

Пороговый ответ кардиомиоцитов неонатальных крыс на постепенное усиление криптоспоридиозной инвазии

© О. В. Анацкая,¹ Н. В. Сидоренко, И. В. Матвеев, А. В. Кропотов,
М. В. Харченко, А. Е. Виноградов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: anatskaya@cytspb.rssi.ru

Одной из частых причин избыточной нагрузки на сердце у детей являются инфекционные гастроэнтериты, вызывающие мальабсорбцию и тахикардию. Наши недавние исследования показали, что неонатальный криптоспоридиозный гастроэнтерит вызывает долговременную патологию кардиомиоцитов. В настоящей работе исследовали, как криптоспоридиоз разной степени тяжести отражается на анатомии сердца, полиплоидизации и ремоделировании кардиомиоцитов неонатальных крыс, а также на экспрессии в них гена, кодирующего фактор, чувствительный к гипоксии (*HIF-1α*). Методами ПЦР в реальном времени, цитометрии, иммуноцитохимии, анализа изображений и визуального исследования межпредсердной перегородки мы установили, что постепенное усиление заражения криптоспоридиозом сопровождается пороговыми изменениями в сердце. При слабом заражении межпредсердная перегородка сохраняет целостность, а изменения в кардиомиоцитах отсутствуют. При среднем и сильном заражении изменения выражены примерно одинаково: в межпредсердной перегородке появляется овальное окно, сердце атрофируется и удлиняется, а кардиомиоциты теряют белок, истончаются и становятся гиперполиплоидными. Кроме этого, возникает избыточный уровень мРНК гена *HIF-1α* в миокарде. Важно отметить, что пороговый ответ на постепенное усиление воздействия является критерием запуска онтогенетического программирования сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку в основе такого ответа часто находится необратимое нарушение анатомии органа и сбой дифференцировки клеток. В нашем случае нарушением анатомии сердца является овальное окно в межпредсердной перегородке, а нарушением дифференцировки — гиперполиплоидизация кардиомиоцитов. Наши данные могут быть интересны медикам, поскольку впервые показывают связь между гастроэнтеритом, нарушением целостности межпредсердной перегородки и патологическими изменениями в кардиомиоцитах.

Ключевые слова: неонатальные кардиомиоциты, полиплоидия, ремоделирование, криптоспоридиозный гастроэнтерит, межпредсердная перегородка, овальное окно, *HIF-1α*, онтогенетическое программирование.

Многочисленные эпидемиологические исследования свидетельствуют о важности условий для раннего постнатального роста человека и его долговременного здоровья и продолжительности жизни (Hochberg, 2009; Barouki et al., 2012). Эта зависимость была названа онтогенетическим программированием (Barker et al., 1989). Показано, что онтогенетическое программирование запускается в периоды высокой биологической пластичности, когда генотип может дать начало максимальному числу фенотипов (Hochberg, 2009). Как правило, это периоды быстрого формирования и роста, совпадающие со сменой фаз жизненного цикла, например переходы от младенчества к детству, от детства к отрочеству и от отрочества к юности (Hochberg, 2009; Barouki et al., 2012).

Известно, что наиболее сильно на онтогенетическое программирование вовлечена сердечно-сосудистая система. Показано, что ишемическая болезнь сердца, гипертония и даже инфаркт миокарда в значительной степени происходят из-за замедления роста, недостаточного питания и воспалительных процессов в детстве (Barker et al., 1989). Эпигенетические механизмы и физиологические триггеры этого явления до конца неясны. Одним из пло-

дотворных подходов к решению этих вопросов могут быть экспериментальные исследования на основе данных межвидового изучения особенностей фаз жизненного цикла и функциональных возможностей сердца, поскольку такие данные позволяют более точно выявить внутривидовые различия и помогают правильно определить направление экспериментальных исследований (Whitehead, Crawford, 2006).

