

**К.М.Шевченко**

ДЗ «Дніпропетровська  
медична академія МОЗ  
України»

**Ключові слова:** щури,  
міокард передсердь, гост-  
ра пренатальна гіпоксія,  
васкулогенез.

Надійшла: 06.11.2016

Прийнята: 02.12.2016

УДК 57.032:611.127:611.12

## **РОЗВИТОК СУДИННОГО КОМПОНЕНТА МІОКАРДА ПЕРЕДСЕРДЬ ЩУРІВ НА ТЛІ ЗМІН ПОВЕРХНЕВО-ОБ'ЄМНИХ ХАРАК- ТЕРИСТИК ПЕРЕДСЕРДЬ ПІСЛЯ ВПЛИ- ВУ ГОСТРОЇ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ**

*Дослідження проведено в рамках науково-дослідних робіт «Структурні перебудови компонентів серцево-судинної системи в умовах її нормального й аномального гістогенезу у людини й експериментальних тварин» (номер державної реєстрації 0111U006621) і «Нормальний та аномальний морфогенез компонентів серцево-судинної системи людини й експериментальних тварин» (номер державної реєстрації 0114U005592).*

**Реферат.** Метою дослідження було виявлення змін судинного компонента міокарда передсердь щурів після впливу гострої пренатальної гіпоксії. Для виявлення судин у міокарді передсердь був використаний маркер  $\alpha$ -SMA. Поверхнево-об'ємні характеристики передсердь були визначені за допомогою гістологічного методу, тривимірного комп'ютерного моделювання, морфометричного, стереологічного і біостатистичного аналізів. У результаті дослідження було встановлено, що міокард передсердь щурів після впливу гострої пренатальної гіпоксії характеризується більшою поширеністю судини у порівнянні з нормою при збережених об'ємно-поверхневих характеристиках передсердь.

**Morphologia.** – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 70-76.

© К.М.Шевченко, 2016

✉ [temiz\\_kiz@mail.ru](mailto:temiz_kiz@mail.ru)

**Shevchenko K.M. The development of the vascular component of rat atrial myocardium on the background of atrial surface-volume characteristics changes after the influence of acute prenatal hypoxia.**

**ABSTRACT. Background.** Intrauterine hypoxia leads to cardiovascular system abnormalities and fetal death that determine actuality in research of this problem nowadays. The previous researches were focused to the influence of hypoxia to the process of ventricular myocardium vasculogenesis, than atrial myocardium blood vessels formation is still out of the scientist's attention. **Objective.** Purpose of the work was to determine the changes of blood vessels formation during the stages of cardiogenesis after the influence of acute prenatal hypoxia. **Methods.** Embryo hearts were investigated on 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> days of prenatal ontogenesis, newborn rat hearts and the hearts of rats on 3<sup>rd</sup>, 14<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day of postnatal ontogenesis. Animals were subdivided into two groups: 1<sup>st</sup> experimental group of animals was exposed to acute prenatal hypoxia and control group animals. Hypoxia modeling was conducted on pregnant females by injection of 1% sodium nitrite intraperitoneally in dose of 6 mg per 100 g of weight on the 13th embryonic day that lead to moderate hypoxia. Control animals were injected by 1 ml of 0.9% physiological solution of sodium chloride subcutaneously. During the work complex of histological, immunohistochemical and three-dimensional computer modeling methods were used. **Results and conclusion.** There were more rich blood vessels in atrial myocardium of newborn rats after the influence of acute prenatal hypoxia as compared to the norm. It is important to be admitted that atrial myocardial thickness, volume and surface area of the atria were stable. The arterioles of the 1<sup>st</sup> experimental group animals were concentrated inside atrial myocardium (intramural), than control group animals arterioles were found under the epicardium only. It was determined by previous research that hypoxia leads to increased diameter and amount of the vessels, and also to hypertrophy. It was compensatory response of the organism toward to increased myocardial thickness. In our experiment greater prevalence of the blood vessels after exposure of acute prenatal hypoxia was associated with the stimulating effect of hypoxia on vasculogenesis through HIF. Thus, greater prevalence of the blood vessels after exposure of acute prenatal hypoxia as compared to the norm is compensatory response of the organism to oxygen deficiency.

