

Н. С. Петрук

## Ультраструктурний аналіз будови та розподілу адгерентних міжклітинних контактів у шлуночковому міокарді щурів на етапах постнатального онтогенезу після дії хронічної пренатальної гіпоксії

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

**Ключові слова:** міокард шлуночків, адгерентні контакти, щури, постнатальний онтогенез, пренатальна гіпоксія.

Виконали ультраструктурний аналіз будови та розподілу адгерентних міжклітинних контактів кардіоміоцитів шлуночків у щурів на 1, 3, 7, 14 і 30 добу постнатального онтогенезу і серед статевозрілих особин у нормі та після дії хронічної пренатальної гіпоксії. У постнатальному періоді онтогенезу в експериментальній групі тварин спостерігали затримку перерозподілу адгерентних контактів від бічної поверхні клітини до ділянки вставного диска. Якісні зміни десмосом характеризуються дистопічним розташуванням, у тому числі на рівні лінії міофіламентів, а також появою гетероморфності їхньої профільної довжини. Морфологія fasciae adhaerentes характеризується значним ступенем варіювання – від прямих косо орієнтованих до значно звивистих профілів контакту. Відзначили суттєве розширення міжмембранного простору зони злипання експериментальної групи щурів, що у зрілому міокарді переважає значення показників норми на 303,9% ( $p < 0,05$ ) у лівому, на 37,3% ( $p < 0,05$ ) у правому шлуночках, а ступінь екстазії контакту у лівому відділі серця перевищує рівень у правому на 216,5% ( $p < 0,05$ ).

### Ультраструктурный анализ строения и распределения адгерентных межклеточных контактов в желудочковом миокарде крыс на этапах постнатального онтогенеза в норме и после воздействия хронической пренатальной гипоксии

Н. С. Петрук

Выполнен ультраструктурный анализ строения и распределения адгерентных межклеточных контактов кардиомиоцитов желудочков крыс на 1, 3, 7, 14 и 30 сутки постнатального онтогенеза и среди половозрелых особей в норме и после воздействия хронической пренатальной гипоксии. В постнатальном периоде онтогенеза в экспериментальной группе животных отмечена задержка перераспределения адгерентных контактов с боковой поверхности клетки в сторону области вставочного диска. Качественные изменения десмосом характеризуются дистопическим расположением, в том числе на уровне линии миофиламентов, а также появлением гетероморфности их профильной длины. Морфология fasciae adhaerentes характеризуется значительной степенью вариации – от прямых косо ориентированных до значительно извитых профилей контакта. Определили существенное расширение межмембранного пространства зоны слипания в экспериментальной группе животных, которое в зрелом миокарде преобладает над показателями нормы на 303,9% ( $p < 0,05$ ) в левом, на 37,3% ( $p < 0,05$ ) в правом желудочке, а степень эктазии контакта в левом отделе сердца превышает уровень в правом на 216,5% ( $p < 0,05$ ).

**Ключевые слова:** миокард желудочков, адгерентные контакты, крысы, постнатальный онтогенез, пренатальная гипоксия.*Патология. – 2013. – №3 (29). – С. 78–82*

### Ultrastructural analysis of the structure and distribution of the adherens junctions in the rats' ventricular myocardium during postnatal stages of ontogeny after the influence of chronic prenatal hypoxia

N.S. Petruk

We have conducted ultrastructural analysis and distribution of the adherens junctions in the rat's ventricles on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 30th days during postnatal ontogeny and among mature animals in the normal and after the chronic fetal hypoxia. We found that there is retention of redistribution of the adherens junctions from the lateral surface of the cell to the area of the intercalated disks. The qualitative changes of the desmosomes are characterized by their dystopic location and also at the level of the myofilaments line and there is the appearance of the heteromorphy of the profile length. Morphology of the fascia adherens is characterized by a significant degree of variation: from the direct oblique oriented to the convoluted profiles of junctions. There is a significant dilatation of the intermembrane space area of the fascia adherens in experimental group of rats, which is 303,9% ( $p < 0,05$ ) greater than norm in the left and 37,3% ( $p < 0,05$ ) in the right ventricle in the mature myocardium, and the degree of junction's ectasia in the left ventricle is 216,5% ( $p < 0,05$ ) greater than in the right.

