

Н.С.Петрук

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: міокард шлуночків, щури, постнатальний онтогенез, ультраструктура вставного диска, індекс звивистості, кільцевий нексус.

Надійшла: 23.08.2013

Прийнята: 29.09.2013

УДК 611.127:611.013:611.018

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНІЗМУ ФОРМУВАННЯ ТА РОЗВИТКУ ВСТАВНОГО ДИСКА В РОБОЧОМУ МІОКАРДІ ШЛУНОЧКІВ ЩУРІВ НА ЕТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ

Дослідження проведено у рамках науково-дослідної роботи «Структурні перебудови компонентів серцево-судинної системи в умовах її нормального й аномального гістогенезу у людини й експериментальних тварин» (номер державної реєстрації 0111U006621).

Реферат. Мета – комплексна ультраструктурна оцінка механізму формування та розвитку вставного диска в робочому міокарді шлуночків щурів на етапах постнатального онтогенезу. У ході дослідження було використано набір методів трансмісійної електронної мікроскопії, морфометрії та статистичної обробки даних. Для кількісної оцінки динаміки конфігураційних змін вставного диска визначали індекс його звивистості. Встановлено, що перерозподіл адгерентних контактів з бічної поверхні кардіоміоцита найбільш активно відбувається від 3-ї до 14-ї доби після народження, а процес торцювання щільних контактів протікає за рахунок їх інтерналізації з наступним утворенням у саркоплазмі кільцевих профілей, які вбудовуються у вставний диск останніми. Процес ускладнення геометрії вставного диска супроводжувався послідовним зростанням величини індексу його звивистості, який у складі зрілого міокарда складав $2,46 \pm 0,17$ та $1,94 \pm 0,14$ у лівому та правому відділах відповідно. Переважання параметра у лівому шлуночку над правим набувало найбільшої різниці на 14-у добу постнатального розвитку (38,1%; $p < 0,05$), а у зрілому інтактному міокарді показники різнилися на 26,8% ($p < 0,05$).

Morphologia. – 2013. – Т. VII, № 3. – С. 94-100.

© Н.С.Петрук, 2013

✉ petruk.dp@gmail.com

Petruk N.S. 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.

ABSTRACT. Background. Maintenance of the normal distribution of intercellular contacts between cardiomyocytes and preservation of the correct geometry of the intercalated disc are essential conditions for the proper functioning of the heart. **Objective.** To provide complex ultrastructural evaluation of the mechanism of formation and development of the intercalated disc in rat ventricular myocardium on postnatal stages of development. **Methods.** Rats at the age of 1, 3, 7, 14, 30 days after birth and mature individuals were used as an object. Transmission electron microscopy, morphometric and statistical methods were applied. In particular, the convolution index was evaluated to characterize quantitative changes of the dynamics of configuration of intercalated disc. **Results.** It was found that the redistribution of adherens junctions from the lateral surface of cardiomyocytes occurs most rapidly from 3rd to 14th days after birth. The gap junctions trimming occurs due to their internalization with subsequent formation of the annular gap junction profile in the sarcoplasm; these profiles are inserted into the intercalated disc at the last turn. The process of complication of the geometry of intercalated disc is accompanied by the consistent increase of convolution index in the mature myocardium of the left and right ventricles up to $2,46 \pm 0,17$ and $1,94 \pm 0,14$, respectively. The predominance of the convolution index in the left ventricle over the levels in the right ventricle was the most prominent on the 14th day of postnatal development (38,1%; $p < 0,05$) and in the mature myocardium – 26,8% ($p < 0,05$). **Conclusion.** As the result of physiological hypertrophy and adaptive remodeling of cardiomyocyte in the postnatal rat cardiogenesis redistribution of diffusely located intercellular junctions from the periphery to the terminal areas of the cell occurs. The formation of a definitive pattern of distribution of intercellular junctions is completed at the puberty.

Key words: ventricular myocardium, rats, postnatal ontogenesis, ultrastructure of the intercalated disc, convolution index, annular gap junction.

Citation:

Petruk NS. [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]. Morphologia. 2013; 7(3):94-100. Ukrainian.

