

Н. С. Петрук

## Вплив хронічної пренатальної гіпоксії на спеціалізований контактний апарат шлуночків серця щурів в онтогенезі

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

**Ключові слова:** міокард шлуночків, щури, міжклітинні контакти, внутрішньоутробна гіпоксія, онтогенез.

Внутрішньоутробна гіпоксія впливає на розвиток серцево-судинної системи плода та нерідко призводить до виникнення різноманітних кардіоваскулярних патологій. З метою визначення впливу хронічної пренатальної гіпоксії на будову та розподіл спеціалізованих міжклітинних контактів типових кардіоміоцитів у міокарді шлуночків на етапах пренатального онтогенезу щурів, а також морфометричного оцінювання стану вставного диска протягом постнатального періоду здійснили дослідження сердець білих беспородних щурів на різних термінах онтогенезу та статевозрілих особин. Використали методи електронної мікроскопії, морфометрії та статистичного аналізу. Встановили, що альтеративний вплив фактора внутрішньоутробної гіпоксії позначався затримкою формування механічних та електричних контактів між робочими кардіоміоцитами лівого та правого шлуночків серця щурів на етапах пренатального онтогенезу. Ускладнення геометрії вставного диска характеризувалось уповільненням темпів росту індексу звивистості.

### Воздействие хронической пренатальной гипоксии на специализированный контактный аппарат желудочков сердца крыс в онтогенезе

Н. С. Петрук

Внутриутробная гипоксия влияет на развитие сердечно-сосудистой системы плода и нередко приводит к возникновению различных кардиоваскулярных патологий. С целью установления влияния хронической пренатальной гипоксии на строение и распределение специализированных межклеточных контактов типичных кардиомиоцитов в миокарде желудочков на этапах пренатального онтогенеза крыс, а также морфометрической оценки состояния вставного диска на протяжении постнатального периода провели исследование сердец белых беспородных крыс в разные сроки онтогенеза и половозрелых особей. Использовали методы электронной микроскопии, морфометрии и статистического анализа. Установили, что альтеративное влияние фактора внутриутробной гипоксии связано с задержкой формирования механических и электрических контактов между рабочими кардиомиоцитами левого и правого желудочков сердца крыс на этапах пренатального онтогенеза. Усложнение геометрии вставочного диска характеризовалось замедлением темпов роста индекса извилистости.

**Ключевые слова:** миокард желудочков, крысы, межклеточные контакты, внутриутробная гипоксия, онтогенез.**Патология.** – 2014. – №2 (31). – С. 30–33

### Influence of chronic prenatal hypoxia on the specialized contact apparatus of rat heart ventricles during ontogeny

N. S. Petruk

**Aim.** Intrauterine hypoxia influences cardiogenesis that can lead to a variety of cardiovascular abnormalities and congenital heart defects. The aim of the work is to determine the effects of chronic prenatal hypoxia on the structure and distribution of specialized intercellular junctions of typical cardiomyocytes in the rat ventricular myocardium at the stages of prenatal ontogeny and to evaluate morphometric parameters of intercalated disks in the postnatal period.

**Materials and results.** Hearts were investigated by the transmission electron microscopy, morphometric and statistical methods. It was established that the alterative influence of intrauterine hypoxia factor is associated with the formation delay of the mechanical and electrical contacts between the contractive cardiomyocytes of the left and right ventricles of rat heart at the stages of prenatal ontogeny.

**Conclusion.** The increasing complexity of the geometry of the intercalated disc is characterized by slower growth of convolution index, which on the 14<sup>th</sup> day is lower by 27,5% ( $p < 0,05$ ) in the left ventricle as compared with the control.

**Key words:** Ventricular, Myocardium, Rats, Intercellular junction, Fetal hypoxia, Growth.**Pathologia.** 2014; №2 (31): 30–33

Протягом пренатального життя ембріональне серце ссавців зазнає глибоких і динамічних змін у розмірах, структурі та функціях. Стан «патологічної» внутрішньоутробної гіпоксії впливає на розвиток плода загалом і кардіогенез зокрема, що позначається на будові та функціях серцевого м'яза і може призводити до виникнення кардіоваскулярних патологій і вроджених вад серця [1]. Відомо, що внаслідок дії хронічної недостатності кисню на етапах пренатального онтогенезу ушкоджується і спеціалізований міжклітинний апарат кардіоміоцитів (Кмц), що відіграє свою роль не тільки у механічному зчленуванні Кмц, але й в електричній кооперації, метаболічному обміні, гомеостазі йонного балансу та транспорті морфогенетичних сигнальних молекул, котрі залучені до механізмів кардіогенезу [2].

