

Д.Г. Марченко
О.А. Черкас

Дніпровський державний
медичний університет,
Дніпро

Надійшла: 24.10.2022
Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.13-18>

УДК 611.018.63:611.013.9:547.262:616.127-091.8-092.9

ЯКІСНІ ПЕРЕБУДОВИ В УЛЬТРАСТРУКТУРІ МІОКАРДА ЕМБРІОНІВ ЩУРІВ ПРОТЯГОМ 16-20-Ї ДОБИ ПРЕНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ У НОРМІ ТА ПІСЛЯ ДІЇ ЕТАНОЛУ

Marchenko D.G.  , Cherkas H.A.  Qualitative changes in the ultrastructure of the myocardium of rat embryos during the 16-20th day of prenatal development in normal conditions and after ethanol exposure. Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.


ABSTRACT. Background. Violation of the formation of the components of the cardiovascular system even in the embryonic period can be caused by various endo- and exogenous factors, which in the future can lead to both the development of heart defects and deaths. Therefore, at present, with the help of many research works on the mechanism of myofibrillogenesis in cardiomyocytes (CMC), the attention of researchers has been drawn to the question of the main changes that occur in the structure of the main elements of the contractile apparatus under the influence of various teratogenic factors. The use of a powerful complex of research methods in the disclosure of this issue led to significant research in the analysis of this topic. The **aim** of the study was to compare the changes in the ultrastructure of the contractile apparatus of rat cardiomyocytes during the late stages of prenatal development during normal development and after the teratogenic effect of ethanol. **Results and conclusion.** The article is devoted to the analysis of changes in the ultrastructure of the ventricular myocardium of rat embryos during late prenatal development. Electron-microscopic methods were used for this study, followed by analysis of electrongrams. Research results indicate that alcohol intoxication led to destructive changes in the structure of the contractile apparatus of cardiomyocytes (CMC) during the entire development of rat embryos. Electron microphotographs revealed the main changes in the ultrastructure of the A- and I-discs of myofibrils, violations of the integrity of sarcomeres, changes in the shape of intercalated discs and the Z-disc. This article also draws attention to changes in the structure of triad elements, mitochondria, both in normal conditions and after exposure to ethanol.


Key words: ethanol, myocardium, myofibrils, mitochondria, contractile apparatus, T-system.


Citation:

Marchenko DG, Cherkas HA. [Qualitative changes in the ultrastructure of the myocardium of rat embryos during the 16-20th day of prenatal development in normal conditions and after ethanol exposure]. Morphologia. 2022;16(4):13-8. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.13-18>

 Marchenko D.G. 0000-0001-7616-3613

 Cherkas O.A. 0000-0001-5422-0189

 dasha19862305@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Протягом останніх років захворювання органів серцево-судинної системи залишаються одними з серйозним проблем, як в Україні окремо, так і в цілому в усьому світі. Це пов'язано зі значним зростанням та розповсюдженням даного захворювання не лише у дорослої людини, а і у немовлят. Ці захворювання можуть бути викликані різними зовнішніми та внутрішніми факто-

рами. У тому числі розвиток численних вад серця може бути пов'язане з дефектами, що сформувались ще у ембріональному періоді, не вірною закладкою певних компонентів серця, у тому числі і скоротливих, що в свою чергу призведе до значних відхилень.

Скоротливий апарат серця являє собою високоорганізовану структуру, яка включає - міофібрили, елементи Т- та L-систем.

Міофібрили є основною скоротливою одиницею скоротливого апарату, які побудовані з упорядкованих актинових та міозинових ниток. Задля утворення такої структури міофібрили кардіоміоцитів проходили кілька етапів дозрівання. Цей процес має назву міофібрилогенез [1,2,3,4,5].

Міофібрилогенез – це складний процес, який являє собою утворення і розподіл міофібрил у кардіоміоциті, формування скоротливих білків і утворення саркомерів [6,7,8,9]. Так, порушення цього процесу, може призвести до значних змін у їх структурі, що в свою чергу може викликати навіть летальні випадки.

Ці зміни можуть бути пов'язані, як генетичними факторами, так і різними патогенними чинниками, у тому числі і впливом етанолу.