Вступ

Підтримання нормального розподілу міжклітинних контактів кардіоміоцитів та збереження адекватної геометрії вставного диска є невід'ємною умовою для нормального функціонування серця. Проте відомості щодо «життєвого циклу» щільних та механічних контактів протягом кардіогенезу залишаються неповними, потребують систематизації та подальшого поглибленого вивчення [1].

Дефінітивна модель вставного диска шлуночків характеризується складною просторовою будовою. Власне, вставний диск (intercalated disk) – це структурно-функціональна одиниця мембрани з'єднання (ділянки спеціалізованої плазматичної мембрани без глікокаліксу на поверхні), що складається з поперечно орієнтованих інтердигітаційних відростків прилеглих клітин. Поперечний, або складчастий сегмент (plicate segment) вставного диска містить пальцеподібні інтердигітації клітинної адгезії та малі нексуси. Ця ділянка іменується також «кроком» або «сходиною». Поздовжній, або міжкладчастий сегмент (interplicate segment) розташований поблизу або між поперечними сегментами диска. Він лежить у площині, що паралельна поздовжній вісі кардіоміоцита та перпендикулярна площині поперечного сегмента. Поздовжній сегмент значно менш звивистий, ніж поперечний, та часом містить великі нексуси (≥ 3 мкм) [2].

Розвиток вставного диска можна вважати яскравим прикладом ремоделювання міокарда у постнатальному житті, що характеризується прогресивним зниженням кількості міжклітинних контактів на латеральній поверхні клітин [3; 4]. Це вважають основою створення єдиної анізотропічної провідності потенціалу дії, що є електрофізіологічною характеристикою зрілого міокарда та забезпечує необхідні умови для швидкої й ефективної його деполяризації [5]. У процесі формування вставного диска також виділяють таку структуру як кільцевий нексус (annular gap junction), яка є тимчасовим утворенням та виконує функцію транспорту мембрани щільного контакту з латеральною поверхні кардіоміоцита до зони вставного диска [6]. З морфологічної точки зору annular gap junction являє собою закритий кільцевий профіль, який цілком або частково складається з мембрани нексуса, що не виконує своїх комунікативних функцій та зустрічається всередині клітини найчастіше поблизу зони вставного диска.

Першим поняття, тоді ще «циркулярний нексус», ввів M.J.Legato у 1979 р. [7]. Проте на той час не було достеменно відомо, яке походження має ця структура. Так, деякий час вважалося, що кільцевий профіль є наслідком проходження площини зрізу крізь вигин поверхні нексуса. Однак розглядали й альтернативну версію, згідно якій кільцевий нексус є повністю внутрішньоклі-

тинним утворенням, що відіграє свою роль в онтогенетичних процесах ремоделювання кардіоміоцита.

Метою роботи була комплексна ультраструктурна оцінка механізму формування та розвитку вставного диска в робочому міокарді шлуночків щурів на етапах постнатального онтогенезу.

Матеріали та методи

Під час морфологічного дослідження об'єктом вивчення були білі безпородні щури масою 220 ± 25 г на різних термінах постнатального онтогенезу (1, 3, 7, 14, 30 діб після народження та статевозрілі особини). Утримання тварин в умовах віварію ДЗ «ДМА МОЗ України» здійснювалось згідно «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та Закону України № 1759-VI від 15.12.2009 року «Про захист тварин від жорстокого поводження». Отримання датованої вагітності, забір матеріалу та оцінку стадії розвитку здійснювали згідно зі стандартними методиками.

Під час ультраструктурного дослідження міокарда щура шматочки тканини фіксували за допомогою 2,5%-вого розчину глутаральдегіда, що виготовляли на 0,1 М фосфотному буфері (pH 7,3). Постфіксацію матеріалу здійснювали в 1%-вому забуференому розчині тетраокису осмія протягом 1 години. Зневоднення тканини проводили за допомогою спиртів наростаючої концентрації та пропіленоксиду, після чого матеріал заключали в Епон-812 («SPI-Pon™ 812 Epoxy Embedding Kit», США). Виготовленню ультратонких зрізів передувало аналіз напівтонких зрізів, які забарвлювали 1%-вим розчином метиленового синього та вивчали за допомогою метода світлової мікроскопії. Для отримання зрізів завтовшки 60-80 нм використовували ультрамікротом УМТП-6М («SELMi», Україна). Тонкі зрізи попередньо контрастували 2%-вим водним розчином ураніацетата протягом 15 хвилин при температурі $+37^\circ\text{C}$ з подальшою 30-хвилинною імпрегнацією розчином цитрата свинцю за методом Рейнольдса. Дослідження проводили в лабораторії електронної мікроскопії 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.