Усе це зумовлює розвиток захворювань, що можуть бути пов'язані з локальним порушенням розподілу спеціалізованих міжклітинних з'єднань та маніфестують у вигляді порушень серцевого ритму та провідності.

Однак питання про стан контактного апарату типових Кмц за умов недостатності кисню протягом ембріонального розвитку та наслідки її впливу на вставний диск на постнатальних термінах онтогенезу залишається відкритим і потребує детального опрацювання.

#### Мета роботи

Визначення впливу хронічної пренатальної гіпоксії на будову та розподіл спеціалізованих міжклітинних контактів типових кардіоміоцитів у міокарді шлуночків на етапах пренатального онтогенезу щурів і морфоло-

тричне оцінювання стану вставного диска протягом постнатального періоду.

### Матеріали і методи дослідження

Об'єктами морфологічного дослідження були серця білих безпородних щурів і їхнього потомства на різних термінах онтогенезу: 12, 14, 16, 18, 20 діб (пренатальний період) і 1, 3, 7, 14, 30, 90 діб, а також статевозрілі особини (постнатальний період). Аналіз виконали у двох групах дослідження: контрольній (84 тварини) та експериментальній (94 тварини). Моделювання хронічної гіпоксії за змішаним типом здійснювали шляхом підшкірного введення у черевну складку 1% водного розчину  $\text{NaNO}_2$  у розрахунку 50 мкг/кг маси тіла від 10 до 21 доби вагітності [3]. Контрольним тваринам внутрішньоочеревинно вводили 1 мл 0,9% фізіологічного розчину  $\text{NaCl}$ .

Утримували тварин в умовах віварію та виконували експеримент згідно з «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та Законом України №3447-І від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження». Матеріал досліджували на базі «Лабораторії електронної та світлової 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. Аналіз зображення здійснювали з використанням спеціалізованого програмного забезпечення ImageJ v.1,47 [4].

Для кількісного оцінювання розподілу контактів в онтогенезі використовували групу морфометричних критеріїв: середня довжина десмосом, щільність довжини профілю *fasciae adhaerentes*, нексусів, вставного диска, індекс звивистості вставного диска. Спосіб розрахунку останнього наведений у попередній роботі [5]. Визначення вірогідності відмінностей між вибірками здійснювали з урахуванням парного *t*-критерію Стьюдента. У випадку відсутності нормального статистичного розподілу величин використовували непараметричний критерій Вілкоксона.

### Результати та їх обговорення

Формування та розвиток спеціалізованого контактного апарату Кмц шлуночків щурів під впливом хронічної внутрішньоутробної гіпоксії характеризувались затримкою росту низки морфометричних показників. Рівень кількісних ультраструктурних параметрів десмосом, *fasciae adherentes* і нексусів протягом ембріогенезу поступово збільшувався, але в порівнянні з постнатальними значеннями залишався доволі низьким.

Поява перших поодиноких щільних контактів між міобластами раннього сигмоподібного серця щурів збігається з початком його скоротливої діяльності й відбувається на 10 добу ембріонального розвитку [6].

На 12 добу внутрішньоутробного життя міогенні клітини серцевої стінки були пухко розташовані та відмежовувались прошарками кардіогелю, а щільні контакти траплялись зрідка та мали крапкоподібний вигляд.

Ультраструктура нексусів мала вигляд двох паралельних мембран, котрі розташовувались уздовж міо-

філаментів. При цьому всі вони незалежно від стадії онтогенетичного розвитку характеризувались наявністю типової пенталамінаричної будови, що зумовлена специфічністю розташування над-, між- і підмембранних доменів цього виду з'єднання. Отже, ультраструктурна будова щільних контактів була сталою протягом онтогенезу та не відрізнялась в обох групах (рис. 1). Морфометричні показники нексусів значно змінювались на етапах ембріогенезу та зазнавали впливу експериментальної гіпоксії.