Наши сравнительные исследования, проведенные почти на 100 видах млекопитающих и птиц, показали, что скорость постнатального роста и степень зрелости при появлении на свет (птенцовость и выводковость) оказывают влияние на функциональный потенциал сердца взрослых особей (Anatskaya et al., 2001; Anatskaya, Vinogradov, 2002, 2004). В частности, было показано, что выводковые млекопитающие и птицы обладают меньшей аэробной способностью сердца и более высокой плоидностью кардиомиоцитов (маркер стресса) по сравнению с птенцовыми равной массы. Известно, что выводковых с первых минут жизни отличают самостоятельность, медленный рост и высокая подвижность. Для птенцовых, напротив, характерны беспомощность, быстрый рост и поч-

ти полное отсутствие подвижности в течение всего периода активного роста. Различия в подвижности и скорости роста означают, что «слабое» сердце выводковых формируется в условиях большей функциональной нагрузки и меньшей обеспеченности ресурсами, чем «сильное» сердце птенцовых. Эти данные хорошо согласуются с теорией раннего происхождения сердечно-сосудистых заболеваний взрослых людей (Barker et al., 1989) и побуждают к поиску новых факторов патологической гиперфункции растущего сердца и онтогенетического программирования сердечно-сосудистых заболеваний.

Основываясь на данных медицинской статистики о том, что наиболее частой причиной недомоганий у детей являются гастроэнтериты, сопровождаемые воспалением, тахикардией, ионным дисбалансом и замедлением роста (Curione et al., 2010; Finch, 2010), мы предположили, что инфекционный гастроэнтерит может быть одним из важных факторов патогнеза и онтогенетического программирования сердечно-сосудистых заболеваний взрослых людей. Наши недавние исследования показали что неонатальный криптоспориديозный гастроэнтерит, вызванный широко распространенным протозойным энтеропатогеном человека и животных *Cryptosporidium parvum* (Бейер и др., 2006), приводит к долговременной гиперполиплоидизации кардиомиоцитов и к избыточной экспрессии тяжелой цепи β -миозина (медленного) в ткани левого желудочка сердца неонатальных крыс (Анацкая и др., 2010, 2011, 2012; Anatskaya et al., 2010).

В настоящей работе основное внимание было уделено изучению ответа кардиомиоцитов и сердца неонатальных крыс на постепенное усиление криптоспоридиозной инфекции. В частности, мы оценили относительную массу и форму сердца, которые отражают объем сердечного выброса, а также силу и частоту сердечных сокращений (Bishop, 1999). Наличие овального окна в межпредсердной перегородке является признаком нарушения анатомии сердца (Macdonald, Johnstone, 1995; Calvert et al., 2011). Известно, что овальное окно возникает вследствие нарушения гемодинамики, воспалительных процессов и замедления роста (Kutty et al., 2012). Позволяя смешиваться венозной и артериальной крови, овальное окно приводит к гипоксии, повышенному риску мигреней с аурой и тромбообразования в мозге (Calvert et al., 2011; Kutty et al., 2012). Клинические исследования свидетельствуют о том, что овальное окно существует примерно у 50 % детей до 7 лет и у 25—30 % взрослых людей (Calvert et al., 2011; Kutty et al., 2012). Также мы оценили плоидность кардиомиоцитов и уровень мРНК гена, кодирующего фактор, чувствительный к гипоксии (*HIF-1 α*), которые характеризуют выраженность ответа на стресс и гипоксию (Мартынова и др., 1983; Ерохина и др., 1997; Davoli, de Lange, 2011; Semenza, 2012). Содержание общего белка и отношение длины кардиомиоцитов к ширине отражают их сократительную способность, поскольку длина клеток пропорциональна объему желудочка, ширина — толщине его стенки, а содержание белка — количеству сократительных белков (Shlüter et al., 1995; Li et al., 2004; Chen et al., 2010).

