

APPLICATION OF BIOPOLYMERS FOR CRYOPRESERVATION OF RAT TESTICULAR TISSUE**Volkova N. O., Yukhta M. S., Chernyshenko L. G., Stepanyuk L. V., Sokil L. V., Goltsev A. M.**

Abstract. Today, transplantation of cryopreserved fragments of immature testicles is a non-alternative way for fertility preserving in pre-adolescent patients, which has been planned cytotoxic therapy. However, loss of spermatogonial stem cells occurs during cryopreservation. Therefore, the effectiveness of the cryopreservation procedure is critical and should be improved. A promising approach is to use biopolymer gels, since the presence of an extracellular matrix may affect the structure of ice crystals during cryopreservation.

The aim of the work was to determine the effect of collagen (CG) and fibrin (FG) gels on the morphological and functional characteristics of the fragments of the seminiferous tubules of the testes of immature rats in a programmed freezing condition.

Object and methods. The following experimental cryoprotective media were used: 1. collagen gel (CG) with 5% DMSO; 2. fibrin gel (FG) with 5% DMSO. Controls: 1. Hanks' solution with 5% bovine serum albumin (BSA) and 5% DMSO; 2. Hanks' solution without cryoprotectant; 3. intact tissue. CG was prepared from collagen type I, which was obtained from rat tendons. FG was obtained from an average fraction of fresh blood of animals after centrifugation (12 min, 1500 g).

Samples of seminiferous tubules were obtained mechanically from both testes of immature rats ($n = 50$, weighing 50 ± 15 g, aged 7-8 weeks), incubated in media for 30 min (4°C) and cryopreserved according to the program: ramp to 0°C at a rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$; hold for 5 min at 0°C ; ramp to -8°C at a rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$; hold for 1 min at -8°C ; ramp to -40°C at a rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and up to -70°C at a rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$; transferred to liquid nitrogen. After heating the histological structure and the metabolic activity (MTT test and LDH activity) of spermatogenic epithelium cells was evaluated.

Results. Histologically, testicular tissue of intact rats had a normal structural organization. Cryopreservation without cryoprotectants (negative control) caused gross damages of structure of seminiferous tubules: a sharp retraction of cells with the formation of large cracks inside the spermatogenic epithelium, its complete desquamation, lysis and picnosis of almost 90% of nuclei. The spermatogenic epithelium after cryopreservation under protection of BSA + 5% DMSO had moderately pronounced changes: the degree of retraction and desquamation, the number and size of the cavities decreased. The use of FG with 5% DMSO (as opposed to CG) led to a decrease in the severity of desquamation and retraction of spermatogenic cells, as well as in the number of cells with pyknotic nuclei, compared to the use of BSA instead biopolymer gel.

According to the MTT-test, cryopreservation under the protection of FG with 5% DMSO was in 3.9 times more effective compared to the negative control, exceeding by 27% the result of application of BSA as the basis of the cryoprotective medium. A similar trend was observed during LDH activity determination: in the group of FG + 5% DMSO application LDG activity was increased in 1.6 times in relation to negative control. The use of CG was less effective by both parameters.

In general, the obtained data indicate that the use of FG as a basis of cryoprotective medium increases the resistance of the cells of the seminiferous tubules of immature rats to the action of factors of cryopreservation.

Conclusion. Cryopreservation of fragments of the seminiferous tubules under the protection of a cryoprotective medium based on FG allows preserving their histostructure and metabolic activity and is more effective than the use of BSA or CG.

Key words: testicular tissue, immature rats, dimethyl sulfoxide, cryopreservation, bovine serum albumin, collagen gel, fibrin gel.

*Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.
Стаття надійшла 13.03.2019 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-70-75

УДК 612.172: 611.127-018

¹Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Марциновский В. П., ²Филатова В. Л.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ КАРДИОМИОГЕНЕЗА У КРЫС WISTAR: РОСТ СУММАРНОЙ ЧИСЛЕННОСТИ КАРДИОМИОЦИТОВ И ОБРАЗОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ДВУЯДЕРНЫХ МИОЦИТОВ В ПАРЕНХИМЕ МИОКАРДА КОМПЛЕКСА (ЛЖ + МЖП)

Ровненский государственный гуманитарный университет (г. Ровны)

¹Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)

²Украинская медицинская стоматологическая академия (г. Полтава)

prof.zagoruykoGE@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Исследование проведено в соответствии с тематикой НИР «Морфофункциональный стан органів і тканин експериментальних тварин та людини в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників», № государственной регистрации 0117U003181.