Отримання електронограм здійснювали шляхом відзйомки ультратонких зрізів за оригінальним способом (пат. 83611) із подальшою відцифрованою за допомогою сканера з високою роздільною здатністю (Canon 9000F). Зображення зберігали у TIFF-форматі. 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 та поширюється без ліце-

нзійних обмежень як суспільне надбання) [8].

Для характеристики динаміки конфігураційних змін вставного диска визначали індекс його звивистості, який розраховували як співвідношення дійсної довжини складчастого сегмента вздовж усіх вигинів до уявної прямої лінії паралельної Z-лінії, що сполучає початок та кінець цього сегмента. Визначення вірогідності розходжень між вибірками проводили з урахуванням парного t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

За нашими попередніми даними, на етапах пренатального онтогенезу щурів термінальні ділянки кардіоміоцитів важко візуалізувалися та були малочисельними. Так, в ембріональному та фетальному періодах десмосоми, *fasciae adherentes* та некуси були дифузно розсіяні по всій довжині сарколеми. Від 16-ї доби пренатального онтогенезу, по мірі розвитку скоротливого апарату клітини, міофібрили під гострим кутом підходили до границі кардіоміоцита, внаслідок чого подвійна мембрана слідувала під косим кутом відносно осі клітини, формуючи примітивний зачаток вставного диска.

На початку постнатального періоду зберігався дисперсний характер розподілу міжклітинних контактів, а подальший механізм торцювання мав складний та нелінійний характер.

Першими бічну поверхню кардіоміоцитів залишали адгерентні типи контактів. Найбільш інтенсивним цей процес був від 3-ї до 14-ї доби постнатального онтогенезу. При цьому зменшення кількості десмосом на латеральній поверхні кардіоміоцитів активніше відбувалося від 3-ї до 7-ї доби після народження, а зростання вмісту *fasciae adherentes* у ділянці вставного диска – на другому тижні постнатального онтогенезу, що було пов'язано зі зростанням вмісту міофібрил у результаті фізіологічної гіпертрофії кардіоміоцитів.

Латеральні щілинні контакти, що також розташовувались на відстані від вставного диска, не утворювали просторових асоціацій з механічними контактами. Торцювання цього типу з'єднань відбувалося в останню чергу після набуття дефінітивного патерну розподілу механічними контактами (рис. 1).