Задачей настоящей работы было выяснить, как криптоспоридиоз слабой, средней и сильной тяжести отражается на анатомической структуре сердца и на морфофункциональных свойствах кардиомиоцитов 10-суточных крыс, перенесших заболевание в 6—10-суточном возрасте. Известно, что у неонатальных крыс криптоспоридиоз полностью самоизлечивается через 4 сут после зараже-

ния. Поэтому можно считать, что мы исследовали немедленные изменения в кардиомиоцитах и сердце у только что переболевших животных.

Материал и методика

Получение ооцист *Cryptosporidium parvum* и заражение животных. Ооцисты криптоспоридий получали от 7—14-суточных телят из животноводческих ферм Ленинградской обл. по методу, описанному ранее (Анацкая и др., 2011). Экспериментальный криптоспоридиозный гастроэнтерит индуцировали у 5-суточных крыс путем перорального введения 0.2 мл раствора PBS, содержащего $2 \cdot 10^5$ ооцист *C. parvum*. Контрольные животные получали такой же объем перфузата без паразитов. Степень заражения животных определяли на 5-е сут после перорального введения ооцист *C. parvum* на мазках содержимого кишечника, фиксированных метанолом и окрашенных 1%-ным водным раствором генциан-фиолетового в течение 1 с (Сидоренко и др., 2004). Для каждого животного анализировали по 30 полей зрения микроскопа (об. 40 $\times$, ок. 15 $\times$). Животные, мазки которых содержали в среднем 2—10 ооцист в 1 поле зрения, относили к слабозараженным, 11—20 ооцист — к среднезараженным и более 20 ооцист — к сильнозараженным.

При оценке изменений анатомии сердца, а также плоидности и ремоделирования кардиомиоцитов исследовали 46 животных, включая 12 слабо-, 12 средне-, 12 сильнозараженных и 10 контрольных. Для оценки уровня мРНК гена *HIF-1 α* методом ПЦР в реальном времени исследовали по 3 слабо-, средне- и сильнозараженных и по 3 контрольных животных. Всего исследовано 58 животных.

Все крысы были помечены и взвешены в день заражения и в день эксперимента, т. е. на 5-е сут после заражения, в возрасте 10 сут. Эвтаназию осуществляли методом хлороформной анестезии с последующей асфиксией. Сердца извлекали и взвешивали без крови.

Анатомические характеристики сердца. Для того чтобы понять, как меняется функциональный потенциал сердца, мы определяли отношение массы сердца к массе тела (индекс сердца, %), а также отношение его длины к ширине. Хотя этот метод не позволяет оценить все необходимые характеристики (включая артериальное давление), он приобретает все большее распространение, поскольку отражает изменения интенсивности метаболизма, объема сердечного выброса, а также силы и частоты сердечных сокращений (Bishop, 1999). Отношение длины сердца к его ширине оценивали на электронных изображениях целых сердец. Кроме того, мы исследовали состояние межпредсердной перегородки на предмет существования в ней овального окна. Для этой цели мы разрезали сердца бритвой по середине во фронтальном направлении, так чтобы были четко видны левая и правая части. Овальное окно можно было наблюдать в виде остаточного узкого тоннеля, покрытого валиком ткани, между правым и левым предсердиями (Macdonald, Johnstone 1995; Calvert et al., 2011). Для более наглядной демонстрации при фотографировании в тоннель овального окна вводили посторонний предмет — иглу шприца или пинцет. Такой метод считают общепринятой демонстрацией овального окна у экспериментальных животных и человека (Calvert et al., 2011).

Т а б л и ц а 1

Последовательности использованных праймеров

Ген	Последовательность	Температура плавления, °C
<i>β-актин</i>	Прямая: 5'-CCACACCCGCCACCAGTTCG-3'	64
	Обратная: 5'-ACATGCCGGAGCCGTTGTCTCG-3'	64
<i>GAPDH</i>	Прямая: 5'-GGGGGCTCTCTGCTCCTCCC-3'	66
	Обратная: 5'-CAGGCGTCCGATACGGCCAA-3'	63
<i>HIF-1α</i>	Прямая: 5'-CCCATCCATGTGACCATGAGG-3'	64
	Обратная: 5'-TCAGCACCAAGCACGTCATAGG-3'	64