Вступление. Проблемы *миогенеза* скелетной мышечной ткани [1] и *кардиомиогенеза* [2-6] привлекают пристальное внимание ученых на протяжении многих

десятилетий. Одной из проблем *кардиомиогенеза* является исследование закономерностей *пролиферативных* процессов, развивающихся в миокарде в период эмбрионального и постнатального онтогенеза позвоночных животных и человека [2-6]. Пролиферация кардиомиоцитов (КМЦ) способствует росту массы и объема миокарда, формированию четырехкамерного сердца, которое начинает активно сокращаться с 15 суток *пренатального* развития крысят Wistar. По данным [6,7] в миокарде 19-ти суточных эмбрионов

белых крыс выявляются *ацитокинетические* митозы, в результате которых образуются двуядерные кардиомиоциты (2-я КМЦ). Для исследования процессов пролиферации и полиплоидии КМЦ используют методы определения *индекса меченных ядер (ИМЯ)* и *митотического индекса (МИ)* [2-5]. С этой целью проводят автордиографию ядер КМЦ в препаратах (срезах) миокарда. В серии гистологических и электронно-микроскопических изображений сердечной мышцы определяют численность зерен серебра, локализованных внутри контуров площадей срезов ядер КМЦ. Однако, численность зерен серебра зависит от таких показателей, как: зернистость эмульсии; толщина срезов гистологических препаратов; продолжительность экспонирования (15 – 40) суток; удельной активности ^3H – тимидиновой эмульсии; числа инъекций радиоактивной метки; интервалов между инъекциями; температуры экспонирования препаратов, покрытых эмульсией [8]. Многие авторы [2-6] отмечают, что показатели ИМЯ и МИ непосредственно характеризуют процессы *синтеза ДНК* и подготовку ядер к *митозу*, но не *цитокinesis* клеток. Поэтому для определения численности КМЦ в стенке камер сердца применяют методы щелочной диссоциации кусочков миокарда на отдельные миоциты. Способ получения изолированных КМЦ методом щелочной диссоциации фиксированных формалином кусочков миокарда был разработан R. Schneider и P. Pfitzer [9]. Различные методы получения суспензии изолированных клеток нашли широкое применение для определения численности, массы и размеров КМЦ в сердце животных и человека [2-6,9]. В работах по проблеме кардиомиогенеза [10,11,12] в качестве *объекта* электронно-микроскопического и морфометрического исследования нами использован мышечный комплекс «левый желудочек + межжелудочковая перегородка» (ЛЖ + МЖП). Это обусловлено тем, что сократительная функция миокарда в комплексе (ЛЖ + МЖП) обеспечивает непрерывное кровоснабжение и, следовательно, работоспособность органов опорно-двигательного аппарата, на долю которых в организме позвоночных животных и человека приходится до 80 % массы тела [13]. В настоящей работе ранее полученные данные [12] мы дополнили результатами определения суммарной численности (1-я + 2-я) КМЦ, численности 2-я КМЦ в паренхиме миокарда, исследовали кинетику скорости суточного роста численности КМЦ. Эти морфометрические показатели позволили определить некоторые *закономерности* эмбрионального и постнатального кардиомиогенеза в миокарде комплекса (ЛЖ + МЖП) у крыс Wistar.

Цель работы. На основе результатов морфометрического анализа серии негативов миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) эмбрионов и крыс разного хронологического возраста *определить закономерности кинетики: роста суммарной численности (1-я + 2-я) КМЦ; роста численности двуядерных КМЦ, скорость* процессов пролиферации и полиплоидии КМЦ, развивающихся в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) в процессе *пренатального* и *постнатального* онтогенеза крыс Wistar.

Объект и методы исследования. При проведении исследований руководствовались принципами биоэтики, изложенными в Законе Украины «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759 від 15.12.2009 р.).

Общее количество экспериментальных животных составило 100 крыс разного возраста (на каждый возраст от 3 до 5 животных). В работе [14] было установлено наличие *суточной* периодичности интенсивности кариокинеза и клеточных делений в разных органах подопытных животных. Эта периодичность обусловлена ночным образом жизни лабораторных животных и крыс Wistar. Чтобы избежать влияние суточной динамики митоза ядер и пролиферации КМЦ все работы по забою животных и экстирпации сердца проведены в утреннее время, в интервале 8 – 10 часов. Были использованы: 15-16 и 20-21 суточные эмбрионы крыс; новорожденные; 1 – 45-ти суточные крысы – самцы линии Wistar. Препараты миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) крыс разного возраста исследовали методами световой, электронной микроскопии, морфометрии. Информация об объекте и методах морфометрии препаратов (ЛЖ + МЖП) подробно изложена в наших работах [10,11,12]. В данной работе определяли: **1.** *Кинетику* роста суммарной численности (1-я + 2-я) КМЦ – $\sum \text{кмц} = f_1(t)$ в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП). **2.** *Скорость* суточного роста суммарной численности КМЦ – $\Delta \sum \text{кмц}/\text{сут}$. **3.** Полученные данные использовали для вычисления значений показателей $\Delta \sum \text{кмц}/\text{час}$ и $\Delta \sum \text{кмц}/\text{мин}$. **4.** Относительную численность *пролиферирующихся* КМЦ (*Нп кмц, в %*) в паренхиме миокарда определяли по формуле – $\text{Нп кмц} = (\Delta \sum \text{кмц} / \sum \text{кмц}) \times 100 \%$. **5.** *Кинетику* роста численности 2-я КМЦ – $N \text{ 2-я кмц} = f_2(t)$. **6.** *Скорость* суточного роста численности 2-я КМЦ – $\Delta N \text{ 2-я кмц}/\text{сут}$. **7.** Полученные данные использовали для вычисления значений показателей $\Delta N \text{ 2-я кмц}/\text{час}$ и $\Delta N \text{ 2-я кмц}/\text{мин}$.