**Key words:** ventricular myocardium, adherens junctions, rats, postnatal ontogeny, prenatal hypoxia.*Pathologia. 2013; №3 (29): 78–82*

Анте- та пренатальна гіпоксія викликає зміни в організмі плода та новонародженого, зокрема в міокарді [1]. Гіпоксичне ураження серцево-судинної системи визначають у 40–70% новонароджених дітей [2]. Нині актуальнішими стають морфологічні дослідження для пренатальної діагностики вад серця у людини. Безпосереднє спостереження за розвитком вад у людини утруднене, однак за допомогою експериментальних моделей стає реальним аналіз змін у серці під час формування вроджених патологій. Рання діагностика

та своєчасна корекція патологічних змін серця у дітей першого року життя може стати важливим фактором зниження частоти та ступеня тяжкості кардіоваскулярних захворювань у дітей старшого віку та дорослих.

На етапах нормального постнатального онтогенезу відбувається процес активного перерозподілу дисперсно розташованих по сарколемі контактів у бік термінальних ділянок кардіоміоцитів, що завершується з досягненням щурами статевозрілого віку та до 6 років у людини [3,4]. Проте відомості щодо впливу хронічної пренатальної

гіпоксії на спеціалізований контактний апарат кардіоміоцитів шлуночків щурів залишаються не повними і потребують подальшого поглибленого вивчення.

### Мета роботи

Виконати якісний і кількісний порівняльний ультраструктурний аналіз змін адгерентних міжклітинних сполучень кардіоміоцитів у щурів на етапах постнатального онтогенезу в нормі та після дії хронічної пренатальної гіпоксії.

### Матеріали і методи дослідження

Об'єктом вивчення під час експериментально-морфологічного дослідження були білі безпородні щури масою  $220 \pm 25$  г на різних термінах постнатального онтогенезу (1, 3, 7, 14, 30 діб після народження та статевозрілі особини). Експериментальну групу склали 54 тварини, яким моделювання хронічної гіпоксії за змішаним типом виконали за допомогою внутрішньоочеревинного введення 1%-го водного розчину  $\text{NaNO}_2$  у добовій дозі 50 мг/кг маси тіла у термін від 10 до 21 доби вагітності. Як контроль використали щурів (42 тварини), яким внутрішньоочеревинно вводили 1 мл 0,9%-го розчину  $\text{NaCl}$ . Отримання датованої вагітності та забір матеріалу здійснювали згідно зі стандартними методиками. Утримували тварин в умовах віварію і виконували експеримент згідно із вимогами «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та Закону України № 1759-VI від 15.12.2009 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Готували матеріал для подальшого морфологічного вивчення методами електронної та світлової мікроскопії за загальноприйнятими правилами [5,6]. Дослідження виконали в лабораторії електронної мікроскопії кафедри гістології (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.

Електроннограми отримували за допомогою знімання ультратонких зрізів за оригінальним способом [7] із наступним відцифруванням за допомогою сканера з високою роздільною здатністю (Canon 9000F). Зображення зберігали у форматі TIFF. Для подальшого аналізу використовували спеціалізоване програмне забезпечення ImageJ v.1.47 (розробка ініційована автором Wayne Rasband в Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Maryland, USA, поширюється без ліцензійних обмежень як суспільне надбання) [8].

Для кількісної характеристики динаміки перерозподілу адгерентних контактів розраховували відносний вміст сумарної довжини профілів у торцевій ділянці кардіоміоциту щодо загальної профільної довжини відповідного з'єднання. Аналіз вірогідності розходжень між вибірками здійснювали з урахуванням парного t-критерію Стьюдента.

### Результати та їх обговорення

Морфологічний аналіз перебудов міжклітинних взаємодій кардіоміоцитів у відповідь на вплив хронічної пренатальної гіпоксії дозволив встановити низку суттє-

вих змін контактної апарату серця щурів у порівнянні з контрольною групою.

Дослідження динаміки змін сумарної довжини профілів fasciae adhaerentes і десмосом у торцевих ділянках кардіоміоцитів шлуночкового міокарда щодо загальної профільної довжини відповідного типу з'єднання виявив затримку перерозподілу контактів із бічної поверхні клітини у відповідь на вплив хронічної пренатальної гіпоксії (рис. 1).