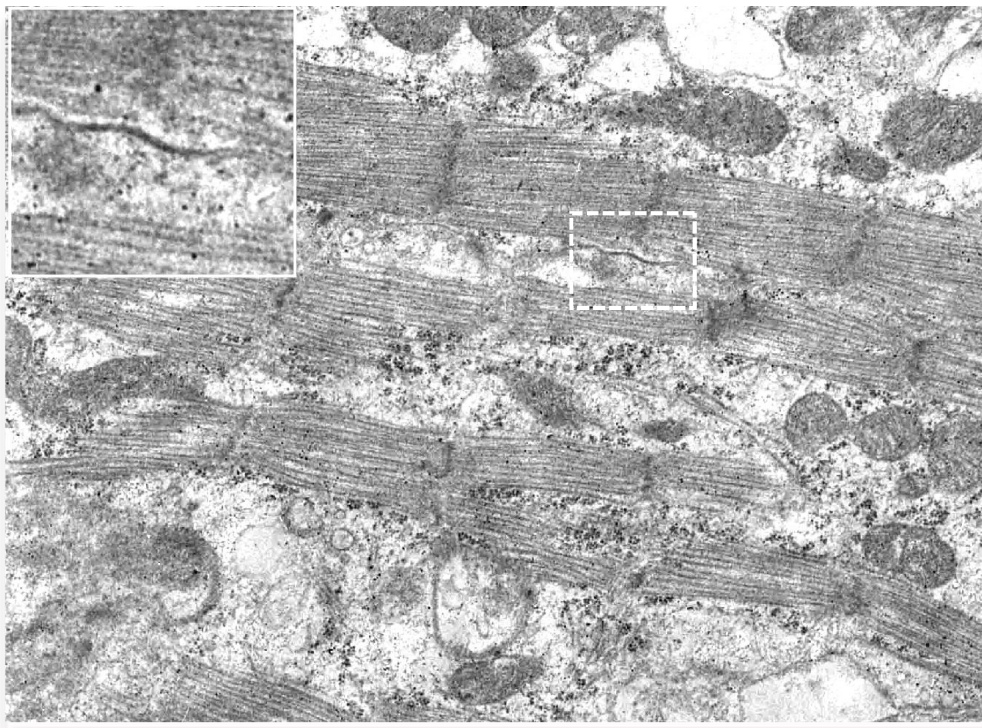


Рис. 1. Шлуночковий міокард щура на 7-у добу постнатального онтогенезу. Некус на бічній поверхні кардіоміоцитів (виділено пунктиром). $\times 10000$.

Позадискові некуси підлягали інтерналізації внаслідок підвищеної уразливості до впливу сил зсуву, які виникали в результаті скорочення сусідніх кардіоміоцитів, а також відсутністю стабілізуючого впливу адгезивних контактів. При цьому латеральні некуси залишали бічну поверхню клітини шляхом ендцитозу, утворюючи в цитоплазмі незрілих кардіоміоцитів кіль-

цеві профілі некусів, стінка яких частково або повністю складалася з пентамінарної мембрани щілинних контактів (рис. 2). Кільцеві некуси були гетерогенними структурами діаметром 0,1-1 мкм, всередині просвіту яких виявлялися індиферентні клітинні залишки. Найбільш виразним явищем інтерналізації було від 3-ї до 14-ї доби після народження. Проте навіть на 30-у добу ві-

дмічалися поодинокі нексуси розташовані на бічній поверхні клітини. Становлення дефінітивного патерна розподілу контактів завершувалося з набуттям статевозрілого віку.

Слід відмітити, що в інтактному зрілому міокарді шлуночків процес утворення кільцевих нексусів є рідким явищем.