Результаты исследований и их обсуждение. На рис. 1 представлен *график 1* кинетики роста суммарной численности КМЦ ($\sum \text{кмц}$) в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП).

В процессе пре- и постнатального кардиомиогенеза (15 суток до и 15 суток после) рождения суммарная численность КМЦ в паренхиме (ЛЖ + МЖП) увеличивается в 4,34 раза (от 0,35 до 1,52) $\times 10^7$ кмц. В период *эмбрионального* кардиомиогенеза (15 – 21) сутки значения $\sum \text{кмц}$ возрастают в 2 раза (от 0,35 до 0,74) $\times 10^7$

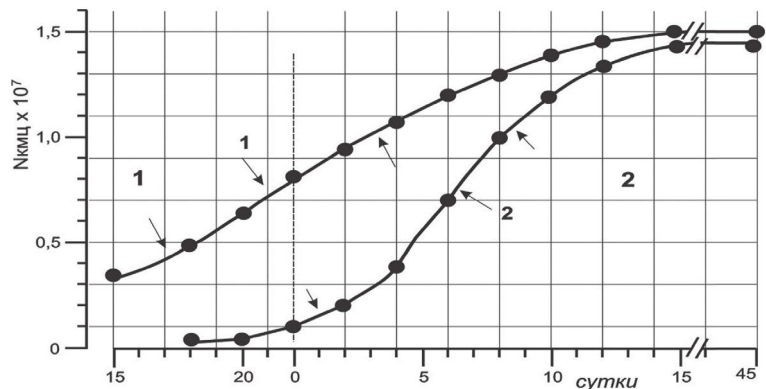


Рис. 1. Кинетика роста суммарной численности (1-я + 2-я) КМЦ (график 1) и численности N 2-я КМЦ (график 2) в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) у крыс Wistar в процессе пренатального – 1 и постнатального – 2 кардиомиогенеза. По оси абсцисс – сутки развития, по оси ординат – численность КМЦ.

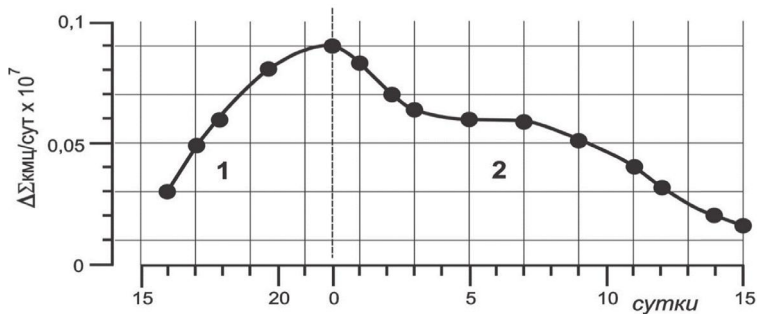


Рис. 2. Кинетика скорости суточного роста суммарной численности КМЦ ($\Delta \Sigma$ кмц/сутки) в паренхиме миокарда (ЛЖ + МЖП) в процессе кардиомиогенеза. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

кмц. В процессе *постнатального* кардиомиогенеза, в интервале времени (новорожденные – 15-ти суточные крысята), значения Σ кмц также увеличивается в 2 раза (от $0,77$ до $1,52$) $\times 10^7$ кмц. В период *эмбрионального* кардиомиогенеза участок *графика 1* вогнут вниз (\downarrow). Это свидетельствует о монотонном увеличении *скорости* суточного роста суммарной численности КМЦ. После рождения крысят участок *графика 1* выпуклый вверх (\uparrow). Это свидетельствует о том, что в период *постнатального* кардиомиогенеза, после прохождения «точки перегиба» на графике с координатами (0 суток и $0,8 \times 10^7$ кмц), происходит уменьшение *скорости* суточного роста суммарной численности КМЦ в паренхиме миокарда (ЛЖ + МЖП). При $t \geq 10$ суток наблюдается приближение значений Σ кмц к асимптоте с ординатой равной $1,52 \times 10^7$ кмц. В интервале времени (15 – 45) суток суммарная численность КМЦ не изменяется – Σ кмц $\approx const \approx (1,51 \pm 0,02) \times 10^7$ кмц. Представленные данные подтверждают положение о том, что в период *постнатального* кардиомиогенеза происходит *затухание* процессов *пролиферации* КМЦ в миокарде позвоночных животных и человека [2-5]. В этих публикациях было установлено, что в процессе возрастного развития белых крыс ($t > 45$ суток), численность *постмитотических* КМЦ в паренхиме миокарда *не увеличивается*. При умеренных продолжительных физических нагрузках, в условиях экспериментальной патологии разного генеза, в миокарде лабораторных животных возможно развитие таких процессов, как: *гипертрофия* \leftrightarrow *атрофия* КМЦ; увеличение пloidности ядер миоцитов; *гибель* некоторого количества миоцитов, но численность КМЦ *не возрастает* [2-5,7,12].

На **рис. 2** представлен график изменения *скорости* суточного роста суммарной численности КМЦ в паренхиме миокарда (ЛЖ + МЖП).