Однак, незважаючи на численні дослідження в області кардіогенезу, багато питань зв'язаних з механізмом розвитку серця, у тому числі. Тому вивчення процесу формування його скоротливого апарату є дуже важливим аспектом для сьогодення.

Мета дослідження – порівняти зміни в ультраструктурі скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів, протягом пізніх етапів пренатального розвитку під час нормальному розвитку та після тератогенної дії етанолу.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження були проведені на 30 білих щурах-самках масою 250-300 г, що утримувались на стандартному раціоні виварю [10]. Моделювання алкогольної інтоксикації здійснювали впродовж шести тижнів шляхом повної заміни питної води на розчин етанолу. Концентрація етанолу змінювалась кожні два тижні – 5%, 10%, 15%, 20% розчин [11]. 20%-ний розчин надавався щурам не 2 тижня, а 4 тижня. У ході експерименту тварини були розділені на дві групи: I група – тварини, які утримувались у нормальних умовах і не отримували етанол (контроль); II група – щури, які отримували етанол у різній концентрації (експеримент). Після закінчення експерименту здійснювали евтаназію тварин шляхом декапітації під інтраперитонеальним наркозом з використанням стандартного розведення тіопенталу натрію у дозі 0,15 мл на 100 г маси тіла щура. Після декапітації матеріал фіксували при температурі +2°C протягом 3-4 годин у 2,5%-ному розчині глютаральдегіду (виготовленому на 0,2М фосфатному буфері рН=7,4) з наступною постфіксацією протягом 1 години у 1%-ному забуференому (рН=7,4) розчині тетроксиду осмію («SPI», США), зневодненням у спиртах зростаючої концентрації та пропілен оксиді та виготовленням епоксидних блоків з використанням епон-аралдиту [12]. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМТП-6М («SELMI», Україна) та розміщали на опорних сітках (Mesh Regular Grid 200).

Проведення експерименту здійснювалось із дотриманням принципів біоетики, що викладені у Хельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації про гуманне ставлення до тварин, а також згідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12 2009 р. № 1759-VI та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Якісні параметри визначали за допомогою аналізу електронограм, виготовлених у лабораторії електронної мікроскопії ДДМУ.

Результати та їх обговорення

Після алкоголізації тварин за допомогою електронної мікроскопії було встановлено, що зміни в ультраструктурі міокарда залежали від доби розвитку серця. У ранньому пренатальному періоді серед мало змінених клітин зустрічалась лише невелика кількість з проявами деструкції. Під час електронно-мікроскопічних досліджень, ультраструктури кардіоміоцита, значних змін у міофібрилярному, мітохондріальному апараті та саркоплазматичному ретикулумі не спостерігалась. Ультраструктура міофібрил була майже незмінна, мітохондрії збільшені за розміром зустрічались рідко, цистерни та трубочки саркоплазматичного ретикулума мали звичайну форму. Однак, поряд з такими клітинами, спостерігалися кардіоміоцити з частковим лізисом елементів міофібрилярного апарату. Т-система на ранніх етапах онтогенезу також не була значно зміненою, і являла собою систему коротких каналців та трубочок.

Гістологічними і морфометричними дослідженнями виявлено, що найсуттєвіші зміни при алкогольному пошкодженні серця відбувались на рівні міофібрилярного апарату. Так, на 16-у добу пренатального розвитку ембріонів щурів розташування, форма і розміри серцевих клітин значно відрізнялись від кардіоміоцитів інтактних тварин. Міофібрили в цих клітинах були значно стоншеними і втрачали свою цілісність. Відбувалась деструкція окремих саркомерів, порушення орієнтації і лізис міофібрил, особливо в навколоядерних зонах (рис. 1, 2). На деяких електронограмах проявлялися ознаки некрозу окремих кардіоміоцитів.

За допомогою електронної мікроскопії на електронограмах шлуночкового міокарда експериментальних тварин визначалися міофібрили різної товщини. При чому деякі з цих структур були в 2-3 рази більші ніж норма. Описані явища можливо пов'язані з впливом етанолу на формування та угруповання білків у товсті та тонкі нитки міофібрил.