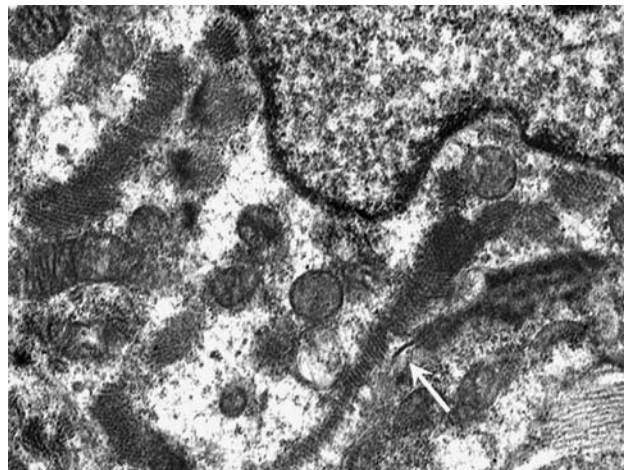


Рис. 1. Міокард ПШ щурів контрольної групи на 16 добу ембріогенезу. Профіль нексуса позначено стрілкою. Електронограма.  $\times 18000$ .

Ультраструктурний аналіз динаміки змін середньої довжини нексусів показав наявність вірогідних змін показника в обох групах вивчення. У термін від 14 до 18 доби ембріогенезу середня довжина нексусів Кмц ЛШ на тлі гіпоксії зростала незначно – лише на 23,6%, а за умов нормального розвитку – на 75,5% ( $p < 0,05$ ). На 20 добу життя спостерігали нормалізацію показника, вірогідної різниці між групами вивчення не встановили. Тенденція змін у ПШ була аналогічною.

Морфологічний аналіз змін чисельної щільності нексусів на  $1 \text{ мкм}^2$  Кмц також виявив статистично значущі зміни показника на аналізованих етапах пренатального онтогенезу. На початку вивчення рівень параметра вірогідно не відрізнявся при порівнянні контрольної та експериментальної груп. Від 16 доби значення показника у щурів, які зазнавали впливу патологічної гіпоксії, суттєво поступалось нормі: на 35,9% ( $p < 0,05$ ) у лівому шлуночку (ЛШ), на 37,4% ( $p < 0,05$ ) – у правому шлуночку (ПШ). Наприкінці внутрішньоутробного розвитку рівень параметра був нижчим за контроль на 33,7% ( $p < 0,05$ ) та 34,8% ( $p < 0,05$ ) у ЛШ і ПШ відповідно.

Дослідження динаміки змін щільності довжини профілю нексусів на  $1 \text{ мкм}^2$  Кмц дало змогу встановити наявність суттєвого відставання показника серед щурів, які зазнавали впливу патологічної гіпоксії, починаючи від 16 доби. Рівень параметра у цей термін був нижчим на 46,2% ( $p < 0,05$ ) у ЛШ, на 49,3% ( $p < 0,05$ ) у ПШ у порівнянні з контролем; на 20 добу – на 42,9% ( $p < 0,05$ ) та 44,1% ( $p < 0,05$ ) в ЛШ і ПШ відповідно.

Від ранніх стадій ембріогенезу десмосоми мали типову ультраструктурну будову у вигляді зближення потовщених та ущільнених сусідніх мембран, простір між

якими був заповнений філаментозним вмістом. З боку цитоплазми до мембран контакту прилягали електроннощільні пластинки (рис. 2).

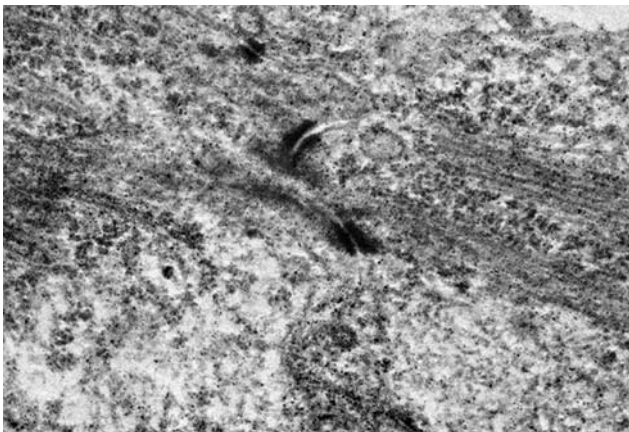


Рис. 2. Десмосомні контакти між Кмц ЛШ серця щура на 16 добу пренатального онтогенезу, контрольна група. Електроннограма.  $\times 30000$ .