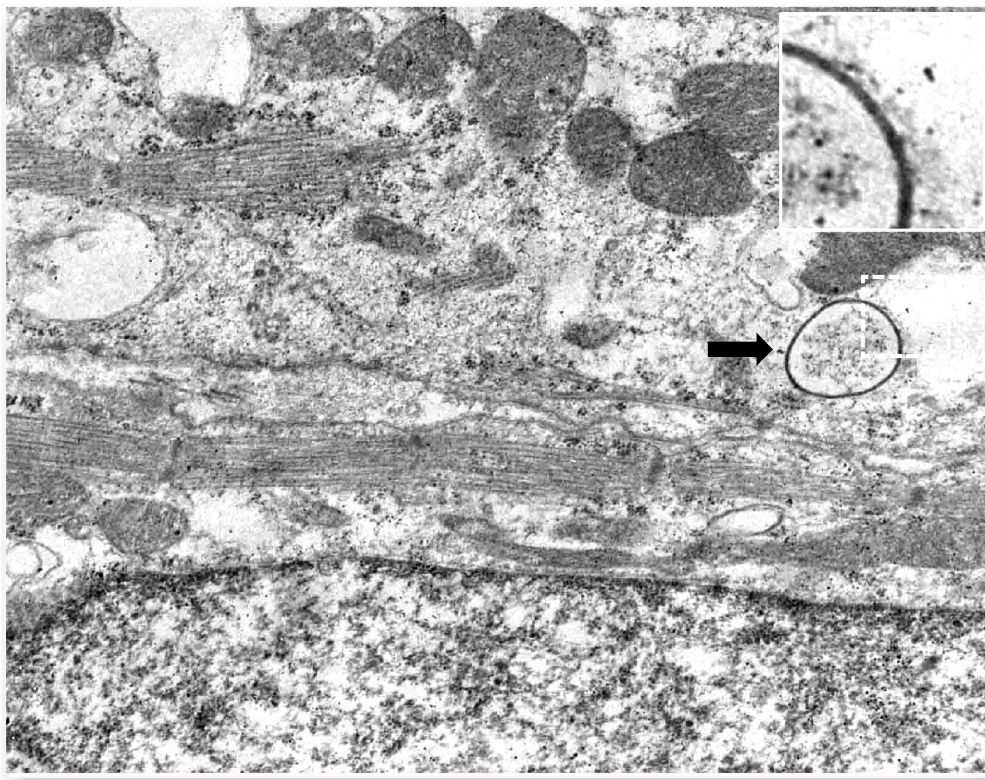


Рис. 2. Шлуночковий міокард щура, 7 дб постнатального онтогенезу. Кільцевий нексус поблизу сарколеми (стрілка). Вставка відображає мембрану нексуса, виділеного пунктиром. $\times 10000$.

Форма раннього вставного диска була лінійною або косо лінійною, а поперечний сегмент характеризувався незначною величиною звивистості (рис. 3). По мірі розвитку відбувалося ускладнення геометрії вставного диска з набуттям виразної зигзагоподібної форми. Міофібрили подовжувались за рахунок додавання нових саркомерів, а кінцеві відділи тонких філаментів занурювались у *fasciae adherentes*. Внаслідок цього раніше косо орієнтовані спеціалізовані ділянки диска ставали все більш наближеними до перпендикулярних по відношенню до продольної осі кардіоміоцита. Ступінчаста форма диска була більш виразною у лівому шлуночку на відміну від правого, в якому клітини коротші та мали менше саркомерів.

Під час аналізу динаміки змін індексу звивистості вставного диска була виявлена наявність достовірно вагомих розрізень показника при порівнянні правого та лівого шлуночків серця (рис. 4). У серці новонароджених щурів досліджуваний параметр не мав статистично вагомої різниці між правим та лівим відділом та становив відповідно $1,09 \pm 0,09$ та $1,21 \pm 0,11$. Подальший ріст кардіоміоцитів супроводжувався ускладненням конфігурації вставного диска, що знаходило

своє відображення у збільшенні величини показника, що вивчався. При цьому значення індексу звивистості у лівому шлуночку перевищувало такий у правому на всіх досліджуваних термінах постнатального онтогенезу. Переважання параметра у лівому шлуночку над правим набувало найбільшої статистично вагомої різниці на 14-у добу постнатального розвитку ($38,1\%$), а у дорослому інтактному міокарді показники різнилися на $26,8\%$ ($p < 0,05$). При цьому індекс звивистості вставного диска у зрілому серці складав $2,46 \pm 0,17$ та $1,94 \pm 0,14$ у лівому та правому шлуночках відповідно.

Морфологічне дослідження змін індексу звивистості вставного диска при порівнянні з відповідним значенням на 1-у добу життя не виявило достовірних змін показника впродовж першого тижня розвитку. В лівому шлуночку починаючи від 14-ї доби відзначалося статистично вагоме переважання параметра у порівнянні з новонародженими на $76,9\%$, на 30-у добу вивчення різниця становила $90,9\%$, а наприкінці дослідження більш ніж удвічі перевищувала вихідний рівень ($103,3\%$). Величина показника у правому шлуночку набувала достовірно вагомої різниці на 30-у добу онтогенезу ($61,5\%$), а у зрі-

лому міокарді становила 78,0% по відношенню до початкових значень.

При цьому слід відмітити, що в період від 7-ї до 14-ї доби у лівому шлуночку відзначалися найбільш стрімкі темпи наростання показника, а достовірне збільшення величини індексу звивис-

тості становило 36,3%. Це можна пояснити активацією процесів міофібрилогенезу під час найбільш інтенсивної фізіологічної гіпертрофії лівошлуночкових кардіоміоцитів та, як наслідок, ускладненням конфігурації fasciae adherentes у складі вставного диска.