**Key words:** rats, atrial myocardium, acute prenatal hypoxia, vasculogenesis.

### **Citation:**

Shevchenko KM. [The development of the vascular component of rat atrial myocardium on the background of atrial surface-volume characteristics changes after the influence of acute prenatal hypoxia]. *Morphologia*. 2016;10(4):70-6. Ukrainian.

## Вступ

Високий відсоток смертності плодів, що пов'язаний з порушеннями формування компонентів серцево-судинної системи, обумовлює актуальність дослідження кардіогенезу у теперішній час [1].

Відомо, що на 11-у добу ембріонального розвитку щурів епікардіальні клітини відділяються та імігрують у субепікардіальний простір, де вони зазнають епітеліо-мезенхімної трансформації та перетворюються на судинні гладкі міоцити та фібробласти [2]. Порушення розвитку епікарда призводить до формування вроджених аномалій розвитку судин [3].

За даними Tomanek R. J. з колегами [4] 13-а доба пренатального періоду розвитку щурів характеризується початком васкулогенезу у шлуночках та являє собою появу кров'яних острівців або первинних гемокапілярів у епікарді. Останні складаються з шару ендотеліальних клітин, що заповнені еритроцитами. Первинні гемокапіляри стають помітними поблизу верхівки серця у міжшлуночкової борозні. Згодом вони з'являються у атриовентрикулярній борозні та інших зонах шлуночків. У подальшому відбувається іміграція і диференціація ангиобластів від епікарда у міокард. На 16-у добу пренатального періоду розвитку коронарні судини з'являються у міокарді шлуночків [5]. Важливо відзначити, що на 17-у добу пренатального періоду розвитку гемокапіляри у шлуночках, поширюючись, зливаються між собою та утворюють первинне капілярне сплетіння, тоді як у передсердях судини відсутні [6]. Отже, у доступній науковій літературі зустрічається велика кількість робіт, присвячених ангиогенезу у шлуночках, проте лише поодинокі дослідження спрямовані на вивчення розвитку судин у міокарді передсердь.

Ранній постнатальний період (1-2-а доба) у щурів характеризується диференціюванням артерій та венул, а також розвитком судинного сплетіння у міокарді шлуночків, тоді як у передсердях означені події відбуваються пізніше [7]. Починаючи від 4-ї доби після народження коронарні артерії формують колатералі у міокарді передсердь. Відомо, що коронарні судини з'являються у відповідь на збільшення потреб у живленні, що пов'язане зі зростаючою товщиною міокарда протягом кардіогенезу [8]. Передсердя поступаються за товщиною міокарда шлуночкам, тому, цілком ймовірно, що судини з'являються у міокарді передсердь значно пізніше.

Відомо [9], що гіпоксія ініціює фактор HIF 1 (hypoxia inducible factor 1), який в свою чергу активує судинно-ендотеліальний фактор росту (VEGF). Останній відіграє вирішальну роль у формуванні та подальшому рості судин. Приєднання VEGF до тирозинкіназних рецепторів (KDR/Fik-1, Fit-1) на поверхні ендотеліальних

клітин ініціює експресію генів, що необхідні для проліферації та диференціації ендотеліоцитів та лежать в основі васкуло- та ангиогенезу. HIF регулює експресію численних генів, що спрямовані на адаптацію клітини до гіпоксії. Зокрема, HIF індукуює еритропоетин, який в свою чергу, стимулює еритропоєз, інгібує апоптоз та мобілізує ендотеліальні клітини-попередники для росту судин шляхом зв'язування з рецепторами еритропоєтину.

За даними попередніх досліджень відомо, що гіпоксія провокує більш ранню появу гемокапілярів у компактному шарі шлуночків [10], оскільки гіпоксія є тригером для вторгнення ангиобластів у серце ембріона [9]. Однак відомості про те, як вплив гіпоксії позначається на процесі ангиогенезу у міокарді передсердь, досі відсутні.

