній групі досягла вже на п'яту добу, а у інтактній та контрольній групах - лише на 21-шу (рис. 3).

Така картина вмісту колагенових волокон III типу може свідчити про диспропорціональну організацію колагенових волокон в міокарді щурів після внутрішньоутробного введення дексаметазону, що може бути проявом НДСТ та стати підґрунтям для розвитку патологічних станів та обмеження адаптаційних можливостей серця у подальшому житті.

Отримані результати збігаються з даними літератури про антипроліферативну дію дексаметазону та його властивість пригнічувати синтез колагену і, тим самим, зменшувати об'єм екстрацелюлярного матриксу [8].

Частка колагенових волокон III типу у структурі всіх колагенових волокон у міокарді шлуночків, %

	Інтактна група	Контрольна група	Експериментальна група
1 доба	76,30%	77,80%	74,90%
3 доба	57,10%	58,80%	70,50%
5 доба	74,80%	68,20%	95,30%
9 доба	92,30%	82,50%	83,70%
14 доба	91,40%	94,10%	76,80%
21 доба	93,70%	97,90%	91,30%
30 доба	86,80%	85,60%	92%
45 доба	77,60%	75,10%	93,10%

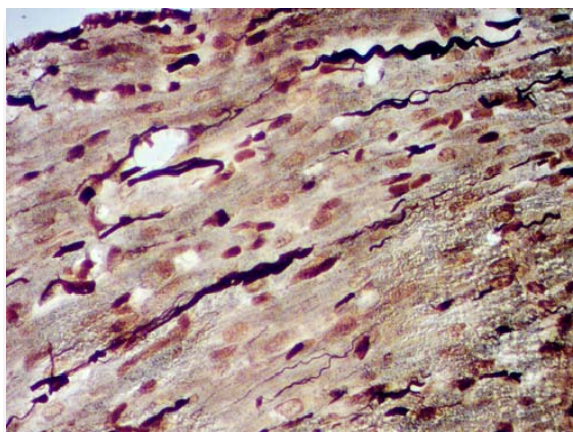


Рис. 3. Волокна колагену III типу у міокарді інтактної тварини. 21 доба після народження. Імпрегнація карбонатом срібла за Лейдлоу: $\times 400$.

Висновки

1. Сполучнотканинна строма міокарда шлуночків новонародженого щура інтактної та контрольної груп складається з колагенових (головним чином – волокон III типу – 76,3% та 77,8%) та еластичних волокон.

2. Кількість колагенових та еластичних волокон у міокарді інтактних тварин поступово зростає, та за перші 6 тижнів життя частка сполучнотканинного компоненту збільшується у 2,93 рази.

3. Після внутрішньоутробного введення

дексаметазону у міокарді тварин на 45 добу після народження вміст колагенових волокон є достовірно меншим, ніж у контрольній та інтактній групах на 30,8% та 29,1% відповідно.

4. В структурі колагенових волокон об'єм волокон III типу в експериментальній групі на 14, 21 та 30 добу постнатального життя був достовірно меншими, ніж у контрольній та інтактній групах.

5. Після внутрішньоутробного введення дексаметазону в структурі колагенових волокон спостерігалась зміна динаміки вмісту волокон III типу – його максимальне значення припадало на 5 добу життя, а у контрольній та інтактній групах – на 21-шу.

Перспективи подальших досліджень

В подальшому планується дослідження змін клітинного складу міокарда та проліферативної активності (імуногістохімічне дослідження) кардіоцитів шлуночків серця щурів.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Реактивність органів новонароджених після дії антигенів та факторів різної природи у внутрішньоутробному періоді» (номер державної реєстрації 0115U003875).

Літературні джерела

References

1. Tyabut TD, Karatysh OM. [Undifferentiated connective tissue dysplasia]. *Modern Rheumatology Journal*. 2009;3(2):19-23. doi.org/10.14412/1996-7012-2009-534. Russian.

2. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol*. 2002;65(2):109-26.

3. Rog-Zielinska EA, Richardson RV, Denvir MA, Chapman KE. Glucocorticoids and foetal heart maturation; implications for prematurity and foetal

programming. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(2):125-35. DOI: 10.1530/JME-13-0204.

4. Maresha SG, Yong L, Fuxia X, Thant L, Lubo Z. Dexamethasone treatment of newborn rats decreases cardiomyocyte endowment in the developing heart through epigenetic modifications. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0125033. DOI:10.1371/journal.pone.0125033.

5. Hryhorieva OA, Cherniavskiy AV. [Dynamics of Ventricular Wall and Interventricular Septum Thickness of Rat's Heart in the Early Postnatal

Period in Normal Conditions and after Intranatal Injection of Dexamethasone]. JMBS. 2018;3(3):12–5. DOI:10.26693/jmbs03.03.012. Ukrainian.

6. Voloshin MA, Aravitskiy EO, Bogdanov PV, Chernyavskiy AV, Inventors; Zaporizhzhia State Medical University, assignee. Method of modeling of antenatal action of glucocorticoids. Ukraine patent UA 112288. 2016 Dec 12. Int. Cl. G09B 23/28, A61K 38/22, A61P 37/02. Ukrainian.