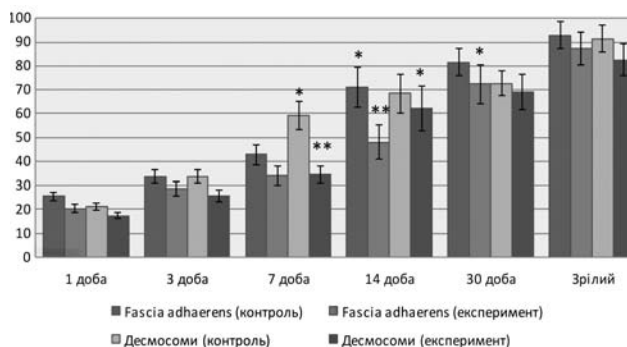


Рис. 1. Динаміка змін сумарної довжини профілів fascia adhaerens і десмосом у торцевій ділянці кардіоміоцитів шлуночкового міокарда щодо загальної профільної довжини відповідного типу з'єднання (%) протягом постнатального онтогенезу в нормі та після дії хронічної пренатальної гіпоксії. Примітки: \* – достовірна різниця ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з попередньою стадією розвитку; \*\* – достовірна різниця ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з показниками норми.

На момент народження у термінальній ділянці інтактних кардіоміоцитів визначено  $21,31 \pm 1,49\%$  від загальної профільної довжини десмосом. В експериментальній групі цей показник був несуттєво нижчим і становив  $17,42 \pm 1,39\%$ . На відміну від групи контролю, в якій найінтенсивніше збільшення параметра визначали від 3 до 7 доби (на  $76,5\%$ ;  $p < 0,05$ ), у щурів, які зазнавали впливу внутрішньоутробної гіпоксії, збільшення вмісту maculae adhaerentes у ділянці вставного диска спостерігали від 7 до 14 доби, воно становило  $80,6\%$  ( $p < 0,05$ ). Отже, статистично вагома різниця параметра між обома групами визначена на 7 добу розвитку і становила  $-42,2\%$  у порівнянні з нормою. Однак від 14-ї доби дослідження різниця між показниками норми та експериментальної групи втрачала статистичну значущість.

На 1 добу постнатального розвитку в обох групах fasciae adhaerentes також були обмежено представлені у торцях клітин та часто перемижувались із неспеціалізованими ділянками сарколеми. Статистично вагоме збільшення показника в нормі відзначали на 14 добу онтогенезу (на  $66,1\%$  порівнюючи з попередньою стадією розвитку), а за умов експерименту – на 30 добу постнатального розвитку (на  $50,9\%$  щодо показників 14 доби). Достовірна різниця значень експериментальної групи у порівнянні з показниками контролю відзначена на 14 добу життя та становила  $-48,4\%$ . На наступних стадіях онтогенезу вагомої різниці між показниками у нормі та в експерименті не встановили.

Якісні зміни maculae adhaerentes у відповідь на вплив хронічної пренатальної гіпоксії виявлялись у дистопіч-

ному розташуванні, у тому числі на рівні лінії міофіламентів. Крім цього, відзначено появу гетероморфності профільної довжини десмосом: збільшувалась кількість малих *maculae adhaerentes*, що часто розташовувались серіями, нерідко відмежовуючи послідовність із щільних контактів, та з'являлись видовжені десмосоми (рис. 2).

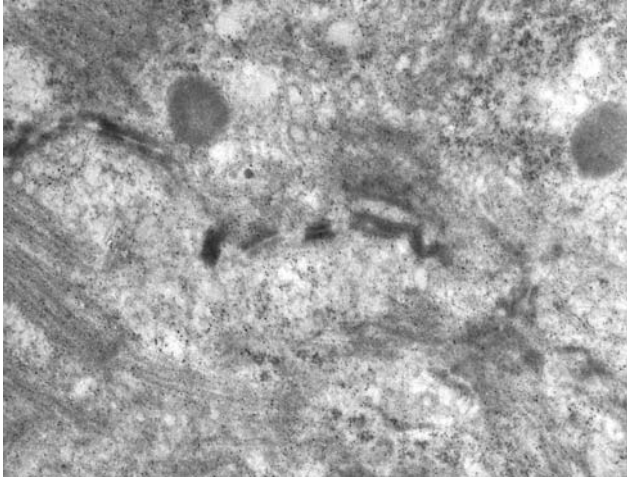


Рис. 2. Серія десмосом на латеральній поверхні кардіоміоцитів у правому шлуночку щура на 3 добу постнатального онтогенезу.  $\times 20000$ .