**Мета** – дослідження розвитку судинного апарата міокарда передсердь на тлі змін поверхнево-об'ємних характеристик передсердь щурів після впливу гострої пренатальної гіпоксії.

## Матеріали та методи

Дослідження виконали на білих безпородних щурах-самках і їхньому потомстві. У якості матеріалу використали серця ембріонів на 14-у, 16-у, 18-у добу пренатального онтогенезу, серця новонароджених щурів, а також серця щурів на 3-ю, 14-у та 30-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).

Відповідно до мети дослідження, тварини розбивалися на дві групи: тварини першої експериментальної групи, що зазнали впливу гострої пренатальної гіпоксії (ГПГ) та тварини контрольної групи. Моделювання гіпоксії проводили за стандартною методикою [11] на вагітних самках шляхом внутрішньоочеревинного введення 1%-го нітриту натрію у дозах, що викликають гіпоксію середнього ступеня тяжкості: на 13-у добу вагітності в дозі 6 мг/100 г ваги одноразово – для моделювання гострої пренатальної гіпоксії. Контрольним тваринам внутрішньоочеревинно вводили 1 мл 0,9%-го фізіологічного розчину натрію хлориду. Ембріональний матеріал експериментальних тварин отримували в лабораторних умовах відповідно до рекомендацій Ю.М. Кожем'якіна і співавт. [12]. Серця щурів на різних термінах пренатального та постнатального онтогенезу фіксували у розчині 10%-ного забуференого формаліну, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, просочували хлороформом та заливали у парапласт. Гістологічні зрізи виготовляли товщиною 5 та 7 мкм за допомогою санного

мікротому. Фарбування депарафінізованих зрізів проводили гематоксиліном-еозином.

Під час імуногістохімічного дослідження виготовляли зрізи завтовшки 5 мкм та наносили на адгезивні предметні стекла. З метою демаскування антигенів зрізи піддавались термічній обробці у 0,01М цитратному буфері (рН=6,0) на водяній бані протягом 20 хвилин при температурі 98-101°C. Наступними етапами були блокування ендогенної пероксидази у розчині перекису водно, промивка зрізів у розчині 0,01М фосфатно-сольового буфера (рН=7,4) та блокування неспецифічного зв'язування реагентів з тканинними компонентами за допомогою 5%-ного розчину бичачого сироваткового альбуміну (BSA) на фосфатному буфері. Після нанесення первинних антитіл зрізи поміщали на 1,5 години у термостат при температурі 37°C зі зволоженням камери з метою попередження виникнення неспецифічної фонові реакції. Антитіла, що не зв'язались, відмивались за допомогою буфера. Вторинні антитіла, мічені біотином, після нанесення підлягали інкубації при кімнатній температурі протягом 20 хвилин з наступним відмиванням у буфері. Для візуалізації використовували систему LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin). Після кон'югації зрізи промивали буферним розчином, обробляли хромогеном діамінобензидином з наступним дофарбуванням гематоксиліном Майєра. Антитіла до гладком'язового  $\alpha$ -актину ( $\alpha$ -SMA) були використані для дослідження етапів розвитку судин.

Для відтворення тривимірних моделей передсердь використовували серійні зрізи товщиною 7 мкм, зафарбовані гематоксиліном-еозином. Серійні цифрові зображення, відзняті на камеру при збільшенні  $\times 10$  та  $\times 100$ , упорядко-

увались та відбирались з кроковою відстанню в залежності від необхідної кількості знімків. Наступна і основна робота з зображеннями відбувалась за допомогою програми Amira 5.0, в якій завантажені зображення вирівнювались одне відносно одного та обводились по зовнішньому контуру для відтворення рельєфу поверхні передсердь. Створений каркас імпортувався до програми 3ds max 5, де проводилась кінцева обробка моделі. За допомогою тривимірної реконструкції була відтворена зовнішня поверхня передсердь та вушок на різних етапах онтогенетичного розвитку щурів в нормі та за умов впливу гострої та хронічної пренатальної гіпоксії.