На этом графике определяются четыре последовательных участка монотонного изменения значений показателя $\Delta \Sigma$ кмц/сутки. **Первый** участок графика ограничен временными координатами (16 суток до рождения, 0 – новорожденные крысята). В период *эмбрионального* кардиомиогенеза происходит *интенсивный* рост значений $\Delta \Sigma$ кмц/сут от $0,033 \times 10^7$ кмц/сут ($1,38 \times 10^3$ кмц/час и 229 кмц/мин) до *максимального* $0,09 \times 10^7$ кмц/сут ($3,75 \times 10^4$ кмц/час и 625 кмц/мин). Эти данные свидетельствует об активизации процессов *пролиферации* эмбриональных КМЦ. **Второй** участок графика ограничен временными координатами (0 и 3) суток

после рождения. В этот период *постнатального* кардиомиогенеза наблюдается *уменьшение* значений показателя $\Delta \Sigma$ кмц/сутки (от $0,09$ до $0,065$) $\times 10^7$ кмц/сут ($2,71 \times 10^4$ кмц/час и 451 кмц/мин). Следовательно, в *первом* периоде *постнатального* кардиомиогенеза происходит *уменьшение* пролиферативной активности КМЦ. **Третий** участок графика ограничен временными координатами (3 и 7) суток после рождения. Этот *второй* период *постнатального* кардиомиогенеза характеризуется *постоянством* цифровых значений – $\Delta \Sigma$ кмц/сут $\approx const \approx 0,06 \pm 0,005 \times 10^7$ кмц/сут ($2,5 \times 10^4$ кмц/час и 417 кмц/мин). Стабильность значений показателя $\Delta \Sigma$ кмц/сут обусловлено морфофункциональными взаимодействиями между тремя *популяциями* КМЦ (1-я т-КМЦ \leftrightarrow 1-я с-КМЦ \leftrightarrow 2-я КМЦ) [12]. **Четвертый** участок графика ограничен временными координатами (7 и 15) суток после рождения крысят. Он характеризует *третий* период *постнатального* кардиомиогенеза. В это время происходит *убыль* значений показателя $\Delta \Sigma$ кмц/сут (от $0,06$ до $0,015$) $\times 10^7$ кмц/сут ($6,25 \times 10^3$ кмц/час и 104 кмц/мин). Следовательно, одним из морфологических признаков *завершения* *постнатального кардиомиогенеза* является *затухание* пролиферативных процессов в паренхиме миокарда (ЛЖ + МЖП).

На **рис. 3** представлен *график относительного* количества (в %) *пролиферирующих* КМЦ в миокарде (ЛЖ + МЖП).

В период *эмбрионального* кардиомиогенеза наблюдается «рост \rightarrow убыль» цифровых значений показателя N_p кмц (%). В интервале времени (15 – 18) суток развития эмбрионов, значения N_p кмц *возрастают* от 8,6 % до *максимального*, равного 16,7 %. Ко времени *завершения эмбриогенеза*, количество *пролиферирующих* КМЦ в паренхиме миокарда убывает до ≈ 10 %. В процессе *постнатального* кардиомиогенеза наблюдается *снижение* пролиферативной активности КМЦ. В паренхиме миокарда 15-ти суточных крысят значения N_p кмц ≈ 1 %. *Наибольшая* пролиферативная активность КМЦ определяется в *эмбриональный* период развития крысят.

Единичные 2-я КМЦ нами были выявлены в миокарде 18-19-ти суточных эмбрионов. КМЦ имели такие характерные морфологические признаки. **1.** Наличие в саркоплазме «изогенных ядерных дуплетов» (по терминологии П.П. Румянцева [2]). **2.** Сестринские ядра отделены друг от друга узкой щелью, в которой

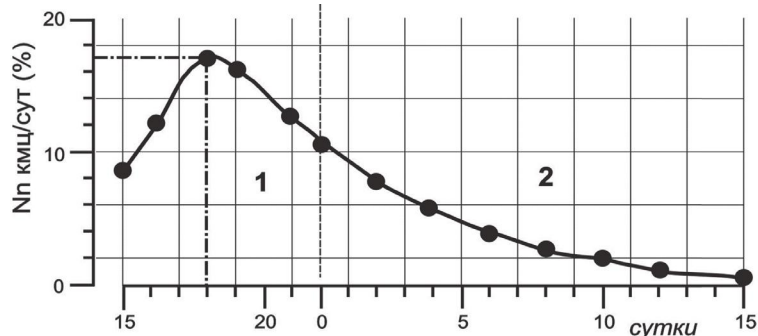


Рис. 3. Изменение относительного количества пролиферирующих КМЦ (N_p кмц, %) в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) крыс разного возраста. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