В експериментальній групі тварин морфологія *fascia adhaerens* значно варіювала на досліджуваних етапах постнатального онтогенезу: від прямих косо орієнтованих до значно звивистих профілів контакту (рис. 3).

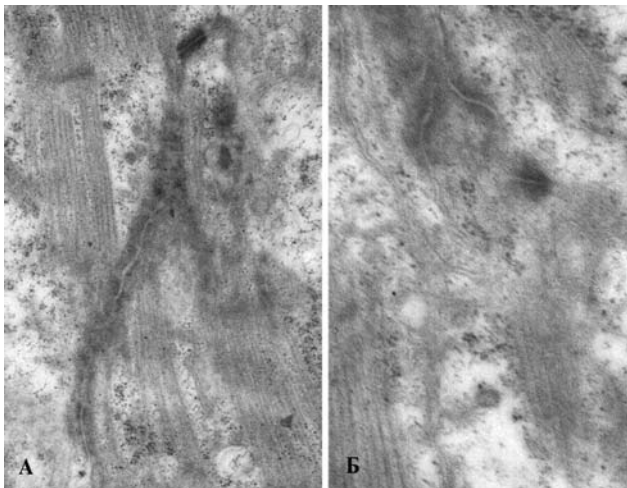


Рис. 3. Адгерентні контакти кардіоміоцитів лівого шлуночка щурів експериментальної групи на 7 добу постнатального онтогенезу. А,  $\times 25000$ ; Б,  $\times 40000$ .

Визначили суттєве розширення (ектазію) міжмембранного простору цього типу з'єднання порівнюючи із групою контролю. Ступінь виразності ультраструктурних змін цього параметру значно відрізнявся під час порівняння лівого та правого шлуночків і залежав від рівня розвитку та вмісту міофібрилярної складової кардіоміоцитів. Також нерідко крайові ділянки *fascia adhaerens* у будові складчастого сегмента вставного диска розташовувались на відстані одна від одної (рис. 4).

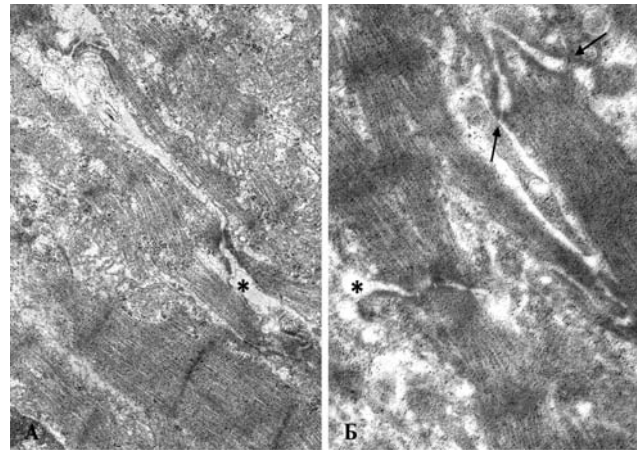


Рис. 4. Розширення міжклітинного простору зони злипання в міокарді лівого шлуночка щурів експериментальної групи. А – 7 доба постнатального онтогенезу,  $\times 16000$ ; Б – 14 доба постнатального онтогенезу,  $\times 20000$ .

Примітки: \* – ектазія крайової ділянки *fascia adhaerens*, стрілки – десмосоми, що обмежують на кінцях зону злипання.

Так, на етапах нормального постнатального онтогенезу величина міжмембранного простору *fascia adhaerens* позначена поступовим збільшенням показника у лівому та правому шлуночках серця (табл. 1). Протягом оцінки динаміки змін показника у порівнянні з його значенням на 1 добу життя достовірно вагома різниця відзначена від 30 доби постнатального онтогенезу. Зокрема, наприкінці першого місяця розмір міжмембранного простору *fascia adhaerens* у лівому шлуночку перевищував вихідні значення на 45,3% ( $p < 0,05$ ), а у правому – на 40,6% ( $p < 0,05$ ). Із досягненням статевозрілого віку ця різниця становила 55,5% ( $p < 0,05$ ) і 53,9% ( $p < 0,05$ ) відповідно у лівому та правому відділах.