#### Результати та їх обговорення

На 14-у добу пренатального періоду розвитку гістологічний аналіз стінки передсердь щурів виявив, що вона складалась з трьох шарів – епікарда, міокарда та ендокарда. Означений термін в нормі характеризується початком васкулогенезу, що являв собою появу в епікарді передсердь кров'яних острівців або первинних гемокапілярів.

На 16-у добу пренатального періоду розвитку щурів в нормі відбувалось поступове поширення гемокапілярів від епікарда у міокард передсердь. Судини поширювались від атріовентрикулярної борозни у дорзовентральному та краніокаудальному напрямку.

Після впливу ГПП значення товщини міокарда достовірно не відрізнялись від значень групи контролю. Аналогічні зміни ми спостерігали, проводячи аналіз тривимірних моделей передсердь: значення площі поверхні та об'єму передсердь тварин контрольної та першої експериментальної груп також не відрізнялись на цьому терміні (табл. 1).

Таблиця 1  
Поверхнево-об'ємні характеристики передсердь в нормі та після впливу гострої гіпоксії на етапах онтогенезу

Період розвитку	Термін, доба	Група дослідження	Площа поверхні, мм <sup>2</sup>		Об'єм, мм <sup>3</sup>	
			ПП	ЛП	ПП	ЛП
Пренатальний	16	Контроль	1,213	1,170	0,067	0,054
		Група 1	1,947	1,115	0,079	0,046
Постнатальний	1	Контроль	9,890	6,083	0,756	0,376
		Група 1	8,234	7,759	0,816	0,554

На 18-у добу пренатального періоду розвитку в нормі з'являлись поодинокі гемокапіляри під епікардом у базальній частині стінки передсердь, у вушках вони були відсутні. Значення товщини міокарда тварин контрольної та першої експериментальної груп достовірно не відрізнялись на цьому терміні (рис. 1).

1-а доба постнатального періоду розвитку в нормі характеризувалась найзначнішими пере-

будовами стінки передсердь. Морфометричний аналіз тривимірних моделей передсердь новонароджених тварин (рис. 2) виявив збільшення площі поверхні та об'єму передсердь у порівнянні з 16-ю добою пренатального періоду розвитку в нормі та після впливу ГПП. Значення наведених показників тварин першої експериментальної суттєво не відрізнялись від значень групи контролю на означеному терміні.

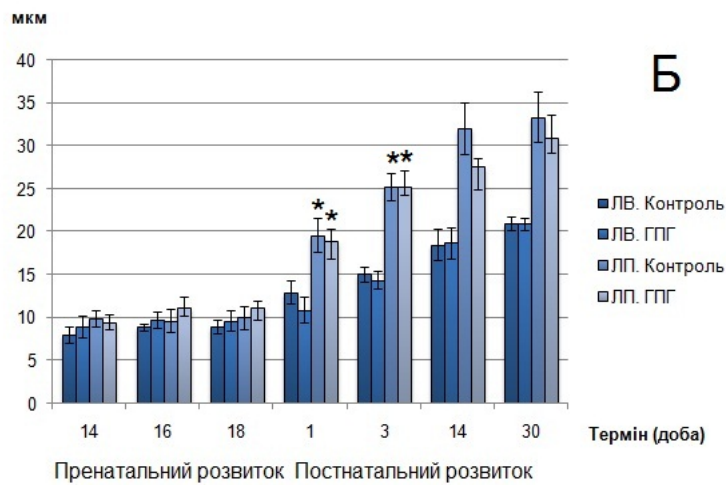
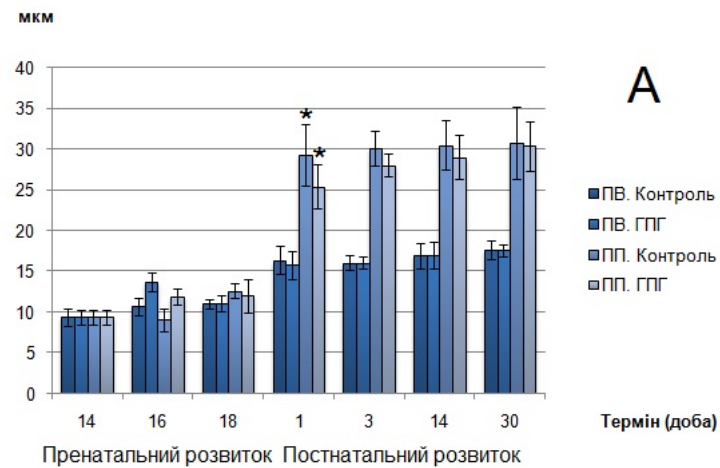


