

## ВПЛИВ ЕТАНОЛУ НА КІЛЬКІСНІ ПАРАМЕТРИ ШЛУНОЧКОВИХ КАРДІОМІОЦИТІВ ЩУРІВ НА РАННІХ ЕТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ У НОРМІ ТА ПІСЛЯ ДІЇ АЛКОГОЛЮ

Марченко Д.Г., Філімонова Л.А., Станішевська Н.В.

Дніпропетровська медична академія МОЗ України

Стаття присвячена аналізу кількісних характеристик скоротливого апарата міокарда на ранніх етапах постнатального онтогенезу. Механізми міофібрилогенезу в різних відділах серця і зонах серцевої стінки здійснюються принципово подібним чином, проте відомості про ступінь їх виразності, співвідношення і швидкість перебігу в різних ділянках міокарда мають суперечливий характер. Завдяки аналізу стереометричних характеристик існує можливість отримати найбільш повний обсяг даних щодо формування окремих структур скоротливого апарата. У статті розкривається питань щодо формування компонентів міофібрилярного апарата як у нормі, так і за умов впливу ендо- та екзогенних факторів у різних зонах шлуночкового міокарда.

**Ключові слова:** алкоголь, міокард, міофібрили, міофібрилогенез, скоротливий апарат, щільність упаковки міофібрил.

**Постановка проблеми.** На теперішній час за допомогою багатьох експериментальних робіт щодо механізму міофібрилогенезу у кардіоміоцитах (КМЦ) увагу дослідників привернуло питання, щодо основних змін, які відбуваються у структурі різних елементів скоротливого апарата під впливом тератогенних факторів. Використання потужного комплексу методів аналізу у розкритті даного питання обумовили значні дослідження у аналізі цієї теми.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Багатьма авторами були розкриті питання щодо етапності перебігу міофібрилогенезу у різних тварин (кур, щурів). Давно відомо, що міофібрили посмугованого м'яза утворені групою білків, розташованих у спеціальних одиницях, або саркомерах, які у свою чергу склалися з окремих субодиниць [9]. Хоча саркомер поперечно-посмугованого м'яза змінювався за будовою та складом білків по всій довжині міофібрили, існують три головні компоненти: тонкі нитки, товсті нитки і Z-диски, кожний з яких формується за допомогою численних взаємодій з білками, які беруть участь у скороченні [7; 10; 12]. Тому збірка міофібрилярних білків у їх функціональну одиницю, саркомер, повинна бути швидким і добре скоординованим процесом. Для того, щоб пояснити це явище, проводили численні дослідження на найпростіших культурах кардіоміоцитів, і було запропоновано декілька механізмів.

Однак, становлення міофібрилярного апарата включало до себе не лише механізм включення саркомерних білків у міофібрилу, що формується, але й розподіл саркомеру на А- та І-диски [12].

Багатьма авторами вивчався вплив різних тератогенних речовин на міофібрилогенез [6; 7].

Segel L.D. у своїх дослідженнях встановив, що етанол впливає майже на всі кардіоміоцити серця, викликаючи значні деструктивні зміни. За даними його досліджень у багатьох районах серця дефектні міофібрили склалися з невеликих блоків одного або двох саркомерів. У тих ділянках серця, де розчинення скоротливих структур було більш вираженим, міофібрили спостерігалися у вигляді залишків, у яких не виявлені А- та І-диски. У таких міофібрил спостерігаються лише окремі

Z-диски. Поступовий лізис призводив до того, що простір, де немає міофібрил заповнюється гранулами і численними мітохондріями. При деструктивних змінах кардіоміоцитів, за даними Гавриша, спостерігається різниця у товщині міофібрил у різних зонах міокарда. Міофібрили, товщина котрих перевищує норму в 2-3 рази, часто межують з міофібрилами, товщина яких значно менше від звичайного розміру [11].

A. Wilke описував, що Z-диски при дії етанолу є «слабкою ланкою» міофібрил. При цьому за його даними при хронічній дії етанолу можливий, як повний розрив міофібрил в області Z-дисків, так і розтягування Z-дисків зі збереженням цілісності міофібрил. У своїх дослідженнях він показав, що також відбувається пошкодження M-дисків, до яких прикріплюються товсті філаменти. Іноді слабка M-лінія не виявляється, хоча така картина за даними автора спостерігається лише у незначній кількості міофібрил. Більшою мірою піддавалися лізису І-диски. Пошкодження саркомерів і міофібрил призводило також до пошкодження саркоплазматичного ретикулума, порушень гомеостазу  $Ca^{2+}$ , що призводило до активації протеаз, що відіграють важливу роль у запуску розщеплювання білків, запальних процесів і процесі регенерації [6].