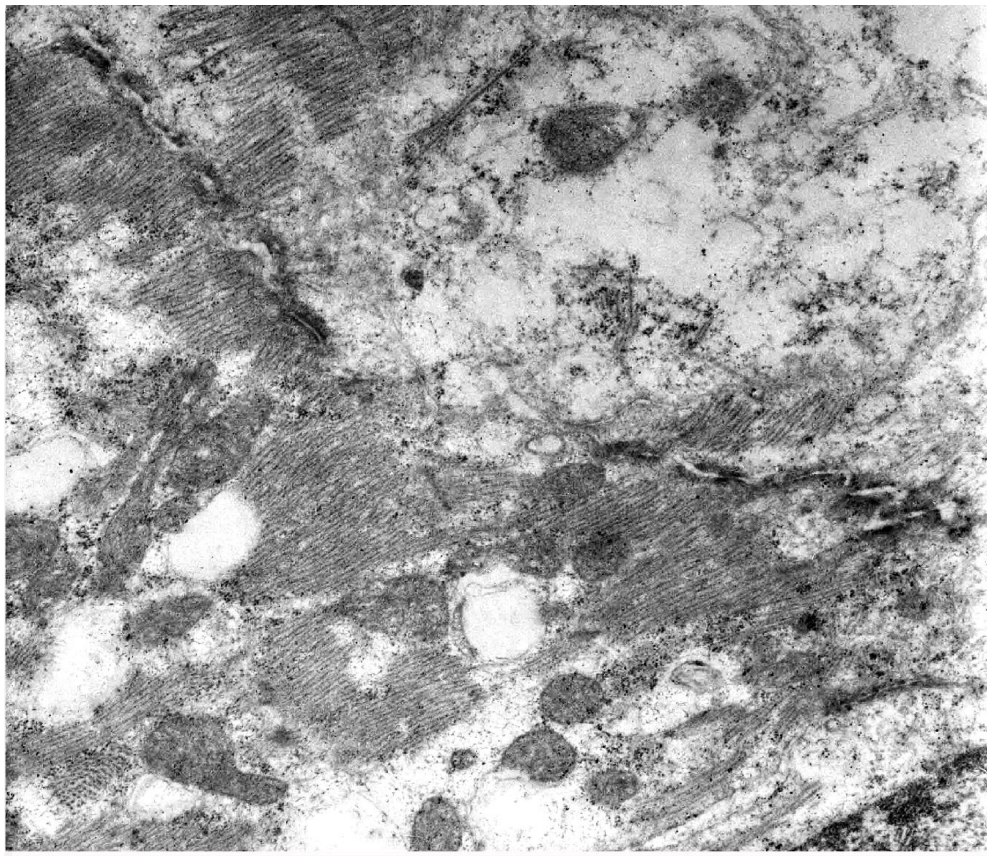


Рис. 3. Вставний диск у правому шлуночку щура на 3-ю добу постнатального періода. $\times 10000$.