Протягом аналізу динаміки змін середньої довжини десмосом у міокарді шлуночків щурів контрольної групи визначили поступове збільшення величини показника на 107,4% у ЛШ та 116,7% у ПШ у період від 12 до 20 доби пренатального розвитку. Переважання показника у ЛШ було несуттєвим на кожному з досліджуваних етапів пренатального розвитку. У щурів, котрі зазнавали впливу внутрішньоутробної гіпоксії, ступінь приросту середньої довжини десмосом становив 48,1% у лівому та 56,5% у правому відділах серця. На 20 добу ембріогенезу відставання показника у тварин експериментальної групи набувало вірогідних значень і відрізнялось від контролю на 31,3% та 30,8% у ЛШ і ПШ відповідно.

Зауважимо, що перед народженням спостерігали вірогідне зростання чисельної щільності десмосом у щурів експериментальної групи, що призводило до нормалізації щільності довжини профілю та питомої площі десмосом.

Наступний вид спеціалізованого сполучення Кмц, що забезпечує механічний міжклітинний зв'язок, – fascia adhaerens. Протягом онтогенетичного розвитку fascia adhaerentes суттєво змінювали свою морфологію. До 16 доби пренатального періоду вони розташовувались поперечно або косо поперечно щодо незрілих міофібрил і мали переважно лінійний вигляд (рис. 3). Від 16 доби ембріогенезу спостерігали поступове ускладнення структури контакту, що характеризувалось збільшенням ступеня звивистості fascia adhaerens та ущільненням підмембранного матрикса. На пізній фетальній стадії розвитку відбувався процес подальшого диференціювання fascia adhaerens, а морфологія контакту набувала дефінітивних ознак.

Електронномікроскопічне дослідження змін щільності довжини профілю fascia adhaerens показало уповільнення росту показника в міокарді шлуночків щурів експериментальної групи. На 20 добу пренатального життя параметр вірогідно поступався показникам контролю – на 32,9% у ЛШ та 37,3% у ПШ.

Вплив пренатальної гіпоксії на механічні контакти скоротливих Кмц також характеризувався збідненням фі-

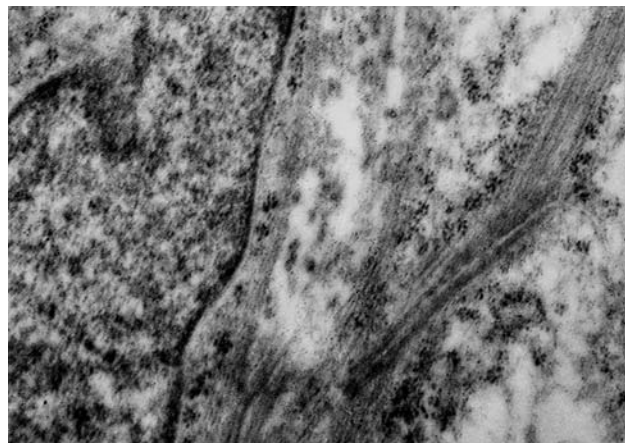


Рис. 3. Місце контакту двох сусідніх Кмц у міокарді ПШ щурів експериментальної групи на 14 добу пренатального розвитку. Міофібрили влітають у незрілу прямолинійну за формою fascia adhaerens. Електроннограма.  $\times 30000$ .

ламентозного вмісту міжмембранного простору десмосом і булавоподібними деформаціями fascia adhaerentes.

Після народження тварин на тлі росту кардіоміоцитів, що проявлялось їх значною гіпертрофією шляхом збільшення міофібрилярного апарату, глікогену, мітохондрій, Т-трубочок, також спостерігали підвищення ступеня спеціалізованої міжклітинної взаємодії. Десмосоми, fascia adherentes і нексуси, які одразу після народження були дисперсно розподілені по поверхні Кмц, поступово переміщались до термінальних ділянок клітин, об'єднуючись у високоспецифічні комплексні структури – вставні диски (ВД) [5].

