

Д.Г. Марченко

Дніпровський державний
медичний університет
Дніпро, Україна

Надійшла: 02.11.2024
Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.66-71>

УДК 616-001.17:615.451.3

ЯКІСНИЙ ТА КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ГІ- СТОЛОГІЧНИХ ЗМІН У СТРУКТУРІ КА- РДІОМІОЦИТІВ ЕМБРІОНІВ ЩУРІВ ПРОТЯГОМ 18-20-Ї ДІБ ЗА УМОВ ХРО- НІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКА- ЦІЇ МАТЕРИНСЬКОГО ОРГАНІЗМУ

Marchenko D.G.   Qualitative and quantitative analysis of histological changes in cardiomyocytes of rat embryos during days 18-20 under conditions of alcohol intoxication in the maternal organism.
Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Alcohol is a teratogen that can easily cross the placenta, leading to the damage of the developing fetus. Studies on laboratory animals and clinical observations have demonstrated that ethanol diffuses through the placenta and is rapidly distributed, accumulating in amniotic fluid. The identification of various adverse effects of prenatal alcohol exposure remains a significant area of concern among scientists. The **purpose** of a study- is to conduct a qualitative and quantitative analysis of histological changes in cardiomyocytes of rat embryos during days 18-20 under condition of chronic alcohol intoxication in the maternal organism. **Methods.** The subjects of study were the hearts of offspring from rats during days 18-20 of prenatal development in a model of chronic maternal alcohol intoxication. Quantitative and qualitative parameters of cardiomyocyte myofibrils from different regions of the ventricular myocardium were assessed using transmission electron microscopy. **Results.** Our findings indicated that following ethanol exposure to the maternal organism, the orientation of damaged myofibrils in the offspring was chaotic and spread over significant areas of the sarcoplasm. Unlike normal conditions, the cardiomyocytes of experimental animals displayed not only myofibrils in a regular contracted or relaxed state, but also those with deformed sarcomeres exhibiting signs of excessive contraction and disorientation of fragmented myofilaments. The intracellular organelles of cardiomyocytes in the experimental group of newborns underwent significant and varied changes. **Conclusions.** Chronic alcohol intoxication during prenatal cardiogenesis damages the contractile apparatus of ventricular cardiomyocytes due to the disorganization of sarcomere structure, fragmentation, and disorientation of myofibrils, significant suppression of sarcomerogenesis, and reduction of myofibril content, which is associated with mitochondrial destruction. The severity of changes in these structures depends on the region and developmental stage of the embryo.

Key words: prenatal ontogenesis, rats, alcohol intoxication, heart, ventricular myocardium, myofibrils, ultrastructure.

Citation:

Marchenko DG. [Qualitative and quantitative analysis of histological changes in cardiomyocytes of rat embryos during days 18-20 under conditions of alcohol intoxication in the maternal organism]. *Morphologia*. 2024;18(4):66-71. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.66-71>

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

 dasha19862305@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Серед багатьох патологій, розповсюджених у світі, особливе місце займає ураження серцево-судинної системи. Воно є однією з основних причин, які можуть призводити до утворення чисельних вад серця, як у ембріональному періоді, так і в дорослому віці, і навіть смерті людини. Тому актуальним залишається дослідження механізму формування скоротливого апарату серця, які б

могли допомогти покращити методики діагностики розвитку різних патологічних станів. Окремий важливий напрям у наукових дослідженнях становлять виникнення вад пов'язаних з впливом патологічними чинниками, серед яких – уживання алкоголю. Вплив етанолу, призводитиме до виникнення дистрофічних змін та зниження скоротливої функції міокарду. Алкогольна кардіоміопатія, яка є результатом хронічної алкогольної інтоксикації, викликає незворотні зміни у структурі

елементів міофібрилярного апарату [1].

У морфологічних і молекулярно-біологічних дослідженнях доведено, що тривала дія етанолу пригнічує синтез і викликає деградацію структурних білків кардіоміоцитів, особливо білків міофібрил – актину, міозину, тітину, небуліну, тропоніну, тропоміозину. Це призводить до ушкодження міофібрил, їх стоншення, дезорієнтації, втрати цілісності, спотворення конфігурації телофрагм та вставних дисків. Показано, що в кардіоміоцитах за умов дії етанолу можна визначити міофібрили як у релаксованому, так і в надмірно скороченому стані [2].