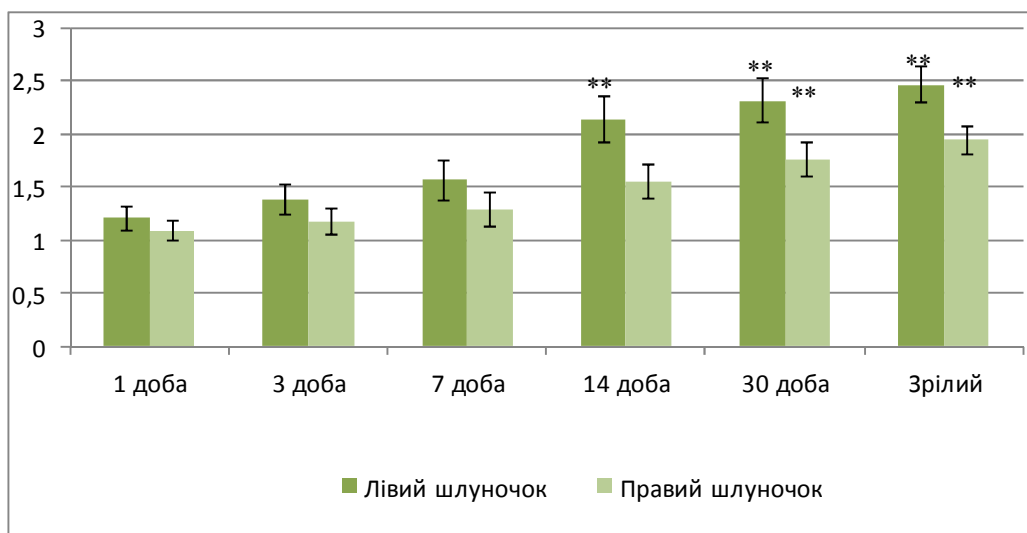


Рис. 4. Динаміка змін індексу звивистості вставного диска на етапах постнатального онтогенезу. Примітки: * - достовірна різниця ($p < 0,05$) між значеннями у правому та лівому шлуночках; ** - достовірна різниця ($p < 0,05$) у порівнянні з відповідним значенням на 1-у добу життя.

Висновки

1. У постнатальному періоді кардіогенезу щурів у результаті фізіологічної гіпертрофії та адаптивного ремоделювання кардіоміоцита відбувається перерозподіл дифузно розташованих по периферії контактів у бік його термінальних ділянок. Для адгерентного типу сполучень найбільш інтенсивно ці процеси протікають від 3-ї до 14-ї доби після народження. Переміщення нексусів супроводжується їх інтерналізацією з утворенням кільцевих структур у складі саркоплазми, вміст яких найвищий на другому тижні постнатального онтогенезу. Проте навіть на 30-у добу відмічаються поодинокі нексуси, розташовані на бічній поверхні клітини. Становлення дефінітивного патерна розподілу контактів завершується з набуттям статевозрілого віку.

2. Процес ускладнення геометрії вставного диска супроводжується послідовним зростанням величини індексу його звивистості, який у складі зрілого міокарда складав $2,46 \pm 0,17$ та $1,94 \pm 0,14$ у

лівому та правому шлуночках відповідно. Переважання рівня параметра у лівому шлуночку над правим спостерігалось на всіх термінах дослідження, досягаючи найбільшої різниці на 14-у добу постнатального розвитку ($38,1\%$; $p < 0,05$).

3. У лівому шлуночку починаючи від 14-ї доби відзначалося статистично вагоме переважання індексу звивистості вставного диска (на $76,9\%$), у порівнянні з відповідним значенням у період новонародженості, а наприкінці дослідження більш ніж удвічі перевищувала вихідний рівень ($103,3\%$). Величина показника у правому шлуночку набувала достовірно вагомої різниці на 30-у добу онтогенезу ($61,5\%$), а у зрілому міокарді становила $78,0\%$ по відношенню до значень на 1-у добу онтогенезу.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому планується вивчення формування контактного апарату та вставного диска в міокарді потомства щурів, що піддавалися впливу хронічної пренатальної гіпоксії.

Літературні джерела

References

1. Ultrastructure and Regulation of Lateralized Connexin43 in the Failing Heart / G. G. Hesketh, M. H. Shah, V. L. Halperin [et al.] // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 106, № 6. – P. 1153-1163.

Hesketh GG, Shah MH, Halperin VL, Cooke CA, Akar FG, Yen TE, Kass DA, Machamer CE, Van Eyk JE, Tomaselli GF. Ultrastructure and regulation of lateralized connexin43 in the failing heart. *Circ Res.* 2010 Apr 2;106(6):1153-63. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182147. Epub 2010 Feb 18. Cited in: PubMed; PMID: 20167932; PMCID: PMC2896878.

2. Hoyt R. H. Distribution and three-dimensional structure of intercellular junctions in canine myocardium / R. H. Hoyt, M. L. Cohen, J. E. Saffitz // *Circ. Res.* – 1989. – Vol. 64. – P. 563–574.

Hoyt RH, Cohen ML, Saffitz JE. Distribution and three-dimensional structure of intercellular junctions in canine myocardium. *Circ Res.* 1989 Mar;64(3):563-74. Cited in: PubMed; PMID: 2645060.