На 18-ту добу пренатального розвитку на електронограмах КМЦ експериментальних тварин чітко спостерігалися дистрофічні та деструктивні прояви у кардіоміоцитах. Поряд з міофібрилами, які не відрізнялись за структурою від нормальнофункціонуючих, виділялись великі клі-

тини зі значними змінами. Дистрофічні і деструктивні процеси проявлялись у частковому лізису міофібрилярних компонентів (рис. 3).

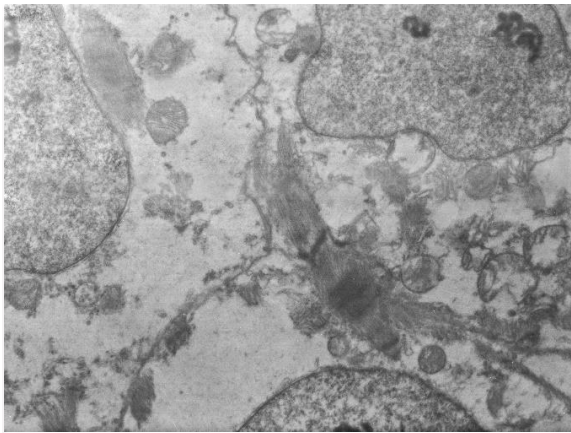


Рис. 1. Міокард щура експериментальної групи на 16-у добу пренатального розвитку. Електронорама. $\times 6000$.

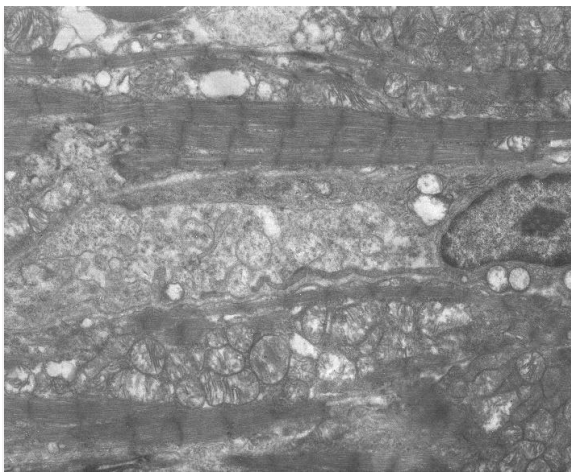


Рис. 2. Міокард щура експериментальної групи на 16-у добу пренатального розвитку. Електронорама. $\times 5000$.

У тих ділянках серця, де розчинення скоротливих структур було більш вираженим, міофібрили спостерігались у вигляді залишків, в яких не виявлені А- та І-диски. У таких міофібрил визначались лише окремі Z-диски. 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 більшої необхідністю кількості АТФ для функціонування серцевої м'язової тканини. Однак, мітохондрії були дефектні, їх мембрани втрачали свою цілісність, кількість крист зменшувалось. Таким чином,

серце не мало можливість нормально скорочуватись, що призводило до летальних випадків. Під час експериментального дослідження 20% щурів через деякий час після народження вмирали.

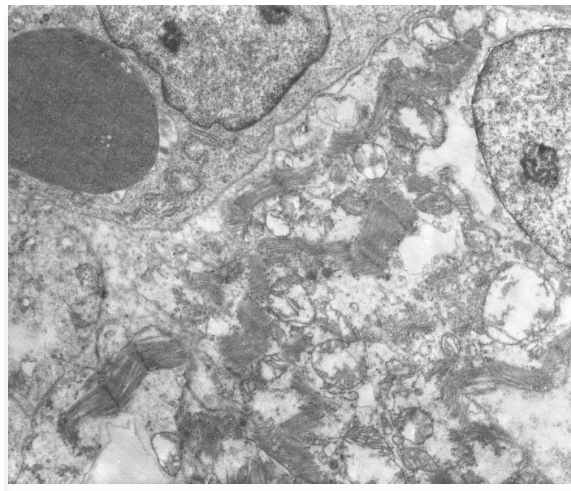


Рис. 3. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. Лізис міофібрил. Електронорама $\times 5000$.