На підставі цих даних вважаємо, що актуальним є аналіз морфологічних особливостей ультраструктури кардіоміоцитів за хронічної дії алкоголю.

Мета

Мета дослідження – провести якісний та кількісний аналіз гістологічних змін у кардіоміоцитах ембріонів щурів протягом 18-ї -20-ї доби за умов хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму

Матеріали та методи

Для дослідження були використані білі лабораторні щури лінії Wistar, маса яких 150–160 г. Усі дослідження проведені згідно з правилами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) і нормами біомедичної етики, відповідно до Закону України №: 3446 - IV 21.02.2006 р., м. Київ, «Про захист тварин від жорстокого поводження» під час проведення медико-біологічних досліджень [3].

Тварин, відібраних для експерименту, розділено на групи: контроль-щури отримували звичайну воду та алкоголізовані -які отримували етанол різної концентрації.

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. 20% розчин надавався щурам не 2 тижня, а 4 тижня. Після їх вагітності етанол надавався самкам-щурів ще 1 тиждень, після чого алкоголь повністю заміщували на воду

Наприкінці дослідження тварин вводили у стан наркозу за допомогою ефіру та вилучали ембріональний матеріал. Для дослідження використовувались ембріони, які знаходилися на 18-й та 20-й добі пренатального розвитку

Під час дослідження структур скоротливого апарату кардіоміоцитів використовували трансмісійну електронну мікроскопію. Зразки міокарда правого та лівого шлуночків і міжшлуночкової перегородки фіксували в охолоджену розчині глютаральдегіду з наступною постфіксацією у розчині тетроксиду осмію. Потім проводили зневоднення у спиртах зростаючої концентрації і

пропіленоксиді. Епоксидні блоки виготовляли з використанням композиції епон-аралдїт. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМТП-6М та розміщали на мідних опорних сітках. Дослідження проводили за допомогою мікроскопа ПЕМ-100-01 при напрузі прискорення 65-90 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 25000 за стандартною схемою. Потім фотографували і сканували фотоплівки для подальшого вивчення [5, 6].

Кількісну оцінку ультраструктурних змін проводили за допомогою морфометричного визначення трьох параметрів: 1. Щільність упаковки міофібрил свідчила про ступінь накопичення акто-міозинових комплексів. 2. Абсолютна питома площа поверхні оцінювала характер їх просторової взаємодії. 3. Ступінь орієнтації міофібрил використали для вимірювання геометричної упорядкованості міофібрил всередині кардіоміоцитів. Отже, всі ці три параметри слугували для визначення ступеня ушкоджень скоротливого апарату з різних боків. Це дозволяло співставляти його стан як між досліджуваними групами, так і між окремими термінами у динаміці кардіогенезу.

Визначення статистичної значущості відмінностей між експериментальною групою (після дії етанолу на материнський організм) та групою інтактних тварин (нормальний розвиток) проводили з урахуванням критерію t Стюдента. У тому випадку, якщо отримане в дослідженні емпіричне розподілення не відповідало нормальному закону, оцінку відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона для пов'язаних вибірок та Манна-Уїтні для не пов'язаних вибірок або із використанням рангового критерію Ван-дер-Вардена. При проведенні біостатистичної обробки отриманих квантифікованих результатів усі необхідні розрахунки виконували в оболонці електронної таблиці Excel при використанні відповідних формул і з використанням ліцензійної програми STATISTICA (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA).

Для аналізу впливу етанолу на формування скоротливого апарату вивчали морфологічні характеристики субепікардіальної (СЕП), інтрамуральної (ІМЗ) і субендокардіальної (СЕН) зон стінки лівого (ЛШ) та правого шлуночків (ПШ), а також лівої (ЛШЧ) та правої (ПШЧ) частин міжшлуночкової перегородки (МШП).