Завдяки цим дослідженням розкриваються багато питань щодо формування міофібрил, як у нормі, так і після дії етанолу. Однак дані про характер і локалізацію основних деструктивних змін, які відбуваються у ультраструктурі КМЦ під впливом етанолу залишаються основними питаннями і потребують уточнення.

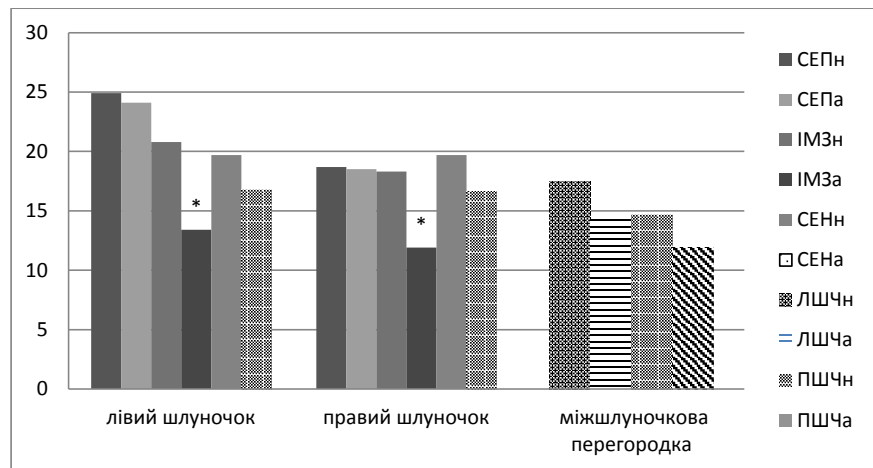
**Метою дослідження** є визначення щільності упаковки міофібрил у різних зонах шлуночкового міокарда щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку.

**Виклад основного матеріалу дослідження. Матеріали та методи.** Дослідження виконали на білих безпородних щурах-самках і їхньому потомстві. У якості матеріалу використали серця новонароджених щурів та серця щурів на 7-у добу постнатального онтогенезу. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист

хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013). Моделювання алкогольної інтоксикації здійснювали впродовж шести тижнів шляхом повної заміни питної води на розчин етанолу різної концентрації. Після забору матеріал фіксували при температурі +20С 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%-ому 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. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікросомі УМТП-6М («SELM1», Україна) та розміщали на опорних сітках (Mesh Regular Grid 200) [4; 5].

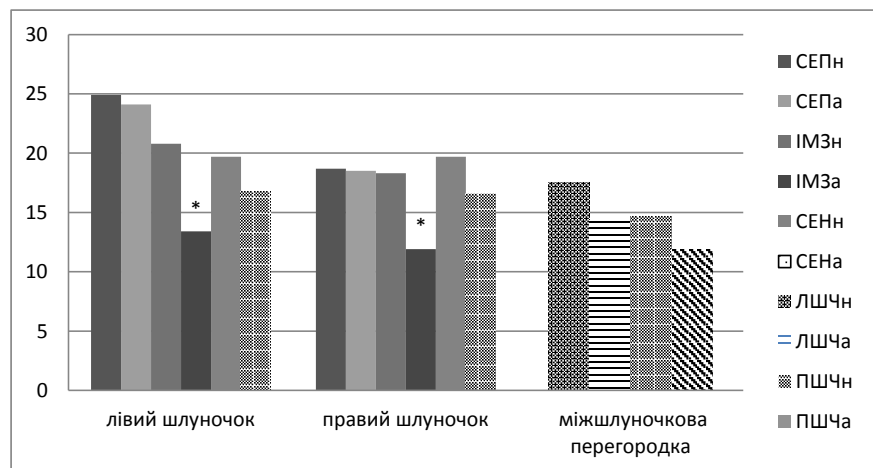
В якості кількісної характеристики міофібрилярного апарата кардіоміоцитів були визначені такі стереометричні параметри, як щільність упакування міофібрил. Розрахунки проводилися за методом Автандилова Г.Г. [1]. Було обрані наступні зони, які вивчалися за допомогою електронного мікроскопа, СЕП – субепікардіальна зона; ІМЗ – інтрамуральна зона; СЕН – субендокардіальна зона; ЛШЧ і ПШЧ – лівошлуночкова і правошлуночкова частини міжшлуночкової перегородки. При цьому вивчалися показники контрольної групи (норма) – щури, які вживали звичайну воду та експериментальної (алкоголь) – щури, які замість води отримували етанол 5%, 10%, 15% і 20%. Щури експериментальної групи отримували їжу, яка містила мінімальну кількість води.