Під час постнатального онтогенезу спостерігали ускладнення геометрії ВД, що супроводжувалось збільшенням величини індексу його звивистості. На 14 добу життя значення показника у міокарді ЛШ щурів, котрі зазнавали впливу фактора пренатальної гіпоксії, поступало контролю на 25,7% ( $p < 0,05$ ). Ступінь звивистості ВД у нормі переважав у ЛШ у порівнянні з ПШ від 14 доби після народження та від 30 доби в експерименті, що було пов'язано з різним кількісно-пропорційним складом ВД, а саме статистично вагомих переважанням питомої довжини fascia adhaerens у ЛШ порівнюючи з ПШ від 7 доби за умов нормального розвитку та від 14 доби при дії внутрішньоутробної гіпоксії. Наростання величини індексу звивистості ВД експериментальної групи у порівнянні з відповідним значенням у період новонародженості становило 85,4% ( $p < 0,05$ ) у ЛШ та 52,3% ( $p < 0,05$ ) у ПШ. У зрілому міокарді шлуночків значення параметра статистично вагомо не відрізнялось від контролю та на 31,9% ( $p < 0,05$ ) переважало у ЛШ у порівнянні з ПШ.

Ультраструктурний аналіз динаміки змін щільності довжини профілю ВД у міокарді шлуночків щурів виявив статистично вагоме відставання величини показника в експериментальній групі тварин. Так, на 7 добу життя рівень параметра відрізнявся від контролю на -36,1% ( $p < 0,05$ ) у ЛШ та на -39,4% ( $p < 0,05$ ), а на 14 добу – на -38,4% та -36,5% у лівому та правому відділах серця відповідно. На наступних етапах дослідження ця різниця втрачала статистичну значущість.

Під впливом гіпоксії відбувалось порушення процесів дозрівання ВД. Про це свідчило тривале зберігання в його межах порції неспеціалізованої сарколеми: до 30 доби у

ЛШ і протягом постнатального онтогенезу у ПШ. У міокарді щурів групи контролю після другого тижня розвитку ВД складався переважно зі спеціалізованих з'єднань.

Про порушення геометрії ВД внаслідок дії пренатальної гіпоксії також свідчать дані І.В. Задніпряного та О.С. Третякової [2]. На думку авторів, дефіцит кисню під час внутрішньоутробного розвитку може призводити до змін біоелектричних і метаболічних відносин між Кмц і виникнення осередків аритмій.

### Висновки

1. Дія хронічної внутрішньоутробної гіпоксії зумовлює порушення адекватних структурних і хронологічних перебудов спеціалізованого контактного апарату типових шлуночкових Кмц ембріонів щурів, причому некусуси виявляють найбільшу уразливість і чутливість до кисневого дефіциту. Протягом пренатального кардіогенезу альтеративний вплив гіпоксії викликає пригнічення темпів насичення мембран Кмц щільними контактами шляхом обмеження їхньої кількості та розмірів: у термін від 14 до 18 доби ембріогенезу середня довжина некусусів Кмц ЛШ на тлі гіпоксії зростає незначно – лише на 23,6%, а за умов нормального розвитку – на 75,5% ( $p < 0,05$ ). Аналогічні за напрямом та інтенсивністю зміни відбуваються у правошлуночкових Кмц. На 20 добу пренатального кардіогенезу чисельна щільність цих контактів вірогідно поступається нормі на 33,7% у ЛШ і на 34,8% у ПШ, щільність довжини їх профілю – на 42,9% та 44,1% у ЛШ та ПШ відповідно, однак в обох шлуночках середня довжина некусусів відновлюється до нормального рівня, що свідчить про включення компенсаторно-приспосувальних механізмів перед народженням.

2. Ушкоджувальний вплив пренатальної гіпоксії на механічні контакти скоротливих Кмц реалізується в істотних змінах їх ультраструктури – збідненні філаментозного вмісту міжмембранного простору десмосом, булавоподібній деформації fascia adhaerens, уповільненні темпів новоутворення контактних структур. На 20 добу

ембріогенезу середня довжина десмосом вірогідно поступається нормальним значенням на 31,3% та 30,8% у ЛШ та ПШ відповідно, щільність довжини профілю fascia adhaerens – на 32,9% у ЛШ та на 37,3% у ПШ. Перед народженням відбувається вірогідне збільшення чисельної щільності десмосом, що призводить до нормалізації щільності довжини профілю та питомої площі десмосом і свідчить про їхню переважну компенсаторну роль у порівнянні з fascia adhaerens.