Результати та їх обговорення

Протягом 18-20-ї доби ембріогенезу у кардіоміоцитах експериментальних тварин міофібрили виявлялися протягом усієї цитоплазми, однак розподіл міофібрил в кардіоміоцитах був нерівномірний, зустрічалися ділянки, у яких були відсутні впорядковані актинові та міозинові міофіламенти, спостерігалася часткова фрагментація міофібрил з фрагментацією Z-

дисків (рис. 1, 2, 3).

При хронічній дії етанолу в ембріональних кардіоміоцитах на 18 добу деякі волокна зберігають поперечну посмугованість і форму. Проте в них виявлено ознаки атрофії, що супроводжувалось зменшенням кількості ядер та товщини кардіоміоцитів.

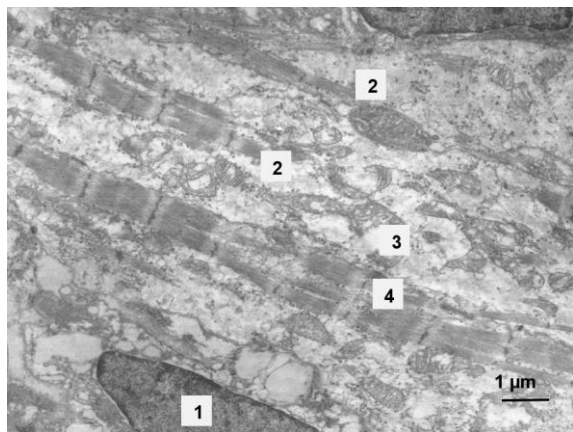


Рис. 1. Міокард щура контрольної групи на 18-у добу пренатального розвитку. 1 – ядро кардіоміоцита; 2 – ушкодження та розрив міофібрили; 3 – руйнування мембран мітохондрій; 4 – поява міофібрил різної товщини; 4 – пошкодження телофрагми.

Товщина кардіоміоцитів була значно менше, порівняно з контролем, що свідчило про зменшення кількості скоротливих елементів, а саме міозинових та актинових філаментів. Інші кардіоміоцити втрачали свою структуру та чіткі межі. Спостерігали порушення впорядкованості міофібрил. Відзначені атрофовані волокна різної товщини, а у деяких випадках саркомери міофібрил були розірвані у ділянках телофрагми.

Було чітко видно різну товщину міофібрил. Зокрема, міофібрили, які мали товщину вдвічі більшу від норми, межували з міофібрилами, товщина яких була в 2-3 рази менша за нормальні структури.

У ембріонів 20-ї доби розвитку кардіоміоцити на рівні окремих клітин характеризуються порушенням цілісності сарколеми, утворенням на ній інвагінацій, розривом міофібрили на окремі короткі фрагменти, заміщення скоротливого апарату колагеновими структурами в ділянках міофібрили, що відділилися. Характерною особливістю цих кардіоміоцитів було порушення непосмугованості. У деяких міофібрилах А- та І-диски майже не визначалися, Z-лінія не була чіткою. Прилеглі до міофібрил структури такі як Т-цистерни та мітохондрії мали змінену форму та були значно розширені. У деяких мітохондрій слабо визначалися кристи. На цьому етапі розвитку, як і на 18-у тиждень ембріогенезу щурів, спостерігалися міофібрили різної товщини.

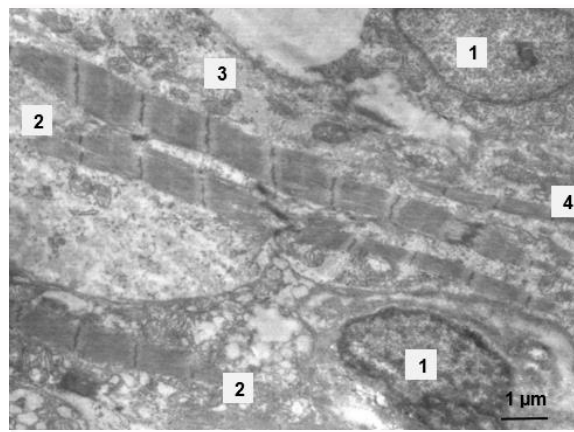


Рис. 2. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. 1 – ядра сусідніх кардіоміоцитів; 2 – порушення цілісності міофібрил; 3 – ушкодження структури мітохондрій; 4 – поява міофібрил різної товщини.