выявляются элементы эргастоплазмы. **3.** Отсутствие морфологических признаков «разборки ↔ сборки» миофибрилл, расположенных вблизи ядер. **4.** Отсутствие морфологических признаков цитокинеза – борозды деления в области расположения сестринских ядер. На **рис. 1** представлен **график 2** кинетики роста численности популяции 2-я КМЦ в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП). В процессе кардиомиогенеза (18 суток до и 15 суток после) рождения, численность N 2-я КМЦ в паренхиме (ЛЖ+МЖП) увеличивается в **1000 раз!** (от 0,00144 до 1,44) $\times 10^7$ кмц. График имеет форму вытянутой буквы «S». В период эмбрионального и раннего постнатального кардиомиогенеза, в интервале времени (18 суток до и 5 суток после) рождения, участок **графика 2** вогнут вниз (↓). Это свидетельствует об интенсивном увеличении скорости суточного роста численности 2-я КМЦ. При $t \in (5 - 15)$ суток, участок **графика 2** выпуклый вверх (↑). После прохождения «точки перегиба» на графике с координатами (5 суток, $0,6 \times 10^7$ кмц), происходит уменьшение скорости суточного роста численности 2-я КМЦ в паренхиме миокарда (ЛЖ + МЖП). При $t \rightarrow 15$ суткам, цифровые значения показателя N 2-я кмц $\rightarrow 1,44 \times 10^7$ кмц. В интервале времени $t \in (15 - 45)$ суток наблюдается стабилизация цифровых значений показателя N 2-я кмц $\approx const \approx 1,44 \times 10^7$ кмц. Следовательно, после завершения постнатального кардиомиогенеза, численность 2-я КМЦ в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) не увеличивается и составляет $\approx 94 - 95$ % от суммарной численности миоцитов.

На **рис. 4** представлен **график скорости** суточного роста численности популяции 2-я КМЦ (ΔN 2-я кмц/сут) в (ЛЖ + МЖП).

График расположен асимметрично относительно вертикальной штриховой линии (время рождения крысят) и смещен вправо вдоль оси абсцисс – сутки постнатального развития. В процессе эмбриогенеза (18 – 21) сутки, значения показателя ΔN 2-я кмц/сут медленно увеличиваются (от 0,00144 до 0,009) $\times 10^7$ кмц/сут (от 600 кмц/час и 10 кмц/мин до 2300 кмц/час и 38 кмц/мин). В течении 5 суток после рождения, цифровые значения показателя ΔN 2-я кмц/сут интенсивно возрастают до максимума равного $0,175 \times 10^7$ кмц/сут или (73×10^3 кмц/час и 1215 кмц/мин). При $t \in (5 - 15)$ суток цифровые значения показателя ΔN 2-я кмц/сут интенсивно убывают до минимума $0,002 \times 10^7$ кмц/сут или ($8,3 \times 10^3$ кмц/час и 175 кмц/мин). Экстраполяция экспериментальных данных позволяет с большой вероятностью предположить, что при $t > 15$ суток, ΔN 2-я кмц/сут > 0 . Следовательно, в течение постнатальной жизни позвоночных животных и человека, в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) происходит процесс медленного обновления популяции 2-я КМЦ. Если принять максимальную численность 2я КМЦ равную $1,44 \times 10^7$ кмц за 100 %, то в период эмбрионального кардиомиогенеза значения показателя N 2-я кмц медленно возрастают от 0 до 1,35 %. В эмбриональный период источником образования 2-я КМЦ в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП), вероятно, является субпопуляция тетраплоидных 1-я с-КМЦ (4с x 1). Эти 1-я с-КМЦ находятся в периоде

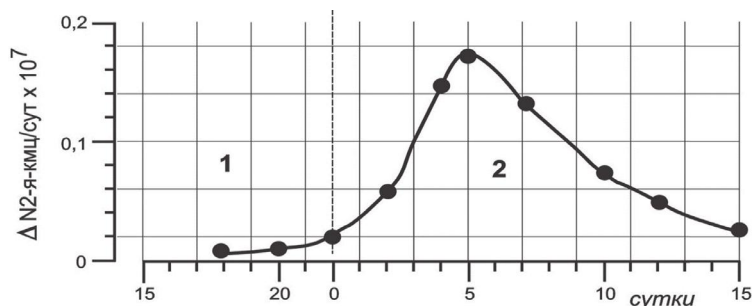


Рис. 4. График скорости суточного роста численности популяции 2-я КМЦ (ΔN 2-я кмц/сут) в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

G₂ клеточного цикла с отсроченным кариокинезом. Такие 1-я с-КМЦ имеют увеличенные размеры, содержат большое ядро ($V_{я} \approx 180 - 200$) $\mu\text{м}^3$ и вместе с множеством 1-я с-КМЦ (2с x 1) участвуют в сократительной функции миокарда эмбрионального сердца.

К окончанию постнатального периода кардиомиогенеза завершается и полиплоидизация КМЦ в паренхиме миокарда. 2-я КМЦ составляют $\approx (94 - 96)$ % суммарной численности КМЦ в миокарде половозрелых крыс. Эти КМЦ находятся в состоянии терминальной дифференциации и выведены из клеточного цикла. Остальные 4-6 % – это, вероятно, 1-я с-КМЦ (4с x 1), которые, при определенных условиях, способны трансформироваться в 2-я КМЦ и замещать стареющие и погибающие апоптозом КМЦ в процессе постнатальной жизни млекопитающих. Исходя из данных современных публикаций [15,16], предшественниками 1-я с-КМЦ (4с x 1) являются стволовые клетки, расположенные в эндотелии коронарных артерий, которые, пройдя ряд трансформаций, мигрируют в паренхиму миокарда и дают начало КМЦ. В условиях нормы процесс регенерации паренхимы миокарда у человека происходит с очень низкой скоростью (1 – 4) % в год.