Рис. 1. Динаміка змін товщини міокарда правого (А) та лівого (Б) передсердь щурів контрольної та першої експериментальної груп протягом онтогенезу.  
Примітка. \* – достовірна відмінність від попереднього терміну ( $p < 0,05$ ).

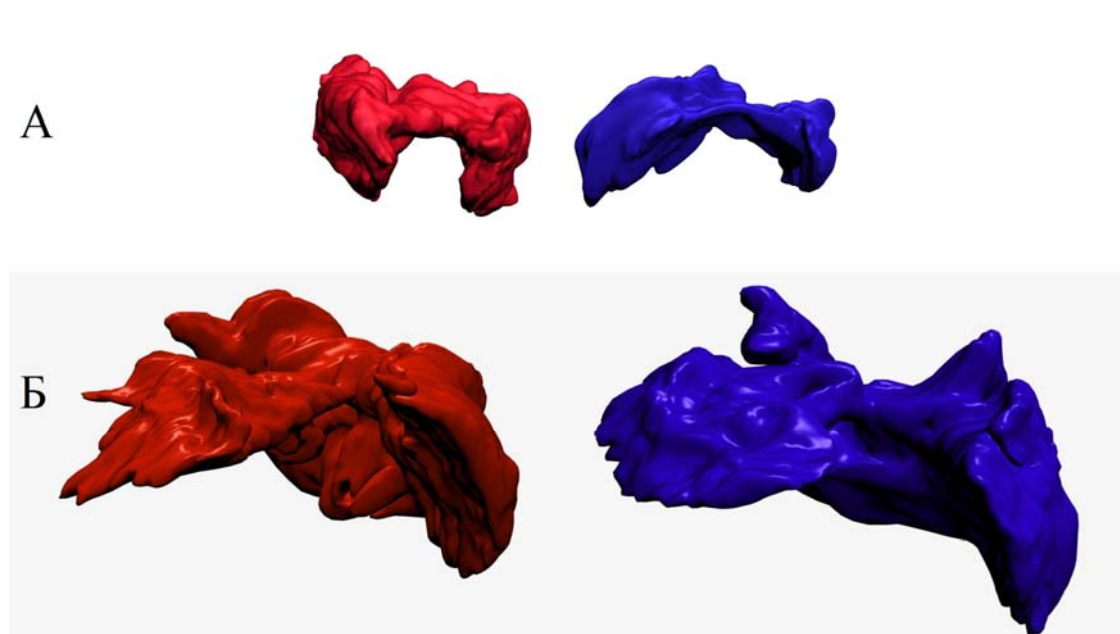


Рис. 2. Тривимірні моделі передсердь щурів контрольної (червоний колір) та першої експериментальної групи (синій колір) на 16-у добу пренатального періоду розвитку (А) та на 1-у добу постнатального періоду розвитку (Б). Вид зверху спереду.



Передсердний міокард новонароджених щурів після впливу ГПГ характеризувався більшою поширеністю судинного сплетіння у порівнянні з нормою: у тварин першої експериментальної групи судини розташовувались у товщі міокарда передсердь (інтрамурально), тоді як у тварин

контрольної групи – лише під епікардом (рис. 3).

У стінці деяких судин за допомогою маркера  $\alpha$ -SMA виявлялись позитивні гладком'язові елементи, що свідчить про те, що це – артеріоли (рис. 4).