Получение и исследование кардиомиоцитов. Изолированные кардиомиоциты получали из апикальной части левого желудочка методом щелочной диссоциации (Anatskaya, Vinogradov, 2004). Для этой цели кусочки, взятые из апикальной части левого желудочка, массой 25—30 мг фиксировали 10%-ным формальдегидом в течение 12 ч, промывали проточной водой в течение 24 ч и помещали на 25 мин в 50%-ный водный раствор КОН при 56 °C. После щелочной диссоциации кусочки ткани аккуратно промывали в 3 сменах дистиллированной воды и пипетировали в 10 мл дистиллированной воды до получения гомогенной суспензии. Концентрацию клеток и степень их повреждения оценивали с помощью фазово-контрастного микроскопа. Затем 5 капель суспензии помещали на предметное стекло, сушили на воздухе и фиксировали абсолютным метанолом. От каждого животного анализировали не менее 500 кардиомиоцитов.

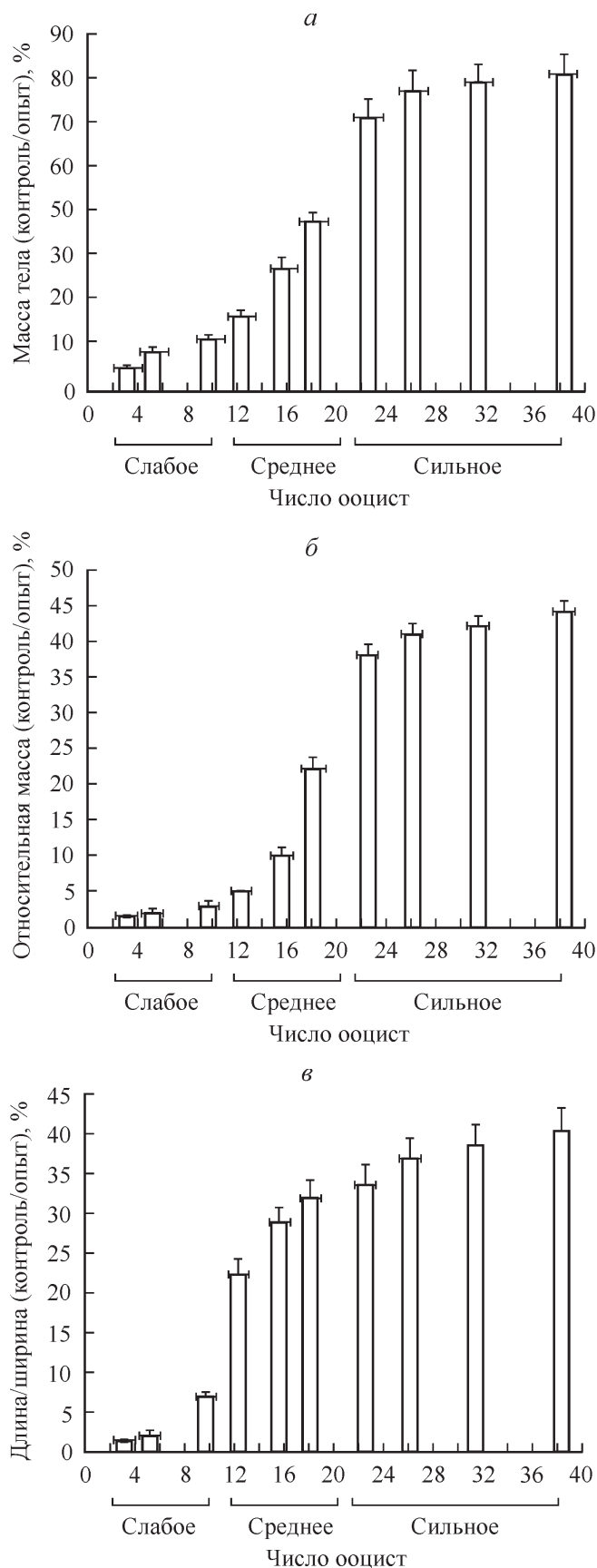
Плоидность клеток оценивали после окрашивания красителем Hoechst 33258 в концентрации 20 мкг/мл в течение 15 мин. Количественный анализ изображений, полученных с помощью микроскопа Zeiss Axioskop (Германия), снабженного видеокамерой VarioCam (PCO Computer Optics GMBH, Германия), осуществляли с использованием программы ImageJ 1.40g (National Institute of Health, Maryland, США). Изменение формы кардиомиоцитов (т. е. отношение их длины к ширине) оценивали с помощью той же программы. Средний уровень плоидности кардиомиоцитов рассчитывали по формуле $PLD = \Sigma i \cdot n_i$, где PLD — среднее число геномов на клетку, n_i — число кардиомиоцитов i -того класса плоидности. Эталонном диплоидного содержания ДНК служили спленоциты того же животного. Так как у 2-недельных крыс доля кардиомиоцитов в S-фазе составляет 1.5—2 % (Rumyantsev, 1977), мы исключали ядра с количеством ДНК, отличающимся от кратного эталонному более чем на 10 %, рассматривая их как находящиеся в S-фазе.