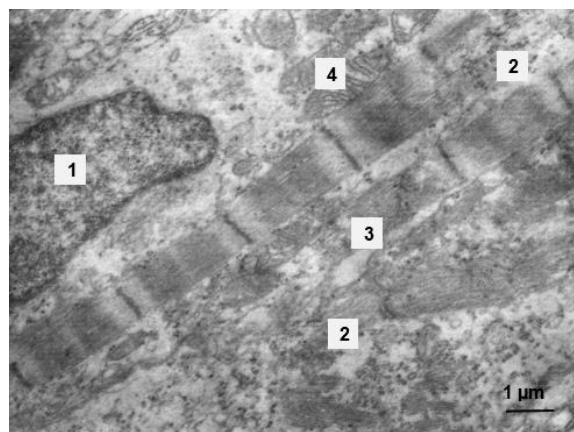


Рис. 3. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. 1 – ядро кардіоміоцита; 2 – ушкодження та розрив міофібрили; 3 – пошкодження телофрагми; 4 – мітохондрії.

Хронічне зловживання етанолом явно пригнічує синтез і деградацію білка, залучаючи як структурні, так і неструктурні білки серця. На патологічному рівні викривлення Z-лінії саркомерів і порушення візерунка саркомерів призводить до міоцитолізу. Міоцитоліз проявляється через вогнищеве розчинення міоволокон, вакуолізацію клітин і розлад волокон. На саркомерний комплекс, на який впливав етанол, зменшувався вміст тітину, білка, який відповідає за розслаблення саркомерів. Етанол також знижував чутливість міофіламентів до Ca^{2+} . Крім того, етанол також впливав на скоротливі білки саркомерів, такі як міозин, актин і тропонін, що спричиняв функціональну дисфункцію скорочувальної здатності міоцитів, викликаючи прогресування серцевої недостатності. Оскільки серцеві міоцити є збудливими клітинами, і етанол може легко пошкодити цей механізм збудження-скорочення, порушення цього механізму з'єднання бере участь у патогенному

процесі АСМ. Етанол може викликати модифікацію Ca^{2+} -каналів L-типу сарколемальної мембрани, що призводить до зменшення трансмембранних електрично індукованих Ca^{2+} переміщень процесів.

Патологічні перебудови внаслідок пренатальної алкоголізації відбувалися й у мітохондріальному апараті: органели різної величини і конфігурації містили матрикс помірної електронної щільності та поодинокі слабко розвинуті кристи. Кількість мітохондрій з ознаками обмеженої функціональної активності помітно збільшувалась у порівнянні з новонародженими тваринами. Такі органели концентрувалися переважно в парануклеарних ділянках і розподілялися по тих просторах, які зазнавали літичної дисоціації міофібрил. Примітивна Т-система була представлена розширеними недорозвинутими трубочками та цистернами. Вторинні розгалуження також характеризувалися значними розширеннями, що не було характерним для нормального розвитку. Проте більшість мітохондрій все ще зберігали свою нормальну будову (рис. 4).

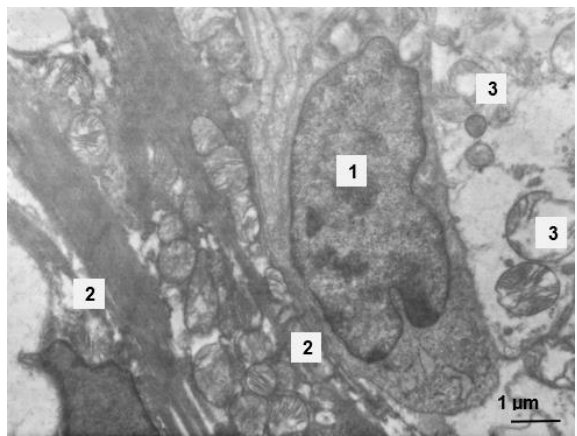


Рис. 4. Міокард щура контрольної групи на 20-у добу пренатального розвитку. 1 – ядро кардіоміоцита; 2 – ушкодження та розрив міофібрили; 3 – пошкодження мітохондрії.