Выводы

1. В процессе эмбрионального и постнатального кардиомиогенеза в комплексе (ЛЖ + МЖП) происходит непрерывный рост суммарной численности (1-я + 2-я) КМЦ с максимальной скоростью в миокарде новорожденных крысят.

2. Образование и увеличение численности популяции 2-я КМЦ в паренхиме миокарда происходит в интервале времени (18-19 суток до и 15 суток после) рождения крысят.

3. После завершения постнатального периода кардиомиогенеза в интервале времени (15 – 45) суток, суммарная численность КМЦ и численность 2-я КМЦ не возрастают.

4. Относительное содержание пролиферирующей КМЦ в комплексе (ЛЖ + МЖП) максимально в миокарде 18-ти суточных эмбрионов крыс.

5. Наиболее активно процесс полиплоидии КМЦ в паренхиме миокарда комплекса (ЛЖ + МЖП) развивается в начале постнатального кардиомиогенеза с максимальной скоростью на 5-е сутки после рождения крысят.

Перспективы дальнейших исследований. Будет представлена морфометрическая информация о закономерностях морфогенеза и взаимодействия популяций КМЦ, образующих и формирующих паренхиму миокарда мышечного комплекса (ЛЖ+МЖП) в процессе кардиомиогенеза.

Література

1. Problemy miogeneza. L.: Nauka; 1981. 268 s. [in Russian].
2. Rumyansev PP. Kardiomiocyt v processah reproduktsii, differencirovki i regeneratsii. L.: Nauka; 1982. 288 s. [in Russian].
3. Tverdohleб IV. Geterogenost miokarda i ee razvitie v normalnom kardiomiogeneze. Dnepropetrovsk: POROGI; 1996. 224 s. [in Russian].
4. Shponka IS. Gistogeneticheskie protsessy v razvivaijemsia miokarde mlekopitaiyih. Dnepropetrovsk: POROGI; 1996. 228 s. [in Russian].
5. Kozlov SV, Savenkova OO. Geteromorfni stinki sertsia na etapah rannogo kardiogeneza lydunu. Morfologiya. 2007;1(3):32-4. [in Ukrainian].
6. Bolshakova GB. Proliferatsiya kardiomiocitov u plodov kryv v norme i posle povrezhdeniya serdca. Byull. eksper. biol. 2008;4:471-4. [in Russian].
7. Balueva OB. Morfofunktsionalnaya kharakteristika kardiomiocitov v norme i posle vozdeystviya etilovogo efira dimetiltriokhlorgeksenovoy kisloty v razlichnyye periody ontogeneza kryv [avtoreferat]. Spb.; 1996. 22 s. [in Russian].
8. Podymov VF, Kortukov EV. Sovremennye metody analiza elektronno-mikroskopicheskikh avtoradiogramm v issledovaniyakh na subkletochnom urovne. Citologiya. 1988;23(12):1339-51. [in Russian].
9. Scheider R, Pfitzer P. Die Zahl der Kerne in isolierten Zellen des menschlichen Myokards. Virchows Arch. 1973;12:238-58.
10. Zahoruiko GE, Shmulich AV, Zahoruiko YuV. Zakonomernosti kinetiki rosta massy serdca, kompleksa (LZh+MZhP) i parenkhimy miokarda v prenatalnom i postnatalnom ontogeneze kryv. Visnik probl. biol. i med. 2018;2(144):87-90. [in Russian].
11. Zahoruiko GE, Zahoruiko YuV. Vozrastnye izmeneniya razmerov i chisla kardiomiocitov, ix yader v processe prenatalnogo i rannego postnatalnogo razvitiya serdca kryv. Visnik probl. biol. i med. 2017;3(141):304-11. [in Russian]. 12. Zahoruiko GE, Zahoruiko YuV, Filatova VL. Morfo-metricheskaya kharakteristika populatsiy kardiomiocitov obrazuyushchikh parenkhimu miokarda v processe postnatalnogo kardiomiogeneza. Visnik probl. biol. i med. 2018;2(147):282-6. [in Russian].
12. Pankov EYa. Oporno-dvigatelnyy apparat. V kn: Mikromorfologiya cheloveka. Chast 2. Kharkov: XGMU; 1994. s. 147-58. [in Russian].
13. Alov IA, Krasnikova NV. Sutochnyy ritm mitozov raznykh organov belykh myshей i kryv. Dokl. AN SSSR. 1962;142(4):933-8. [in Russian].
14. Shakhov VP, Popov SV. Stvolovyye kletki i kardiomiogenez v norme i patologii. Tomsk: STT; 2004. 170 s. [in Russian].
15. Bryan A, Floret J, Heimfeld D. Endothelial cells contribute to generation of adult ventricular myocytes during cardiac homeostasis. Cell Reports. 2014;8(1):229-41.

ЗАКОНОМІРНОСТІ КАРДІОМІОГЕНЕЗА У ЩУРІВ WISTAR: РІСТ СУМАРНОЇ ЧИСЕЛЬНОСТІ КАРДІОМІОЦИТІВ І ФОРМУВАННЯ ПОПУЛЯЦІЇ ДВОЯДЕРНИХ МІОЦИТІВ В ПАРЕНХИМІ МІОКАРДА КОМПЛЕКСУ (ЛЖ + МШП)

Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Марциновський В. П., Філатова В. Л.