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.

Oosthoek PW, van Kempen MJ, Wessels A, Lamers WH, Moorman AFM. Distribution of the cardiac gap junction protein, connexin 43, in the neonatal and adult human heart. In: Marechal G, Carraro U, eds. *Muscle and Motility, Volume 2: Proceedings of XIXth European Conference in Brussels.* Andover, Hants, UK: Intercept Ltd; 1994:85-90.

4. Structural differences in the cytoarchitecture and intercalated discs between the working myocardium and conduction system in the human heart / T. Miyamoto, L. Zhang, A. Sekiguchi [et al.] // *Heart. Vessels.* – 2002. – Vol. 16. – P. 232–240.

Miyamoto T, Zhang L, Sekiguchi A, Hadama T, Shimada T. Structural differences in the cytoarchitecture and

intercalated discs between the working myocardium and conduction system in the human heart. *Heart Vessels.* 2002 Sep;16(6):232-40. Cited in: PubMed; PMID: 12382032.

5. Spach M. S. Changes in the topology of gap junctions as an adaptive structural response of the myocardium / M. S. Spach // *Circulation.* – 1994. – Vol. 90. – P. 1103-1106.

Spach MS. Changes in the topology of gap junctions as an adaptive structural response of the myocardium. *Circulation.* 1994 Aug;90(2):1103-6. Cited in: PubMed; PMID: 8044925.

6. Palatinus J. A. The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization. / J. A. Palatinus, J. M. Rhett, R. G. Gourdie // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1818, № 8. – P. 1831-1843.

Palatinus JA, Rhett JM, Gourdie RG. The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Aug;1818(8):1831-43. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.08.006. Epub 2011 Aug 9. Cited in: PubMed; PMID: 21856279; PMCID: PMC3244566.

7. Legato M. J. Cellular mechanisms of normal growth in the mammalian heart. I. Qualitative and quantitative features of ventricular architecture in the dog from birth to five months of age / M. J. Legato // *Circ. Res.* – 1979. – Vol. 44. – P. 250-262.

Legato MJ. Cellular mechanisms of normal growth in the mammalian heart. I. Qualitative and quantitative features of ventricular architecture in the dog from birth to five months of age. *Circ Res.* 1979 Feb;44(2):250-62. Cited in: PubMed; PMID: 761307.

8. Collins T. J. ImageJ for microscopy / T. J. Collins // *BioTechniques.* – 2007. – № 43. – P. 25-30.

Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques.* 2007 Jul;43(1 Suppl):25-30. Cited in: PubMed; PMID: 17936939.

Петрук Н.С. Ультраструктурная характеристика механизма формирования и развития вставочного диска в рабочем миокарде желудочков крыс на этапах постнатального онтогенеза.

Реферат. Цель – комплексная ультраструктурная оценка механизма формирования и развития вставочного диска в рабочем миокарде желудочков крыс на этапах постнатального онтогенеза. В ходе исследования был использован набор методов трансмиссионной электронной микроскопии, морфометрии и статистической обработки данных. Для количественной оценки динамики конфигурации изменений вставочного диска определяли индекс его извилистости. Установлено, что перераспределение адгерентных контактов с боковой поверхности кардиомиоцита наиболее активно происходит с 3-х по 14-е сутки после рождения, а процесс торцевания щелевых соединений протекает за счет их интернализации с последующим образованием в саркоплазме кольцевых профилей, которые встраиваются во вставочный диск последними. Процесс усложнения геометрии вставочного диска сопровождался последовательным ростом величины индекса его извилистости, который в составе зрелого миокарда составлял $2,46 \pm 0,17$ и $1,94 \pm 0,14$ в левом и правом отделах соответственно. Преобладание параметра в левом желудочке над правым достигало наибольшей разницы на 14-е сутки постнатального развития (38,1%; $p < 0,05$), а в зрелом интактном миокарде показатели различались на 26,8% ($p < 0,05$).

Ключевые слова: миокард желудочков, крысы, постнатальный онтогенез, ультраструктура вставочного диска, индекс извилистости, кольцевой нексус.