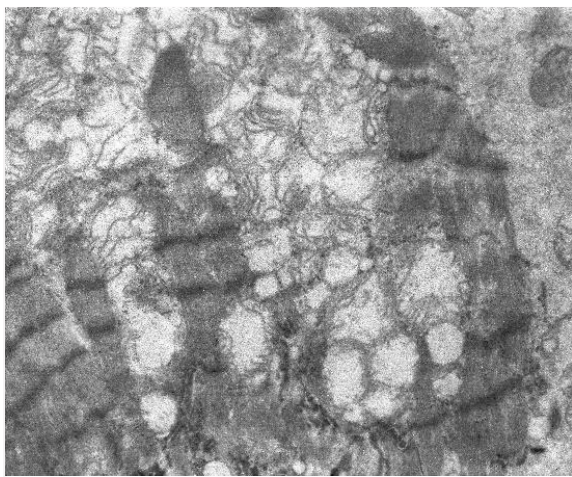


Рис. 4. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. Заповнення простору мітохондріями. Електронорама. $\times 8000$.

Окрім міофібрил, значних змін зазнавали і інші компоненти скоротливого апарату, а саме елементи саркоплазматичного ретикулуму. Спостерігалось розширення цистерн саркоплазматичного ретикулуму, а в деяких випадках їх повна деструкція. Що в свою чергу впливало на вивільнення кальцію з цистерн при механізмі скорочення.

На багатьох електронорамах структура компонентів міофібрил була нечіткою і деякі з них втрачали свою посмугованість. Також, багато з цих клітин перебувала в розслабленому стані. Однак, зустрічались ділянки "перескорочення" саркомерів.

На 20-ту добу ембріогенезу міофібрили, як і всі органи кардіоміоцитів також мали «аномальну» будову. Залучення окремих міофібрил у патологічний процес відбувалось асинхронно. На більш пізніх етапах розвитку спостерігалось наростання деструктивних змін.

Так алкоголізація етанолом у ембріонів експериментальних тварин викликала посилення дистрофічних процесів в КМЦ. Характер морфологічних змін був значно виражений.

На електронограмах шлуночкових кардіоміоцитів, на 20-ту добу, відмічались поряд з клітинами, які мали нормальну ультраструктуру, КМЦ зі значними змінами. У деяких з цих клітин спостерігалось лише часткове порушення поперечної посмугованості. Але поряд з такими клітинами ми могли спостерігати кардіоміоцити у яких посмугованість і зовсім не визначалась та відбувався розпад міофібрил на дрібні точкові фрагменти (рис. 5).

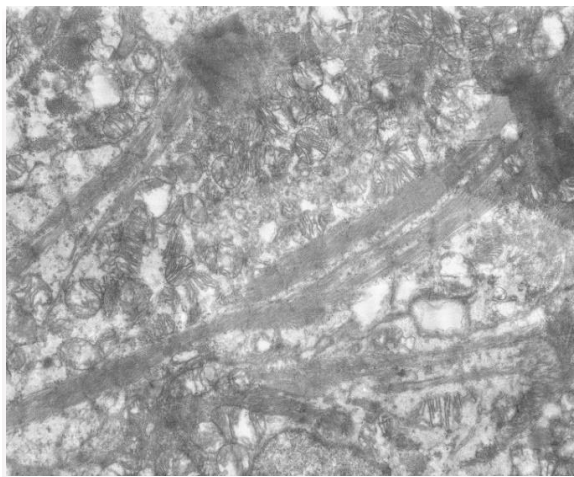


Рис. 5. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Електронограма. $\times 5000$.

У міофібрилах виявлялися ділянки просвітлення, обумовлені розходженням їх структурних компонентів. У зонах набряку чіткість малюнка деяких із них послаблювалась, міофіламенти в них проявлялись менш чітко (рис. 6).

Перш за все, етанол спричиняв порушення структури актинових та міозинових волокон та їх частковий розрив. Розрив відбувається у ділянках Z-дисків, А- та І- дисків. При цьому структури А- та І-дисків були виявлені не чітко, а на деяких електронограмах зовсім відсутні. Це явище також стосувалося і Z-лінії, яка на деяких міофібрилах ставала менш вираженою, а у деяких випадках зовсім зникала. Простір між вставними дисками розширюється, внаслідок чого відзначається порушення з'єднань кардіоміоцитів, що може впливати на здатність проводити нервовий імпульс (рис. 7).