Протягом 18-ї та 20-ї діб ембріонального розвитку після алкоголізації материнського організму спостерігалися зміни в тенденції наростання параметрів у СЕН міокарда обох шлуночків, що відбувалося на тлі значного зростання міокардіальної маси цих компактних зон у порівнянні з раннім періодом ембріогенезу. Після алкогольної інтоксикації відбувалося збільшення ступеня орієнтації міофібрил. Це пов'язано з тим, що у даний період провідними процесами міофібрилогенезу було не упакування та рівномірне розташування міофібрил по всій саркоплазмі кардіоміоцита, а зменшення кількості неорганізованих примітивних структур. Активні зміни ступеня орієнтації спостерігалися до 20-ї доби пренатального розвитку. Надалі темпи зростання параметра уповільнювалися. Починаючи з

20-ї доби спостерігалися суттєві зміни в параметрах різних зон шлуночкового міокарда. Як і при нормальному розвитку, в цей період морфометричні показники міофібрил у СЕН і ІМЗ шлуночкового міокарда прискорювали темпи. І вже при народженні параметри в цих зонах випереджали відповідні показники кардіоміоцитів СЕН обох шлуночків, що підтверджувало класичні уявлення про активну компактизацію міокарда СЕН та ІМЗ у даний період.

У тварин експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку значення ступеня орієнтації міофібрил достовірно поступалися нормальному рівню у всіх зонах міокарда: у СЕН – на 40,7% у ЛШ та на 40,0% у ПШ, в ІМЗ – на 30,3% у ЛШ та на 21,0% у ПШ, у СЕН – на 32,5% у ЛШ та на 20,7% у ПШ, у МШП – на 30,5% у ЛШЧ та на 24,5% у ПШЧ перегородки (рис. 5).

За умов нормального розвитку на 20-у добу пренатального онтогенезу величина ступеня орієнтації міофібрил підвищувалася у СЕН у ЛШ на 38,2% ($p < 0,05$) та у ПШ – на 29,3% ($p < 0,05$) у порівнянні з 18-ю добою (рис. 6).

Також показники достовірно зростали в ІМЗ у ЛШ на 58,3% та у ПШ – на 68,9%. Значення ступеня орієнтації міофібрил МШП зросли на 33,1% ($p < 0,05$) у ЛШЧ та 35,7% ($p < 0,05$) у ПШЧ порівняно з показниками попереднього терміну дослідження.

В експериментальній групі тварин протягом 20-ї доби значення ступеня орієнтації міофібрил статистично вагомо відрізнялися від показників 18-ї доби. Зокрема, значення параметра вірогідно підвищувалися в ІМЗ – на 51,9% у ЛШ та на 70,6% у ПШ, у СЕН – на 34,4% у ЛШ та на 34,5% у ПШ, у МШП – на 24,0% у ЛШЧ та на 42,0% у ПШЧ. У порівнянні з нормальним кардіогенезом величина параметра в кардіоміоцитах СЕН достовірно зменшувалася на 41,5% у ЛШ та на 40,2% у ПШ, в ІМЗ – на 31,1% у ЛШ та на 20,2% у ПШ, у СЕН – на 32,7% у ЛШ та на 21,8% у ПШ. Ступінь орієнтації у ЛШЧ МШП поступався нормальному значенню на 32,4% ($p < 0,05$) та у ПШЧ МШП – на 21,0% ($p < 0,05$).

Отримані в нашому дослідженні дані про характер дезорганізації міофібрил після внутрішньоутробного впливу алкоголю узгоджуються з сучасними уявленнями про токсичну дію даного чинника на структуру та функцію кардіоміоцитів, а ультраструктурний аналіз змін суттєво уточнює характер патологічних перебудов скоротливого апарату міокарда під час його формування на різних етапах онтогенезу

Підсумок

Хронічна алкогольна інтоксикація під час пренатального кардіогенезу ушкоджує скоротливий апарат кардіоміоцитів шлуночків за рахунок дезорганізації структури саркомерів, фрагмента-

ції та дезорієнтації міофібрил, значного пригнічення саркомерогенезу, зниження вмісту міофібрил, що асоційовано з деструкцією міто-

хондрій. Виразність змін у даних структурах залежить від зони та терміну розвитку ембріона.