7. Lillie RD. Patogistologicheskaya tehnika i

prakticheskaya gistohimiya [Histopathologic technic and practical histochemistry]. Moscow: Mir; 1969. 645 p. Russian.

8. Pires MM, Schepers A, van der Hoeven BL, de Vries MR, Lianne S.M. Jukema B, Quax PH. Histopathologic alterations following local delivery of dexamethasone to inhibit restenosis in murine arteries. Cardiovascular Research. 2005;68(3):415–24. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.06.015.

Чернявський А.В. Особливості розподілу та динаміки волокон сполучної тканини міокарда шлуночків щурів в нормі та після внутрішньоутробного впливу дексаметазону.

РЕФЕРАТ. Актуальність. При синдромі недиференційованої дисплазії сполучної тканини (НДСТ) відбувається порушення формування та організації сполучної тканини, яке може призводити до змін сполучнотканинного каркасу серця та погіршення адаптаційних можливостей у майбутньому. Дексаметазон призначається вагітним жінкам при загрозі передчасних пологів, але серед віддалених несприятливих наслідків внутрішньоутробного впливу гормону може бути розвиток НДСТ. **Метою** дослідження було вивчення особливостей розподілу та динаміки волокон сполучної тканини міокарда шлуночків щурів в нормі та після внутрішньоутробного впливу дексаметазону. **Методи.** Об'єктом дослідження були 144 серця білих лабораторних щурів, які були розділені на 3 групи: I - інтактна група, II – контрольна група тварин, котрим на 18 добу внутрішньоутробного розвитку було введено фізіологічний розчин у кількості 0,05 мл; та III – експериментальна група щурів, котрим за описаним вище методом було введено 0,05 мл розчину дексаметазону. Зрізи забарвлювалися орсеїном, методом Ван Гізона та імпрегнацією карбонатом срібла за Лейдлоу. **Результати.** Було встановлено, що після внутрішньоутробного введення дексаметазону у щурів на 45 добу спостерігається достовірне зниження вмісту колагенових волокон в міокарді шлуночків у порівнянні з інтактною та контрольною групою на 30,8% та 29,1% відповідно. В структурі колагенових волокон об'єм волокон III типу в експериментальній групі на 14, 21 та 30 добу постнатального життя був достовірно меншими, ніж у контрольній та інтактній групах у 1,56, 1,28 та 1,24 рази відповідно. **Підсумок.** Така картина вмісту колагенових волокон може свідчити про диспропорціональну організацію колагенових волокон в міокарді щурів після внутрішньоутробного введення дексаметазону, що може бути проявом НДСТ та стати підґрунтям для розвитку патологічних станів та обмеження адаптаційних можливостей серця у подальшому житті.

Ключові слова: сполучна тканина, серце, внутрішньоутробний вплив, дексаметазон.

Чернявский А.В. Особенности распределения и динамики волокон соединительной ткани миокарда желудочков крыс в норме и после внутриутробного влияния дексаметазона.

РЕФЕРАТ. Актуальность. При синдроме недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ) происходит нарушение формирования и организации соединительной ткани, которое может приводить к изменениям соединительнотканного каркаса сердца и ухудшению адаптационных возможностей в будущем. Дексаметазон назначается беременным женщинам при угрозе преждевременных родов, но среди отдаленных неблагоприятных последствий внутриутробного воздействия гормона может быть развитие НДСТ. **Целью** исследования было изучение особенностей распределения и динамики волокон соединительной ткани миокарда желудочков крыс в норме и после внутриутробного воздействия дексаметазона. **Методы.** Объектом исследования были 144 сердца белых лабораторных крыс, которые были разделены на 3 группы: I - интактная группа, II - контрольная группа животных, которым на 18 сутки внутриутробного развития было введено физиологический раствор в количестве 0,05 мл и III - экспериментальная группа крыс, которым по описанному выше методу было введено 0,05 мл раствора дексаметазона. Срезы окрашивались орсеином, методом Ван Гизона и импрегнацией карбонатом серебра по Лейдлоу. **Результаты.** Было установлено, что после внутриутробного введения дексаметазона у крыс на 45 сутки наблюдается достоверное снижение содержания коллагеновых волокон в миокарде желудочков по сравнению с интактной и контрольной группами на 30,8% и 29,1% соответственно. В структуре коллагеновых волокон объем волокон III типа в экспериментальной группе на 14, 21 и 30 сутки постнатального жизни был достоверно меньше, чем в контрольной и интактной группах в 1,56, 1,28 и 1,24 раза соответственно. **Заключение.** Такая картина содержания коллагеновых волокон может свидетельствовать о диспропорциональной организации коллагеновых волокон в миокарде крыс после внутриутробного введения дексаметазона, что может быть проявлением НДСТ и стать основой для развития патологических состояний и ограничения адаптационных возможностей сердца в дальнейшей жизни.

Ключевые слова: соединительная ткань, сердце, внутриутробное воздействие, дексаметазон.