Таблиця 1

Величина міжмембранного простору *fasciae adhaerentes* у складі шлуночків міокарда щурів у нормі та за умов хронічної пренатальної гіпоксії на етапах постнатального онтогенезу ( $M \pm m$ )

Вік	Fasciae adhaerentes (норма), нм		Fasciae adhaerentes (гіпоксія), нм	
	ЛШ	ПШ	ЛШ	ПШ
1 доба	24,31 $\pm$ 1,94	22,84 $\pm$ 1,82	23,75 $\pm$ 1,9	25,61 $\pm$ 2,05
3 доби	25,93 $\pm$ 2,50	23,17 $\pm$ 2,32	24,13 $\pm$ 2,41	28,42 $\pm$ 2,84
7 діб	28,76 $\pm$ 3,16	25,62 $\pm$ 2,82	39,52 $\pm$ 5,14*	34,36 $\pm$ 4,47
14 діб	32,56 $\pm$ 4,88	30,81 $\pm$ 4,62	77,44 $\pm$ 13,16*††	41,62 $\pm$ 7,08*†
30 діб	35,32 $\pm$ 3,18*	32,11 $\pm$ 2,89*	142,81 $\pm$ 21,32*††	44,89 $\pm$ 5,83*††
Зрілий	37,81 $\pm$ 2,65*	35,14 $\pm$ 2,46*	152,72 $\pm$ 18,33*††	48,25 $\pm$ 5,79*††

Примітки: \* – достовірна різниця ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з відповідним значенням на 1 добу життя; † – достовірна різниця ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з відповідними значеннями норми; †† – між значеннями у правому та лівому шлуночках.

Морфометричний аналіз тенденції змін величини міжмембранного простору в експериментальній групі дав змогу встановити, що на початку постнатального періоду (від 1 до 3 доби) значення показника було несуттєво більшим у міокарді правого шлуночка та достовірно не відрізнялось від рівня контролю на відповідних

термінах. Однак від 14 доби постнатального онтогенезу зі збільшенням проявів гіпертрофії, ектазії fasciae adhaerentes ставали виразнішими. У лівому шлуночку щурів експериментальної групи величина міжмембранного простору достовірно відрізнялась від рівня контролю на +137,8%, а значення параметра у правому шлуночку суттєво не відрізнялись від норми. Також починаючи саме з кінця другого тижня постнатального розвитку різниця між значеннями параметра у лівому та правому шлуночках ставала статистично вагомою (на 86,1% щодо правого відділу). На 30 добу після народження міжмембранна відстань продовжувала збільшуватись, що найбільше було помітно у лівому шлуночку серця. Під час порівняння з попередньою досліджуваною стадією розвитку встановили приріст показника на 84,4% ( $p < 0,05$ ), а щодо значень норми – на 304,6% ( $p < 0,05$ ). Збільшення величини міжмембранного простору fasciae adhaerentes у правому шлуночку було помірним, переважаючи рівень контролю на 39,8% ( $p < 0,05$ ). У зрілому міокарді експериментальної групи щурів значення показника у лівому шлуночку було більшим за норму на 303,9% ( $p < 0,05$ ) і на 37,3% ( $p < 0,05$ ) у правому. У свою чергу, ступінь ектазії контакту в лівому відділі серця перевищував такий у правому на 216,5% ( $p < 0,05$ ).

Протягом аналізу електронограм шлуночкового міокарда, що зазнавав впливу хронічної пренатальної гіпоксії, на тлі максимально скорочених кардіоміоцитів визначали «надриви» тканини по лінії торцюючих їх fasciae adhaerentes, що найчастіше виявляли в лівому відділі серця від третього тижня онтогенезу (рис. 5).