Для определения содержания белка в кардиомиоцитах мазки изолированных клеток окрашивали 0.1%-ным раствором нафтолового желтого в 1%-ной уксусной кислоте в течение 30 мин и промывали в трех сменах 1%-ной уксусной кислоты и в трех сменах 100%-ного изобутанола в течение 3 с при комнатной температуре (Анацкая и др., 2012). Содержание белка оценивали на изображениях кардиомиоцитов, полученных с помощью светового микроскопа Axio Scope (Carl Zeiss, Германия) и программы ImageJ 1.40g (National institute of health, Maryland, США). Для каждого животного оценивали не менее 200 клеток. Каждую клетку обрабатывали 3 раза по пара-

метру Mean Grey Value. Данные представлены в виде средних значений и их стандартной ошибки.

Тотальную РНК выделяли из замороженных фрагментов апикальной части левого желудочка сердца (массой 10—15 мг) с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией изготовителя или протоколом с использованием гуанидинтиоцианата (Chomczynski, Sacchi, 1987) в модификации И. В. Матвеева (Матвеев, 2005; Matveev et al., 2007). Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, содержащем 5 мкг/мл бромистого этидия в ТАЕ-буфере (Sambrook et al., 1989). Чистоту и сохранность РНК оценивали по четкости полос 18S и 28S рибосомальных РНК, наблюдаемых в ультрафиолетовом свете. Количество выделенной РНК оценивали спектрофотометрически по поглощению ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм (Sambrook et al., 1989). ДНК удаляли из препарата РНК, обрабатывая препарат ДНКазой, свободной от РНКазы. Каждая реакционная смесь объемом 40 мкл содержала около 10 мкг РНК и 1 ед. ДНКазы (DNase RNase-free; Roche-Boehringer-Mannheim, Франция). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь депротеинизировали фенол-хлороформом, РНК осаждали этанолом (Sambrook et al., 1989). Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию РНК с помощью набора реактивов для синтеза первой цепи кДНК Revert Aid™ (Fermentas, Литва). Качество синтезированной кДНК проверяли методом ПЦР. Образцы хранили при –20 °C.

Количественная оценка уровня мРНК гена *HIF-1α*. Праймеры конструировали с помощью программ Primer3 и Primer designing (NCBI, <http://primer3.sourceforge.net/releases.php>). Синтез праймеров заказывали в фирме Синтол (Санкт-Петербург). Последовательности праймеров показаны в табл. 1. Количественную оценку уровня транскрипции мРНК проводили с помощью системы ABI PRISMO 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, FosterCity, США) после проверки эффективности ПЦР. Эффективность оценивали с помощью построения калибровочных кривых для генов *HIF-1α*, *β-актина* и *глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH)* (Bustin et al., 2005). Для этой цели делали серию разведений мРНК, проводили обратную транскрипцию, а затем ПЦР в реальном времени (Bustin et al., 2005; Huggett et al., 2005). Полученные калибровочные кривые оказались практически параллельными для всех генов, что подтверждает примерно одинаковую эффективность ПЦР и позволяет применить метод ΔCt (Schmittgen, Livak, 2008) для оценки различий в экспрессии.