Резюме. В інтервалі часу (15 діб до та 15 діб після) народження щурят в міокарді комплексу (ЛЖ + МШП) сумарна чисельність (1-я + 2-я) КМЦ зростає (від 0,35 до 1,52) $\times 10^7$ кмц. Найбільша інтенсивність зростання значень Σ кмц визначається в паренхимі міокарду новонароджених щурят (3,75 $\times 10^4$ кмц/год або 625 кмц/хв). В інтервалі часу (18 діб до та 15 діб після) народження, в міокарді комплексу (ЛЖ + МШП) чисельність 2-я КМЦ зростає в 1000 разів (від 0,0014 до 1,44) $\times 10^7$ кмц. Максимальна інтенсивність росту чисельності 2-я КМЦ визначається в міокарді (ЛЖ + МШП) щурят на 5-ту добу (73 $\times 10^3$ кмц/год і 1215 кмц/хв).

Ключові слова: кардіоміогенез, проліферація, поліплоїдія, кардіоміоцит.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ КАРДИОМИОГЕНЕЗА У КРЫС WISTAR: РОСТ СУММАРНОЙ ЧИСЛЕННОСТИ КАРДИОМИОЦИТОВ И ОБРАЗОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ДВОЯДЕРНЫХ МИОЦИТОВ В ПАРЕНХИМЕ МИОКАРДА КОМПЛЕКСА (ЛЖ + МЖП)

Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Марциновский В. П., Филатова В. Л.

Резюме. В интервале времени (15 суток до и 15 суток после рождения крысят) в миокарде комплекса (ЛЖ+МЖП) суммарная численность Σ кмц (1-я КМЦ + 2-я КМЦ) возрастает (от 0,35 до 1,52) $\times 10^7$ кмц. Наиболее интенсивный рост Σ кмц определяется в паренхиме миокарда новорожденных крысят (3,75 $\times 10^4$ кмц/час и 625 кмц/мин). В интервале времени (18 суток до и 15 суток после рождения) в миокарде комплекса (ЛЖ+МЖП) численность N2-я кмц возрастает в 1000 раз (от 0,0014 до 1,43) $\times 10^7$ кмц. Максимальная интенсивность роста численности N2-я кмц определяется в паренхиме миокарда (ЛЖ + МЖП) у 5-ти суточных крысят (73 $\times 10^3$ кмц/час и 1215 кмц/мин).

Ключевые слова: кардиомиогенез, пролиферация, полиплоидия кардиомиоцит.

REGULARITIES OF CARDIOMYOGENESIS IN WISTAR RATS: CARDIOMYOCYTES NUMBER OF GROWTH AND FORMATION OF POPULATION OF DUAL MYOCYTES IN THE COMPLEX MYOCARDIUM (LV + IVF)

Zagoruyko Yu. V., Zagoruyko G. E., Martsinovsky V. P., Filatova V. L.

Abstract. In the work were used: 15-16 and 20-21 daily embryos of rats, newborns, 1–45 daily rats – Wistar males. A morphometric analysis of the myocardial parenchyma of the complex “left ventricle + interventricular septum” (LV + IVF) was performed. It was established that in the process of prenatal and postnatal cardiomyogenesis (15 days before and 45 days after) birth, the total number of CMC (Σ cmc = N1-c 1st cmc + N2-c cmc) in the parenchyma (LV + IVF) increases by 4,34 times (from 0.35 to 1.52) $\times 10^7$ cmc. During the period of embryonic cardiomyogenesis (15-21) days, the values of L cmc increase by 2 times (from 0.35 to 0.74) $\times 10^7$ cmc. In the process of postnatal cardiomyogenesis, in the time interval (newborns – 15 daily rats), the volume of values cmc also increases by 2 times (from 0.77 to 1.52) $\times 10^7$ cmc. In the time interval (15–45) days, the total number of cmc does not change – Σ cmc \approx const \approx (1.51 \pm 0.02) $\times 10^7$ cmc. During the embryonic period of cardiomyogenesis continuous proliferation of cmc occurs with a maximum speed of 3.75 $\times 10^4$ cmc/h or 625 cmc/min in the myocardial parenchyma of the newborn rat pups. After birth a significant decrease in the rate of proliferative processes in the myocardial parenchyma is observed. at $t \rightarrow 15$ days, ΔN cmc/day > 0 . The formation of the 2nd cmc population in the myocardium of the complex (LV + IVF) begins from the 19th day of embryogenesis in rats. In the process of cardiomyogenesis (18 days before and 15 days after) the birth of rat pups as a result of polyploidy the number of 2nd cmc in the parenchyma (LV + IVF) increases 1000 times! (from 0.00144 to 1.44) $\times 10^7$ cmc. In the time interval t_e (15 – 45) days the digital values of the index N 2cmc \approx const \approx 1.44 $\times 10^7$ cmc. Therefore, after the completion of the postnatal period of cardiomyogenesis, the number of 2nd cmc does not change and amounts to \approx 94 – 95% of the total number of

myocytes in the myocardial parenchyma of the complex (LV + IVF). The most active polyploidy process of cmc occurs within 5 days after the birth of rat pups. The maximum speed of polyploidy of cmc is determined on the 5th day and is equal to 73×10^3 cmc/h or 1215 cmc/min.