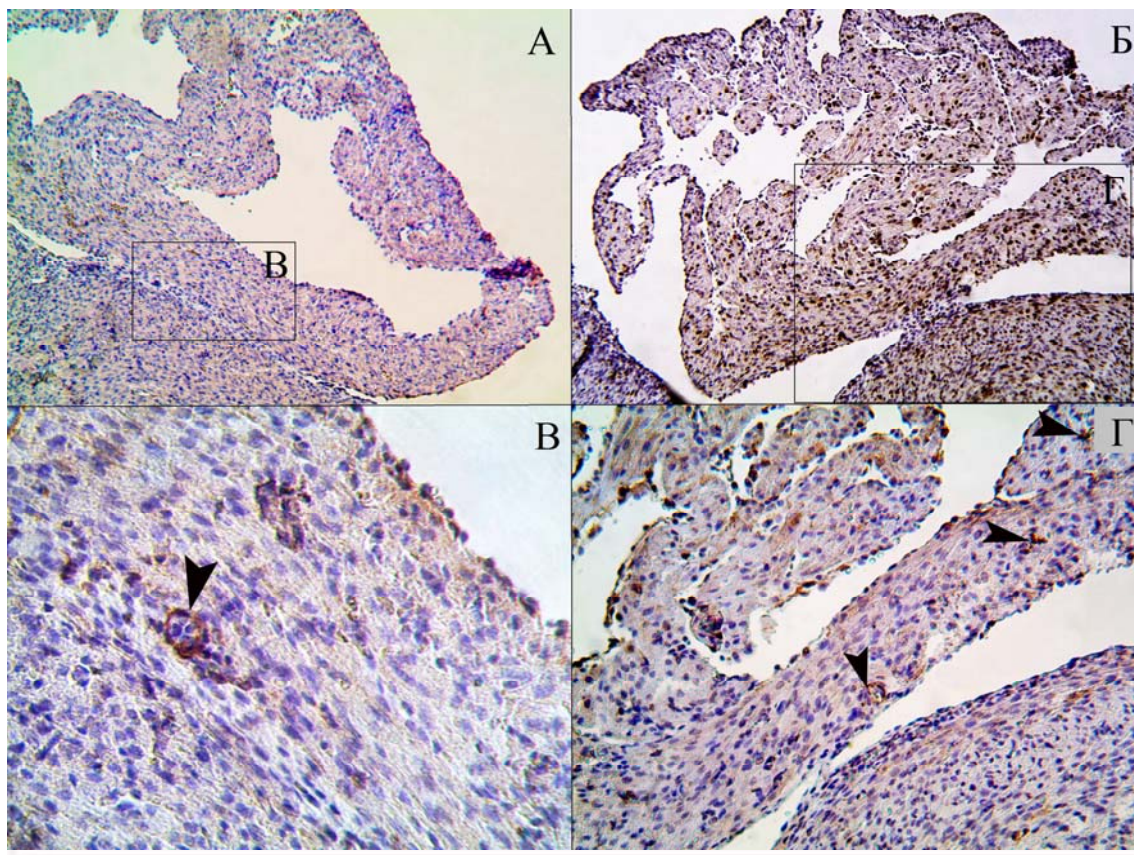


Рис. 3. Гістологічні зрізи сердець новонароджених щурів. Імуногістохімічна реакція, маркер  $\alpha$ -SMA, дофарбування гематоксиліном Майєра. Стрілками позначені судини міокарда передсердь. А, В – за нормальних умов; Б, Г – після впливу гострої пренатальної гіпоксії. А –  $\times 100$ ; Б –  $\times 100$ ; В –  $\times 400$ ; Г –  $\times 200$ .