Реакционная смесь (25 мкл) содержала 0.5 мкл прямого праймера, 0.5 мкл обратного праймера, 1 мкл кДНК-матрицы и 10 мкл красителя Power SYBR green (Applied Biosystems, США). Каждую реакцию проводили 3 раза в следующих условиях: 5 мин при 95 °C (для активации ДНК-полимеразы), затем 50 циклов при 95 °C в течение 15 с, при 60 °C в течение 15 с и при 72 °C в течение 50 с. Уровни мРНК гена *HIF-1α* (NCBI Gene ID 29560) нормализовали по уровню мРНК генов домашнего хозяйства — β -актина (*AKTβ*, NCBI Gene ID 81822) и *GAPDH* (*GAPDH*, NCBI Gene ID 24383) с помощью метода ΔC_t (Schmittgen, Livak, 2008).

Статистика. Все различия анализировали с использованием непараметрического теста Манна—Уитни (критерий *U*). Различия считали достоверными при $P < 0.05$. На гистограммах показаны средние и их стандартные ошибки.

Результаты

Анатомические характеристики сердца. По сравнению со здоровыми животными зараженные особи характеризовались пониженной массой тела (рис. 1, а), снижением относительной массы сердца (рис. 1, б), а также деформацией сердца, которая выражалась в его удлинении и сужении (рис. 1, в). Из ступенчатого вида гистограмм следует, что при слабом заражении влияния криптоспориديоза на линейные размеры сердца не было, поскольку изменения на 5—10 %, видимые на рис. 1, а—в, были недостоверными. Следует, однако, отметить, что при увеличении выборки эти изменения могут проявиться (т. е. стать достоверными).

При среднем и сильном заражении изменения формы сердца были ярко выражены. Соотношение линейных размеров изменилось на 30—40 %. При этом гистограмма для массы тела (рис. 1, а) выглядела более пологой, чем гистограммы для относительной массы сердца и соотношения его линейных размеров (рис. 1, б, в), что позволяет предполагать меньшее влияние заболевания на рост животных, чем на функцию сердца. На рис. 2 показаны различия формы сердца у среднезараженного животного с числом ооцист 18.3 ± 1.9 в поле зрения микроскопа (рис. 2, а) и у контрольного животного такой же массы (рис. 2, б).

Исследование межпредсердной перегородки после фронтального разреза сердца показало, что у 10 контрольных и 12 слабозараженных животных перегородка была целостной. У 10 из 12 среднезараженных животных в перегородке было четко видно овальное окно, т. е. узкий (0.5—0.7 мм) тоннель (рис. 2, в, г), покрытый валиком ткани, что соответствует классическому описанию этой анатомической структуры (Macdonald, Johnstone, 1995). У всех 12 сильнозараженных животных овальное окно визуализировалось четко и составляло 0.6—1.1 мм в

Рис. 1. Снижение массы тела (а), атрофия (б) и удлинение сердца (в) у 10-суточных крыс после криптоспориديоза слабой, средней и сильной тяжести.

а — зависимость массы тела от интенсивности заражения; б — зависимость относительной массы сердца (в % от массы тела) от интенсивности заражения; в — увеличение отношения длины к ширине сердца. Ступенчатый вид гистограмм свидетельствует о резком усилении воздействия криптоспориديоза при переходе от слабой степени заражения к средней. Представлены средние значения и их статистические ошибки ($X \pm S_x$ и $Y \pm S_y$) для 3 животных.