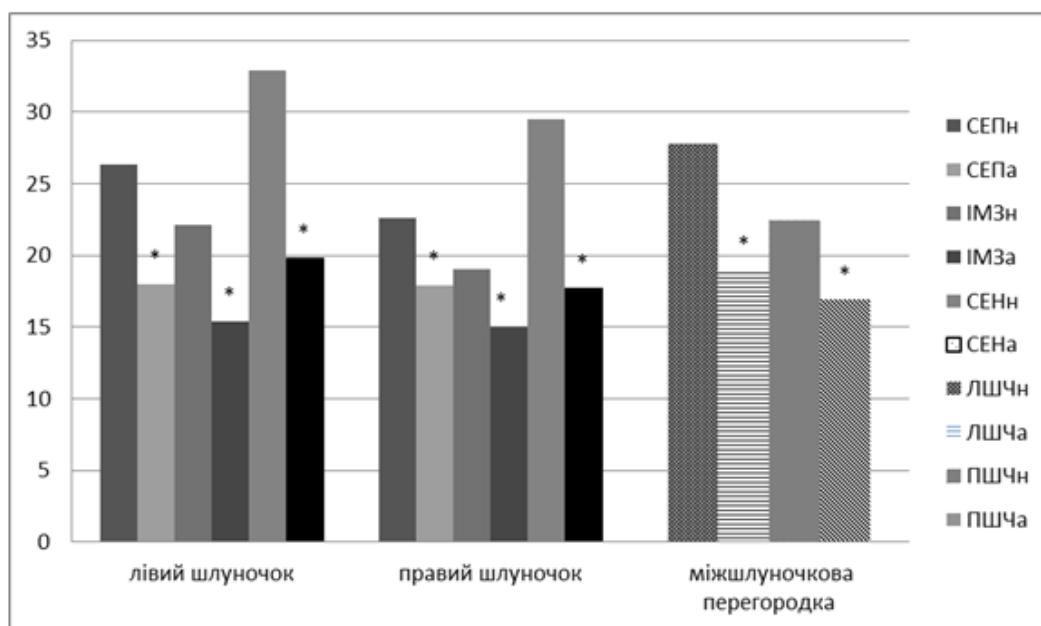


Рис. 5. Ступінь орієнтації міофібрил (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів різних зон шлуночкового міокарда щурів на 18-у добу пренатального онтогенезу в нормі та після дії алкоголю. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від норми. СЕР (СЕРн – норма, СЕРа – алкоголь) – субепікардіальна 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.