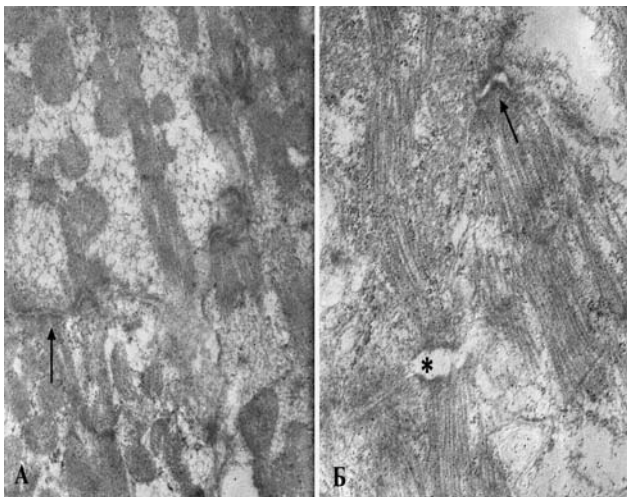


Рис. 5. Міокард правого (А) та лівого (Б) шлуночків щурів експериментальної групи на 7 добу постнатального онтогенезу. Відзначається різний ступінь розвитку міофібрилярного апарата кардіоміоцитів. Розширення fasciae adhaerentes (стрілка) та «надрив» по лінії цього типу з'єднання (\*) у лівому шлуночку. А,  $\times 12000$ ; Б,  $\times 20000$ .

Різний ступінь виразності ектазії зон злипання у правому та лівому шлуночках можна пояснити різною реакцією міофібрилярного апарата кардіоміоцитів на вплив внутрішньоутробної пренатальної гіпоксії. Так, у лівому відділі серця відзначено активний ріст і роз-

виток міофібрил, а у правому шлуночку – зниження їхнього вмісту в порівнянні з нормою на відповідному терміні та наростання дезорганізації міофіламентів. Визначено також скорочення довжини складчастого сегмента вставного диска та порушення регулярності його складчастості (рис. 6).

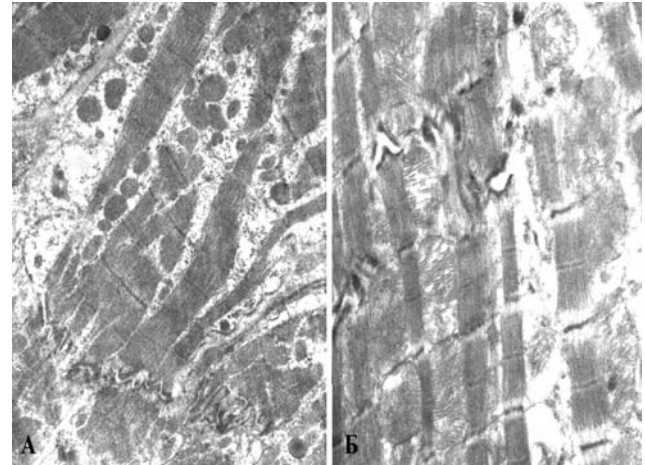


Рис. 6. Міокард правого (А) та лівого (Б) шлуночків щурів експериментальної групи на 30 добу постнатального онтогенезу. Ектазії fasciae adhaerentes мають різний ступінь виразності. Спостерігається поліморфізм складчастої ділянки вставного диска. А,  $\times 10000$ ; Б,  $\times 10000$ .

Сукупність змін fasciae adhaerentes, імовірно, пов'язана із порушенням адгезивних властивостей зони злипання, що внаслідок активного, хоч й дещо відстроченого, постнатального росту та гіпертрофії ставали уразливішими до сили скорочень міофібрилярного апарата клітини. Питання про те, чи впливала хронічна пренатальна гіпоксія на стан адгезивних молекул десмосом та як це позначилось на їхніх механічних властивостях, у подальшому потребує вирішення із залученням додаткових методичних підходів.

Слід відзначити, що описані адаптивні перебудови контактного апарата відбувались на фоні виразного фіброзу міжклітинного простору в міокарді щурів експериментальної групи, що на тканинному рівні може зумовлювати погіршення механічної кооперації кардіоміоцитів.