При дослідженні шлуночкового міокарда щурів було показано, що зі збільшенням терміна переребігу міофібрилогенезу зростала ступінь відмінності не лише між шлуночковим та передсердним відділами, але й між усіма частинами серця. Так, у новонароджених щурів при нормальному розвитку значення щільності упакування міофібрил у СЕП були статистично вагомо підвищені у ЛШЧ на 48,0% та у ПШЧ – на 11,0%, в ІМЗ у ПШЧ на 20,9%, у ЛШЧ – на 30,0% порівняно з показниками шлуночкового міокарда щура на 20-у добу пренатального онтогенезу (рис.1). При цьому, по-



**Рис. 1.** Щільність упакування міофібрил (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів різних зон шлуночкового міокарда новонароджених щурів у нормі та після дії алкоголю

Позначки (\*) вказують на достовірні відмінності від норми. СЕП (СЕПн – норма, СЕПа – 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. 2.** Щільність упакування міофібрил (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів різних зон шлуночкового міокарда щурів на 7-у добу пренатального онтогенезу в нормі та після дії алкоголю

Позначки (\*) вказують на достовірні відмінності від норми. СЕП (СЕПн – норма, СЕПа – 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

казники в ІМЗ у ЛШЧ, у СЕН та у ЛШЧ МЖП достовірно не відрізнялися за відповідні показники на 20-у добу пренатального онтогенезу; різниця показників правого та лівого шлуночків особливо виражена у новонароджених щурів. Величина щільності упакування міофібрил у субепікардіальній зоні ЛШЧ на 33,0% ( $p < 0,05$ ) була вище за ці значення у ПШЧ; в інтрамуральній зоні – на 26,0% ( $p < 0,05$ ); у субендокардіальній зоні значення показника статистично не змінювалися.

Ранній постнатальний кардіогенез експериментальних тварин, на відміну від контрольної групи, супроводжувався зміною упорядкованості міофібрил, порушенням їх цілісності та орієнтації. Ці зміни значно впливали на кількісні характеристики, а сама – щільність упакування

ня. У новонароджених щурів ці зміни найбільш стосувалися ІМЗ, що було пов'язано з найбільш активним міофібрилогенезом у цій зоні у даний проміжок часу. Так величина параметра в ІМЗ зменшувалася на 35,5% ( $p > 0,05$ ) у ЛШ та на 36,0% ( $p < 0,05$ ) у ПШ у порівнянні з нормальним розвитком. При цьому щільність упакування у у СЕН, СЕП та у МШП к після дії етанолу достовірно не відрізнялися у порівнянні з нормою.

Значення досліджуваного показника контрольних тварин на 7-у добу постнатального розвитку, як і в попередню, збільшувався у ІМЗ (рис. 2).

Так і показники даного параметра після дії етанолу не мали суттєвої різниці відносно попередньо досліджуваного терміну розвитку. Однак, рівень щільності упакування підвищився в ІМЗ у ЛШ на 28,3% та у ЛШЧ – на 21,6% відносно попередньої доби розвитку. Етанол на пізніх етапах розвитку міофібрилярного апарату порушував

локалізацію, орієнтацію та щільність міофібрил, що призводило більш нижчих показників даного параметру відповідно до норми.

**Висновки.** Аналіз електронних мікрофотографій шлуночкового міокарда дозволив показати, що дія етанолу впливає майже на всі зони міокарда серця, призводячи до затримки формування міофібрилярного апарату з порушенням цілісності та орієнтації його структур. За даними наших досліджень було встановлено, що на ранніх етапах постнатального розвитку етанол спричиняв деструктивні зміни саме у інтрамуральній зоні. Ця зона на початковому терміні постнатального онтогенезу зазнавала найбільших порушень, так як саме в цей час в ній відбувався активний міофібрилогенез.