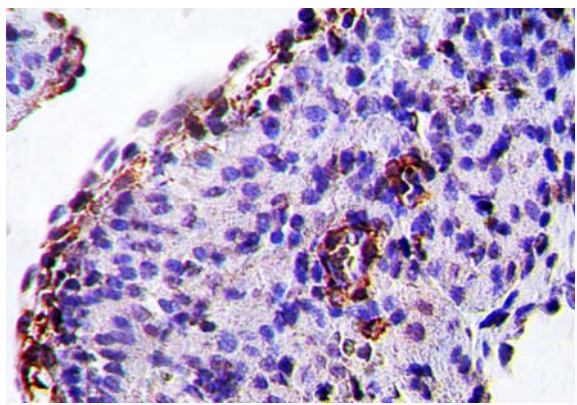


Рис. 4. Гістологічний зріз передсердя новонародженого щура першої експериментальної групи. Імуногістохімічна реакція, маркер  $\alpha$ -SMA, дофарбування гематоксиліном Майєра.  $\times 400$ .

На 14-у добу постнатального періоду розвитку судини розташовувались вздовж всієї стінки передсердь, окрім вушок. За ступенем поширеності судин міокард передсердь тварин першої експериментальної групи суттєво не відрізнявся від норми. На означеному терміні значення товщини міокарда достовірно не відрізнялись від значень групи контролю.

На 30-у добу постнатального періоду розвитку інтенсивність експресії маркера  $\alpha$ -SMA у стінках судин відрізнялась залежно від типу судин: вени поступались артеріям за цією ознакою. Диференціювання судин дає уявлення щодо їхнього розташування: під епікардом зосереджені вени, а у міокарді – артеріоли (рис. 5).

Отже, міокард передсердь новонароджених щурів після впливу ГПГ характеризувався більшою поширеністю судинного сплетіння у порів-

няння із нормою: у новонароджених тварин першої експериментальної групи артеріоли розташовувались у товщі міокарда передсердь (інтрамурально), тоді як у тварин контрольної групи – лише під епікардом. Останнє відбувалось на тлі збережених об'ємно-поверхневих характеристик передсердь: значення товщини міокарда,

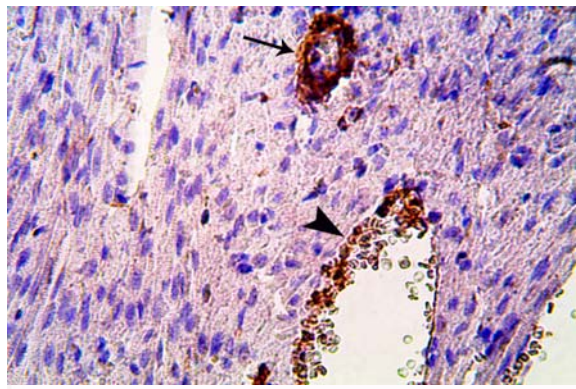


Рис. 5. Гістологічний зріз передсердя щура першої експериментальної групи на 30-й добі постнатального періоду розвитку. Імуногістохімічна реакція, маркер  $\alpha$ -SMA, дофарбування гематоксиліном Майєра. Стрілкою позначена артеріола, головкою стрілки – вена у міокарді передсердя.  $\times 400$ .

За даними попередніх досліджень [10] відомо, що гіпоксія призводить до збільшення діаметра та кількості судин, а також до гіпертрофії міокарда. Означене, скоріш за все, є компенсаторною відповіддю організму на збільшені потреби у живленні у зв'язку зі збільшеною товщиною міокарда. У нашому експерименті більша поши-

реші площі поверхні та об'єму передсердь тварин першої експериментальної групи суттєво не відрізнялись від групи контролю. Протягом першого місяця постнатального онтогенезу гістоархітектура міокарда передсердь щурів, що зазнали впливу ГПГ, суттєво не відрізнялась від такої у тварин контрольної групи.

реші судин після впливу ГПГ відбувається на тлі незмінених об'ємно-поверхневих характеристик передсердь (товщина міокарда, об'єм та площа поверхні передсердь) та пов'язана зі стимулюючим впливом гіпоксії на васкулогенез через фактор HIF. Відмінності результатів досліджень, скоріш за все, пов'язані з різними експериментальними умовами (моделювання гіпоксії на більш ранніх термінах розвитку). Отже, після впливу ГПГ збільшується поширеність судин у порівнянні з нормою, що є компенсаторною відповіддю на дефіцит кисню в організмі.