#### Висновки

1. У постнатальному періоді онтогенезу визначено затримку перерозподілу адгерентних контактів від бічної поверхні клітини до ділянки вставного диска у відповідь на вплив хронічної пренатальної гіпоксії. У групі контролю найінтенсивніше збільшення вмісту десмосом у торцевій ділянці кардіоміоцитів спостерігали від 3 до 7 доби, воно становило 76,5% ( $p < 0,05$ ). У щурів експериментальної групи збільшення вмісту десмосом у ділянці вставного диска відзначається від 7 до 14 доби та становить 80,6% ( $p < 0,05$ ). У нормі вагоме збільшення вмісту сумарної довжини fasciae adhaerentes у торцях кардіоміоцитів спостерігається на другому тижні життя та становить 66,1%, а за умов експерименту – від 14 до 30 доби життя (50,9%;  $p < 0,05$ ).

2. За умов впливу хронічної пренатальної гіпоксії відзначається дистопічне розташування десмосом, з'являється гетероморфність їхньої профільної довжини: збільшується кількість коротких десмосом, що часто розташовуються серіями, нерідко відмежовуючи послідовність із щільних контактів, та з'являються видовжені форми. На етапах постнатального онтогенезу в експериментальній групі тварин морфологія fasciae adhaerentes характеризується значним ступенем варіювання: від прямих косо орієнтованих до значно звивистих профілів контакту. Відзначається суттєве розширення міжмембранного простору fascia adhaerens у порівнянні з групою контролю, що залежить від рівня розвитку та вмісту міофібрилярної складової кардіоміоцитів. На 30 добу після народження величина міжмембранного простору у лівому шлуночку перевищує значення норми на відповідному терміні на 304,6% ( $p < 0,05$ ), а у правому шлуночку – на 39,8% ( $p < 0,05$ ). У зрілому міокарді щурів експериментальної групи значення показника у лівому шлуночку перевищує норму на 303,9% ( $p < 0,05$ ) та на 37,3% ( $p < 0,05$ ) у правому шлуночку. Ступінь екстазії контакту у лівому відділі серця перевищує рівень у правому на 216,5% ( $p < 0,05$ ).

**Перспективи подальшої роботи** полягають у морфологічному вивченні розподілу міжклітинних контактів на етапах пренатального кардіогенезу в нормі та за умов впливу хронічної гіпоксії.

**Відомості про автора:**

Петрук Н.С., очний аспірант каф. гістології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,  
E-mail: petruk\_dp@gmail.com.

**Список літератури**

1. Черкасов Н.С. Особенности сердечной деятельности при гипоксической кардиопатии у новорожденных детей / Н.С. Черкасов, И.В. Вязовая, Л.А. Огуль // *Фундаментальные исследования*. – 2005. – № 9. – С. 93–94.
2. Шейбак Л.Н. Влияние фактора гипоксии на сердце новорожденного / Л.Н. Шейбак // *Медицинские новости*. – 2008. – № 2. – С. 18–22.
3. Distribution of the cardiac gap junction protein connexin43, in the neonatal and adult human heart / P.W. Oosthoek, M.J.A. van Kempen, A. Wessels [et al.] // *Muscle and motility: Proceedings of the XIXth European Conference in Brussels*. – 1994. – Vol. 2. – P. 85–90.
4. Peters N.S. Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium / N.S. Peters, N.J. Severs, S.M. Rothery [et al.] // *Circ.* – 1994. – Vol. 90. – P. 713–725.
5. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. – М.: Мир, 1975. – 324 с.
6. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.
7. Пат. 83611 Україна, МПК<sup>7</sup> G01N 1/28. Спосіб установлення координат ультраструктур при трансмісійній електронній мікроскопії біологічних об'єктів / І.В. Твердохліб, Н.С. Петрук, М.В. Іванченко, Ю.В. Сілкина, І.С. Хріпков, Н.О. Перцева, К.І. Шевченко, Т.О. Гудлетт, І.І. Малков, І.М. Береговенко, Д.Ю. Зіненко, Н.О. Галайда, В.В. Варін; заявник та патентовласник ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України». – № u201300042; заявл. 02.01.13; опубл. 25.09.13, Бюл. № 18 (2013).
8. Collins T.J. ImageJ for microscopy / T.J. Collins // *BioTechniques*. – 2007. – № 43. – P. 25–30.

Надійшла в редакцію 11.12.2013 р.