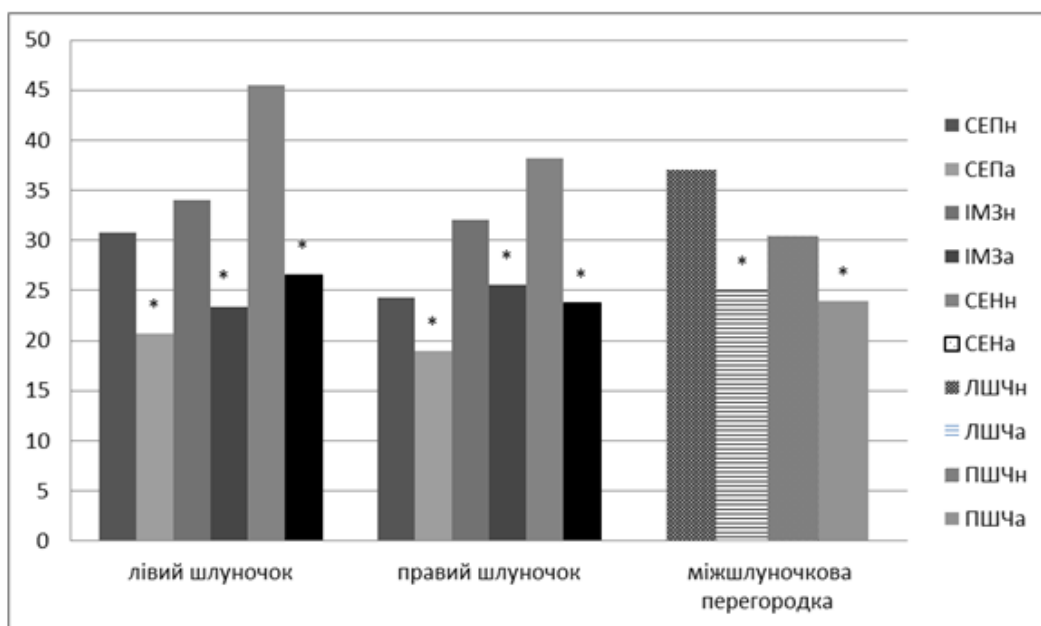


Рис. 6. Ступінь орієнтації міофібрил (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів різних зон шлуночкового міокарда щурів на 20-у добу пренатального онтогенезу в нормі та після дії алкоголю. Позначки (*) вказують на достовірні відмінності від норми. СЕР (СЕРн – норма, СЕРа – алкоголь) – субепікардіальна 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.

Перспективи подальших розробок
пов'язані з вивченням наслідків постнатальної алкоголізації на структуру 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
Роботу проведено в рамках науково-дослідної теми «Гістогенез компонентів серцево-судинної системи людини та лабораторних тварин в

нормі та за умов експерименту» (номер державної реєстрації 0118U004730).

Літературні джерела References

1. Conen D. Alcohol consumption and incident cardiovascular disease: not just one unifying hypothesis. *Eur. Heart J.* 2015;36(15):897–898.
2. Gardner JD, Mouton AJ. Alcohol effects on cardiac function. *Compr. Physiol.* 2015;5(2):791-802.
3. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. 18 Mar 1986. 53 p.
4. Becker HC. Animal models of excessive alcohol consumption in rodents. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;13:355–377.
5. Hayat MA, author: Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications. 4th. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. 543 p.
6. Kuo J, author: Electron microscopy: methods and protocols. Totowa (New Jersey): Humana Press Inc; 2007. 608 p.

Марченко Д.Г. Якісний та кількісний аналіз гістологічних змін у структурі кардіоміоцитів ембріонів щурів протягом 18-20-ї діб за умов хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Алкоголь є тератогеном, який легко може проникати через плаценту, що призводить до пошкодження плода, що розвивається. Дослідження, як на лабораторних тваринах, так і клінічні, продемонстрували, що етанол дифундує через плаценту і швидко розподіляється, накопичуючись в навколоплідних водах. Виявлення ряду несприятливих наслідків пренатального впливу алкоголю все ще залишається актуальною сферою серед науковців. **Мета** дослідження – провести якісний та кількісний аналіз гістологічних змін у кардіоміоцитах ембріонів щурів протягом 18-ї -20-ї доби за умов хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму. **Методи.** Об'єктом дослідження слугували серця потомства щурів від 18-ї до 20-ї доби пренатального розвитку в моделі хронічної алкогольної інтоксикації материнського організму. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії визначені кількісні та якісні параметри міофібрил кардіоміоцитів різних зон міокарда шлуночків. **Результати.** За нашими дослідженнями було встановлено, що після впливу етанолу на материнський організм, орієнтація ушкоджених міофібрил їхнього потомства була хаотичною та розповсюджувалась на значні ділянки саркоплазми. На відміну від норми, в кардіоміоцитах експериментальних тварин поряд з міофібрилами, які перебували у звичайному скороченому або релаксованому стані, були й такі, що містили деформовані саркомери з ознаками надмірного скорочення та дезорієнтацією фрагментованих міофіламентів. Внутрішньоклітинні органели кардіоміоцитів в експериментальній групі новонароджених тварин зазнавали значних і різноманітних змін. **Підсумок.** Хронічна алкогольна інтоксикація під час пренатального кардіогенезу ушкоджує скоротливий апарат кардіоміоцитів шлуночків за рахунок дезорганізації структури саркомерів, фрагментації та дезорієнтації міофібрил, значного пригнічення саркомерогенезу, зниження вмісту міофібрил, що асоційовано з деструкцією мітохондрій. Виразність змін у даних структурах залежить від зони та терміну розвитку ембріона.

Ключові слова: пренатальний онтогенез, щури, алкогольна інтоксикація, серце, міокард шлуночків, міофібрили, ультраструктура.