#### Висновки

Міокард передсердь щурів після впливу гострої пренатальної гіпоксії характеризується більшою поширеністю судини у порівнянні з нормою при збережених об'ємно-поверхневих характеристиках передсердь. Протягом першого місяця постнатального онтогенезу гістоархітектура міокарда передсердь щурів, що зазнали впливу гострої пренатальної гіпоксії, суттєво не відрізняється від такої у тварин контрольної групи.

#### Перспективи подальших досліджень

У подальшому доцільно вивчення змін судинного компонента міокарда передсердь на етапах онтогенезу за умов більш тривалого впливу гіпоксії.

#### Літературні джерела

#### References

1. Zeitlin J, Mohangoo AD, Delnord M, Cuttini M; EURO-PERISTAT Scientific Committee. The second european perinatal health report: documenting changes over 6 years in the health of mothers and babies in Europe. *J. Epidemiol. Community Health.* 2013;67(12):983-85. Cited in: PubMed; DOI: 10.1136/jech-2013-203291; PMID: 24052513.
2. Lie-Venema H, Eralp I, Maas S, Gittenberger-De Groot AC, Poelmann RE, DeRuiter MC. Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium-derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 2005; 282(2):120-29.
3. Tomanek RJ, Haung L, Suvama PR, O'Brien LC, Ratajska A, Sandra A. Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc. Res.* 1996;31 Spec. No:E116-26.
4. Tomanek RJ, Ratajska A, Kitten GT, Yue X, Sandra A. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Dyn.* 1999;215(1):54-61.
5. Ratajska A1, Ciszek B, Sowińska A. Embryonic development of coronary vasculature in rats: corrosion casting studies. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;270(2):109-16.
6. Sato Sh. Ultrastructural study of capillary angiogenesis in rat fetal hearts: Role of fibroblasts and myocardial clefts. *Medical Electron. Microscopy.* 1998;31, iss. 4:185-92.
7. Dbalý J. Postnatal development of coronary arteries in the rat. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1973;141(1):89-101.
8. Sedmera D, McQuinn. Embryogenesis of the heart muscle. *Heart Fail Clin.* 2008;4(3):235-45. doi: 10.1016/j.hfc.2008.02.007.
9. Patterson AJ, Zhang L. Hypoxia and fetal heart development. *Curr Mol Med.* 2010;10(7):653-



66.

10. Shatorna VF, Shponka IS, Abdul-Ogly LV, Savenkova OO. Krytychni periody kardiogenezu [Critical periods of cardiogenesis]. Dnipropetrovsk: Porogy; 2010. 160 p. Ukrainian.

11. Ivanitskaya NF. [The method of modelling different phases of hemic hypoxia in rats by the administration of sodium nitrite]. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 1976; (3):

69-71. Russian.

12. Kozhemyakin YuM, Khromov OS, Filonenko MA, Sayfetdinova GA, authors. Solovyov AI, editor. Naukovo-pratychni rekomendacii z utrimannia laboratornyh tvaryn ta roboty z nymy [Scientific and practical advice on the maintenance of laboratory animals and work with them]. Kyiv: Avitsenna; 2002. 156 p. Ukrainian.

**Шевченко Е.Н. Развитие сосудистого компонента миокарда предсердий крыс на фоне изменений поверхностно-объемных характеристик предсердий после влияния острой пренатальной гипоксии.**

**Реферат.** Целью нашего исследования было определение изменений сосудистого компонента миокарда предсердий крыс после воздействия острой пренатальной гипоксии. Для обнаружения сосудов в миокарде предсердий был использован маркер  $\alpha$ -SMA. Поверхностно-объемные характеристики предсердий были определены с помощью гистологического метода, трехмерного компьютерного моделирования, морфометрического, стереологического и биостатистического анализов. В результате исследования было установлено, что миокард предсердий крыс после воздействия острой пренатальной гипоксии характеризуется большей распространенностью сосудов по сравнению с нормой при сохраненных объемно-поверхностных характеристиках предсердий.

**Ключевые слова:** крысы, миокард предсердий, острая пренатальная гипоксия, васкулогенез.