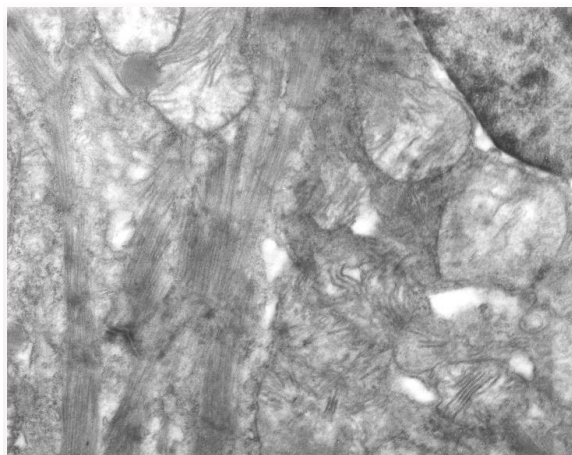


Рис. 6. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Електронограма. $\times 5000$.

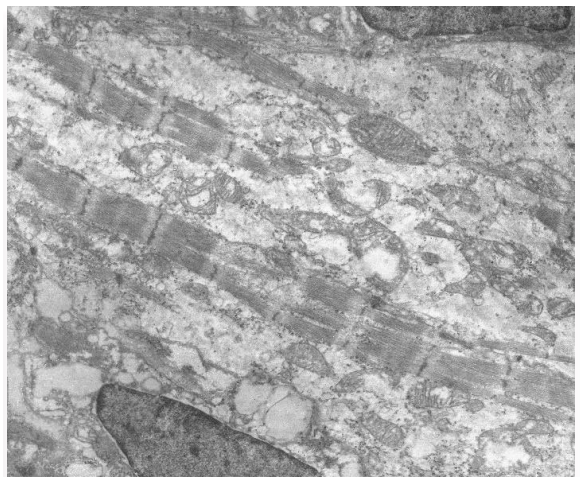


Рис. 7. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Електронограма. $\times 5000$.

Ультраструктура саркомерів, після дії етанолу на міокард шлуночків щурів, значно порушена у ділянках телофрагми і супроводжувалось значним зниженням скоротливої функції кардіоміоцитів. За нашими даними, це явище можливо тому, що етанол перш за все впливав на α -актинін, що входить до складу телофрагми (рис. 8).

Як і на 18-у добу, на 20-у добу ембріогенезу у КМЦ шлуночків спостерігались значні зміни у елементах L- та T-системі. На електронограмі чітко видно, що цистерни саркоплазматичного ретикулуму були розширені та займали значний простір у саркоплазмі. На нашу думку, дане явище пов'язано з змінами вивільнення та надходження кальцію.

Підсумок

Отже, проведене електронно-мікроскопічне дослідження встановило, що хронічна алкоголь-

на інтоксикація, спричиняла неспецифічні якісні зміни в усіх структурних компонентах шлуночкового міокарда серця – міофібрилах, Т-системі, мітохондріях, тим самим руйнувала їх і викликала незворотні наслідки, які призводили до порушень у роботі серця.

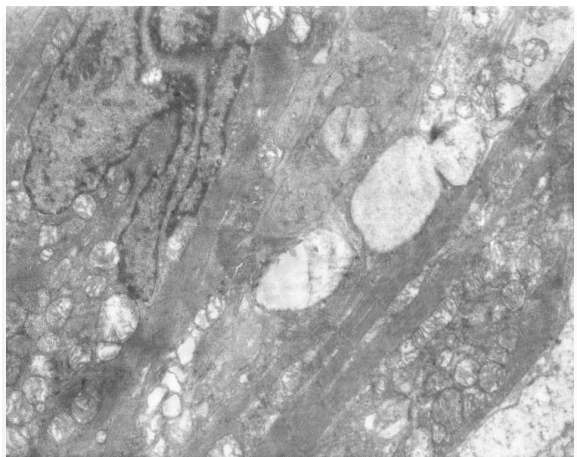


Рис. 8. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Електроннограма. $\times 5000$.