Key words: rats, cardiomyogenesis, proliferation, polyploidy, cardiomyocytes, left ventricle + interventricular septum.

Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.
Стаття надійшла 21.02.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-75-79

УДК 546.881:678.048

Сушко О. О., Іскра Р. Я.

ВПЛИВ ЦИТРАТУ ВАНАДІЮ НА МАСУ ТІЛА, РІВЕНЬ ГЛЮКОЗИ В КРОВІ ТА АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ У ПЕЧІНЦІ ТА НИРКАХ ЩУРІВ ІЗ АЛОКСАНОВИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Інститут біології тварин НААН (м. Львів)

sushko.ola@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження виконувалися відповідно до завдання програми наукових досліджень НААН 35.00.01.02 Ф «Вивчити біологічні особливості дії цитратів мікроелементів в різні періоди онтогенезу тварин», ДР № 0116U001407.

Вступ. Цукровий діабет (ЦД) – це група метаболічних захворювань, що характеризується гіперглікемією, яка є наслідком дефектів секреції та/або дії інсуліну. Захворювання характеризується хронічним перебігом і порушенням усіх видів обміну речовин: вуглеводного, ліпідного, протеїнового, мінерального і водно-сольового. У даний час хворих на ЦД у світі налічується близько 400 мільйонів, і очікується, що їх кількість зросте до 550 мільйонів у 2030 році [1].

Лікування ЦД інсуліном спрямоване на максимальну можливу компенсацію вуглеводного обміну, запобігання гіпо- і гіперглікемії. Використання інсуліну перорально унеможливується через деградацію пептиду у кишково-шлунковому тракті, саме тому використовують його лише шляхом ін'єкції. Такий засіб для лікування ЦД є дорогим, болісним та непрактичним. Тому виникла потреба у пошуку речовин, які будуть інсуліновими імітаторами та які можна використовувати перорально. Є ряд іонів металів, яким властиві інсулін-подібні властивості: V(IV, V), Cr(III), Mo(VI), Mn(II), W(VI), Se(V), Zn(II) [2].

Сьогодні цікавим матеріалом для досліджень у всьому світі стала інсуліноподібна властивість Ванадію та його використання в якості терапевтичного засобу для профілактики та лікування ЦД. Як відомо, Ванадій виступає необхідним мікроелементом для нормального клітинного функціонування та розвитку організму. Механізм дії інсулінсенсibiliзуючих ефектів Ванадію пов'язаний з інгібуванням тирозинфосфатази [3]. Інгібування цього протеїну відіграє ключову роль у негативній регуляції сигнальних шляхів, опосередкованих рецепторами інсуліну і лептину, що відповідно регулює чутливість до інсуліну. Це ідеальна фармацевтична мішень при лікуванні ЦД та ожиріння.

Підвищений оксидативний стрес відіграє важливу патогенну роль у розвитку та прогресуванні діабету та його ускладнень [4]. Постійна гіперглікемія призводить до збільшення виробництва вільних радикалів за допомогою автоокиснення глюкози та неензиматичного глікозилювання протеїнів [5]. Активні

форми Оксигену (АФО) модифікують ліпіди, вуглеводи, протеїни та нуклеїнові кислоти і реагують з ними, а це у свою чергу призводить до цитотоксичності і дисфункції.

Рівень АФО контролюються антиоксидантними ензимами, тому антиоксидантний захист у печінці та нирках виступає важливим фактором перебігу діабетичних ускладнень в цих органах.

Мета досліджень. Встановити вплив різних кількостей цитрату ванадію на масу тіла, рівень глюкози в крові та активність про/антиоксидантної системи у печінці та нирках щурів із алоксановим цукровим діабетом.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проведено на 40 білих лабораторних щурах, які перебували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН (12 год цикл світло/темрява). Всі тварини були клінічно здорові, отримували стандартний гранульований корм для лабораторних щурів, був вільний доступ до води. Щури масою тіла від 100 до 120 г, розділені на п'ять груп: I група – контрольна; II, III, IV, V – дослідні групи. Тварини контрольної групи утримувалися в тих же умовах, що і тварини дослідних груп. Дослідним щурам II групи давали пити чисту воду без добавок, а тваринам III, IV, V груп протягом місяця до питної води додавали розчин цитрату ванадію в дозах 0,125, 0,5 і 2,0 мкг V/мл води. У тварин II, III, IV, V дослідних груп на тлі 24-ох годинного голодування був викликаний експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) шляхом внутрішньоочередового введення 5% розчину моногідрату алоксану ("Синбіас") у кількості 150 мг/кг маси тіла. Гіперглікемію виявляли шляхом вимірювання глюкози крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра ("Gamma-M"). Динаміку зміни рівня глюкози проводили натще перед початком закладання досліду та впродовж експерименту, а також продовжували вимірювання після ін'єкції алоксану на 32-, 36- і 40-у доби. Рівень глюкози в крові більше 11,1 ммоль/л у щурів був прийнятий як успішна індукція цукрового діабету. Щурам I групи вводили 0,9% фізіологічний розчин у кількості відповідній алоксану.

На 40 добу досліджень тварин виводили з експерименту шляхом забиття за введення тіопенталу натрію. Експерименти на тваринах проводилися відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для