3. Дія пренатальної гіпоксії зумовлює погіршення інтегративних властивостей ВД і проявляється вірогідним зменшенням щільності довжини його профілю від 7 до 14 доби постнатального онтогенезу в порівнянні з контролем. Про порушення процесів дозрівання ВД у міокарді щурів експериментальної групи свідчить тривале зберігання в його межах порції неспеціалізованої сарколеми: до 30 доби у ЛШ і протягом постнатального онтогенезу у ПШ, на відміну від міокарда щурів контролю, де після другого тижня розвитку ВД складається винятково зі спеціалізованих з'єднань. Величина приросту індексу звивистості ВД як показника складності геометрії структури у щурів експериментальної групи протягом постнатального періоду становить 85,4% ( $p < 0,05$ ) у ЛШ і 52,3% ( $p < 0,05$ ) у ПШ. У зрілому віці рівень параметра суттєво не відрізняється від норми в обох шлуночках. При цьому ступінь звивистості ВД переважає у ЛШ у порівнянні з ПШ від 14 доби після народження в нормі та від 30 доби в експерименті, що пов'язано з різним кількісно-пропорційним складом ВД, який характеризується статистично вагомим переважанням питомої довжини fascia adhaerens у ЛШ порівнюючи з ПШ від 7 доби за умов нормального розвитку та від 14 доби за умов дії внутрішньоутробної гіпоксії.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні міжклітинної взаємодії скоротливих Кмц і клітин строми у нормі та внаслідок дії внутрішньоутробної гіпоксії.

### Список літератури

1. Patterson A.J. Hypoxia and fetal heart development / A.J. Patterson, L. Zhang // *Curr. Mol. Med.* – 2010. – Vol. 10. – № 7. – P. 653–666.
2. Задніпряний І.В. Структурная перестройка миокарда при перинатальной гипоксии в условиях эксперимента / И.В. Задніпряний, О.С. Третякова // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* – 2011. – Т. 1. – № 1. – С. 40–45.
3. Иваницкая Н.Ф. Методика получения разных стадий гемической гипоксии у крыс введением нитрита натрия / Н.Ф. Иваницкая // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 1976. – № 3. – С. 69–71.
4. Collins T.J. ImageJ for microscopy / T.J. Collins // *BioTechniques.* – 2007. – № 43. – P. 25–30.
5. Петрук Н.С. Ультраструктурна характеристика механізму формування та розвитку вставного диска в робочому міокарді шлуночків щурів на етапах постнатального онтогенезу / Н.С. Петрук // *Морфологія.* – 2013. – Т. VII. – № 3. – С. 94–100.
6. Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart / R.G. Gourdie, C.R. Green, N.J. Severs, R.P. Thompson // *Anatomy and Embryology.* – 1992. – Vol. 185. – № 4. – P. 363–378.

### References

1. Patterson, A. J., & Zhang, L. (2010). Hypoxia and fetal heart development. *Curr. Mol. Med.*, 10(7), 653–666.

2. Zадніпряний, І. В., & Третякова, О. С. (2011). Структурная перестройка миокарда при перинатальной гипоксии в условиях эксперимента [Structural reorganization of the myocardium at perinatal hypoxia in experimental conditions]. *Krymskij zhurnal e'ksperimental'noj i klinicheskoy mediciny*, 1(1), 40–45. [in Ukrainian].
3. Ivanickaya, N. F. (1976). Metodika polucheniya raznykh stadij gemicheskoy gipoksii u krysv vvedeniem nitrita natriya [Method of producing different stages of hemic hypoxia in rats by sodium nitrite administration]. *Patologicheskaya fiziologiya i e'ksperimental'naya terapiya*, 3, 69–71. [in Russian].
4. Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques.*, 43, 25–30.
5. Petruk, N. S. (2013). Ul'trastrukturalna kharakterystyka mekhanizmu formuvannya ta rozvytku vstavnogo dyska v robochomu miokardi shlunochkiv shchuriv na etapakh postnatalnogo ontogenezu [Ultrastructural characteristics of the formation and development of the intercalated disc in the rat left and right working ventricular myocardium on the postnatal ontogenetic stages]. *Morpholohiia*, 7(3), 94–100. [in Ukrainian].
6. Gourdie, R. G., Green, C. R., Severs, N. J., & Thompson, R. P. (1992). Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart. *Anatomy and Embryology*, 185(4), 363–378. doi: 10.1007/BF00188548.

### Відомості про автора:

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

Надійшла в редакцію 18.08. 2014 р.