У багатьох частинах серця визначались дефектні міофібрили, які складались з невеликих

блоків одного або двох саркомерів. Стоншення, лізис та розволокнення міофібрил, свідчили про вплив етанолу на головні скоротливі компоненти – актин та міозин. Зміна форми, будови мітохондрій та елементів Т- та L-систем свідчили про зміну проникності мембрани цих компонентів та порушення відповідних функцій. Алкогольна інтоксикація викликала виражені ознаки гіпертермії і гіперплазії внутрішньоклітинних структур, що вказувало на впровадження пристосувально-захисних механізмів. Таким чином пошкоджуючи основні елементи скоротливого апарату КМЦ етанол спричиняв порушення скорочення серцевої м'язової тканини.

Перспективи подальших досліджень

На наступному етапі роботи заплановано дослідити наслідки пренатальної етанолової інтоксикації на ультраструктуру скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів після народження.

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 роботи «Гістогенез компонентів серцево-судинної системи людини та лабораторних тварин у нормі та за умов експерименту» (номер державної реєстрації 0118U004730).

Літературні джерела References

1. Allwork SP. Heart Muscle: Ultrastructural Studies. *J Anat.* 1988;159:200–206.
2. Du A, Sanger JM, Sanger JW. Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Developmental Biology.* 2008;318:236–246.
3. Ehler E, Gautel M. The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008;642:3–14.
4. White J, Wang J, Fan Y, Dube D, Sanger JW, Sanger JM. Myofibril Assembly in Cultured Mouse Neonatal Cardiomyocytes. *Anat Rec (Hoboken).* 2018;301(12):2067-2079.
5. Sanger JW, Kang S, Siebrands CC. How to build a myofibril. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 2005;26(6):343–354.
6. Sanger JW, Kang S, Siebrands CC. How to build a myofibril. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 2005;26(6):343–354.
7. Mironov AA, Komissarchik YuYa, Mironov VA. *Metody elektronnoy mikroskopii v biologii i meditsine: Metodicheskoe rukovodstvo. [Electron microscopy methods in biology and medicine : Methodological Guide]. St. Petersburg: Science; 1994. 400 p. Russian.*
8. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyocytes. *Cardiovascular Research.* 2008;77:659–666.
9. Sanger JW, Wang J, Fan Y, White J, Mi-Mi L, Dube DK, Pruyne D. Assembly and maintenance OF myofibrils in striated muscle. *The Actin Cytoskeleton.* 2016;3(1):39–75.
10. Hedrich HJ. *The Laboratory Mouse. Second Edition. London: Academic Press; 2012. 845 p.*
11. Du A, Sanger JM, Sanger JW. Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Developmental Biology.* 2008;318:236–246.
12. Kuo J. *Electron microscopy: methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc; 2007. 608 p.*

Марченко Д.Г., Черкас О.А. Якісні перебудови в ультраструктурі міокарда ембріонів щурів протягом 16-20-ї доби пренатального розвитку у нормі та після дії етанолу.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Порушення формування компонентів серцево-судинної системи ще у ембріональному періоді може бути викликано різними ендо- та екзогенними факторами, що у подальшо-

му можуть призводити як до розвитку вад серця, так і до летальних випадків. Тому на теперішній час за допомогою багатьох дослідницьких робіт щодо механізму міофібрилогенезу у кардіоміоцитах (КМЦ) увагу дослідників привернуло питання про основні зміни, які відбуваються у структурі основних елементів скоротливого апарату під впливом різних тератогенних факторів. Використання потужного комплексу методів дослідження у розкритті даного питання обумовили значні дослідження у аналізі цієї теми. **Метою** дослідження було порівняти зміни в ультраструктурі скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів, протягом пізніх етапів пренатального розвитку під час нормальному розвитку та після тератогенної дії етанолу. **Результати та підсумок.** Стаття присвячена аналізу змін ультраструктури шлуночкового міокарду ембріонів щурів на протязі пізнього пренатального розвитку. Для даного дослідження використовувалися електронно-мікроскопічні методи з подальшим аналізом електронограм. Результати досліджень свідчать про те, що алкогольна інтоксикація призводить до деструктивних змін у структурі скоротливого апарату кардіоміоцитів (КМЦ) протягом всього розвитку ембріонів щурів. На електронних мікрофотографіях виявлені основні зміни в ультраструктурі А- та І-дисків міофібрил, порушення цілісності саркомерів, зміни форми вставних дисків та Z-диска. В даній статті також звернена увага на зміни в будові елементів тріади, мітохондрій як у нормі, так і після впливу етанолу.

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