**Перспективи подальших розробок** пов'язані з вивченням кількісних характеристик скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів після дії етанолу на пізніх етапах постнатального онтогенезу.

### Список літератури:

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Автандилов – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Власов А.И. Электронная микроскопия : учеб. пособие / А.И. Власов, К.А. Елсуков, И.А. Косолапов. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2011. – 168 с.
3. Вуколов Э.А. Основы статистического анализа. Практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTIKA и EXCEL : учебное пособие / Э.А. Вуколов. – 2-е изд., испр. и доп. – Москва: Форум, 2014. – 463 с.
4. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / [Б. Уикли]; под. ред. В.Ю. Полякова; пер. с англ. И.В. Викторова. – 1996. – М.: Мир, 1975. – 336 с.
5. Устройство и принцип работы просвечивающего электронного микроскопа: Электронное учебно-методическое пособие / Бобров А.И. [и др.]; под. ред. Д.А. Павлова. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 31 с.
6. Alcohol and myocarditis / A. Wilke [et al.] // Herz. – 1996. – Vol. 21, № 4. – P. 248–257.
7. Alcohol and the heart / L.D. Segel [et al.] // Med Clin North Am. – 1984. – Vol. 68, № 1. – P. 147–161.
8. Dynamics of Z-band based proteins in developing skeletal muscle cells / J.Wang [et al.] // Cell Motility and the Cytoskeleton. – 2005. – Vol. 61. – P. 34–48.
9. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyocytes / S. Morimoto // Cardiovascular Research. – 2008. – Vol. 77. – P. 659–666.
10. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes / G.A. Dabiri [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1997. – Vol. 16. – P. 9493–9498.
11. Segel L.D. The development of alcohol-induced cardiac dysfunction in the rat // Alcohol Alcohol. – 2007. – Vol. 100, № 3. – P. 225–230.
12. Sanger J.W. How to build a myofibril / J.W. Sanger, S. Kang, C.C. Siebrands // Journal of Muscle Research and Cell Motility. – 2005. – Vol. 26. – P. 343–354.

Марченко Д.Г., Филимонова Л.А., Станишевская Н.В.

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины»

## ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА ПЛОТНОСТЬ УПАКОВКИ КАРДИОМИОЦИТОВ ЖЕЛУДОЧКОВ КРЫС НА РАННИХ ЭТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ В НОРМЕ И ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ

### Аннотация

Статья посвящена анализу количественных характеристик сократительного аппарата миокарда на ранних этапах постнатального онтогенеза. Механизмы миофибриллогенеза, в различных отделах сердца и зонах сердечной стенки, осуществляются принципиально подобным образом, однако сведения о степени их выраженности, соотношении и скорости течения в различных участках миокарда имеют противоречивый характер. Благодаря анализу пространственных характеристик существует возможность получить наиболее полный объем данных о формировании отдельных структур сократительного аппарата. В статье раскрывается вопрос о формировании компонентов миофибрилярного аппарата как в норме, так и при воздействии эндо- и экзогенных факторов в различных зонах желудочкового миокарда.

**Ключевые слова:** алкоголь, миокард, миофибриллы, миофибриллогенез, сократительный аппарат, плотность упаковки миофибрилл.

**Marchenko D.G., Filimonova L.A., Stanishevskay N.V.**

Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine

## **INFLUENCE OF ETHANOL ON QUANTITATIVE PARAMETERS OF HUMAN CARDIOMYOCYTES OF RATS AT THE EARLY STAGES OF POSTAL DEVELOPMENT IN NORMAL AND AFTER THE ACTION OF ALCOHOL**

### **Summary**

The article is devoted to the analysis of quantitative characteristics of the contractive apparatus of the myocardium in the early stages of postnatal ontogenesis. Mechanisms of myofibrillogenesis in different parts of the heart and zones of the cardiac wall are carried out in a fundamentally similar manner, but information about the degree of their expressiveness, the ratio and rate of flow in different parts of the myocardium are controversial. Due to the analysis of stereometric characteristics, it is possible to obtain the most complete data on the formation of individual structures of the contractive apparatus. The article reveals the issues concerning the formation of components of the myofibrillar apparatus both in normal and under the influence of endo- and exogenous factors in different zones of the ventricular myocardium.

**Keywords:** alcohol, myocardium, myofibrils, myofibrillogenesis, contractive device, packing density of myofibres.