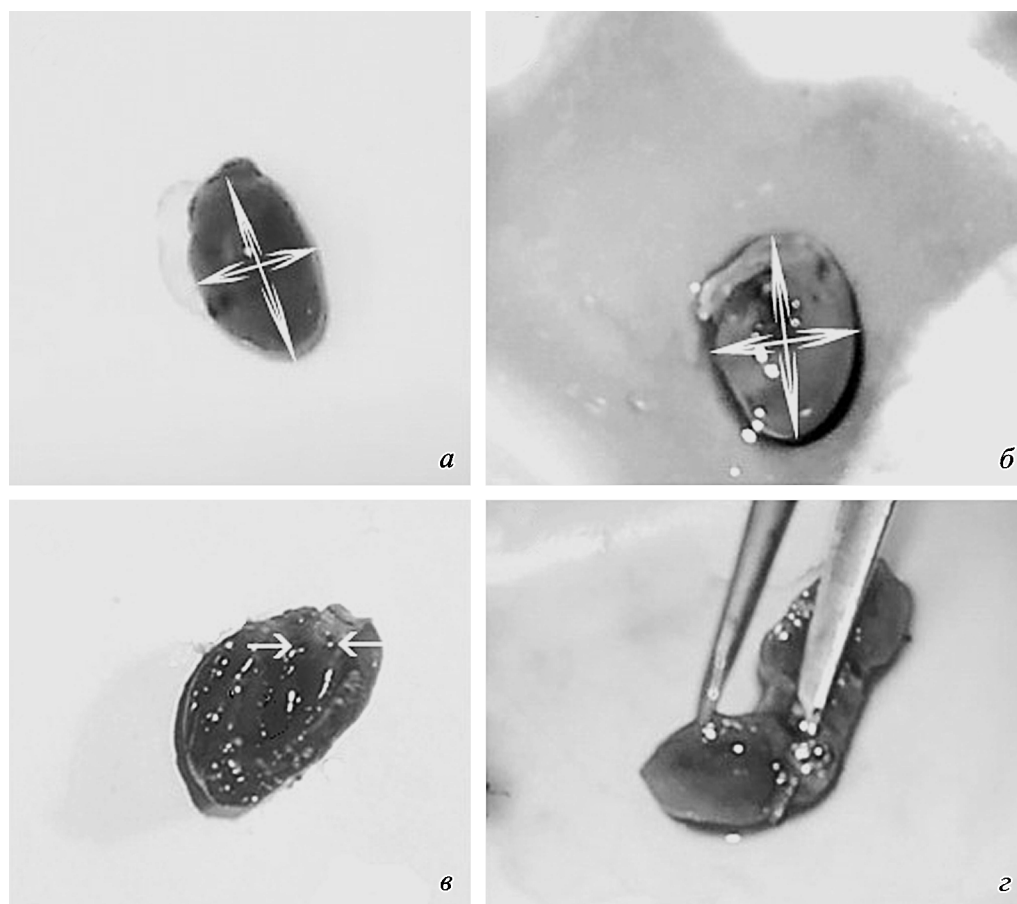


Рис. 2. Атрофия и сужение сердца (а, б), а также наличие овального окна в межпредсердной перегородке (в, з) 10-суточных крыс после криптоспоридиа средней и сильной тяжести.

а — сердце после криптоспоридиа средней тяжести (18.3 ± 1.9 ооцисты в поле зрения микроскопа); б — сердце контрольного животного; видно, что у переболевшего животного сердце сужено и удлинено по сравнению с контролем (стрелками показаны длинная и короткая оси сердца); в — овальное окно в межпредсердной перегородке после криптоспоридиа средней тяжести (15.6 ± 1.5 ооцисты в поле зрения); стрелками показаны углубления тоннеля овального окна; з — овальное окно в межпредсердной перегородке после криптоспоридиа сильной степени тяжести (22.5 ± 1.2 ооцисты в поле зрения микроскопа). Овальное окно показано с помощью пинцета.

диаметре (рис. 2, з). Для того чтобы овальное окно было более наглядным, мы расширили его с помощью пинцета. Полученные данные свидетельствуют о том, что неонатальный гастроэнтерит вызывает неполное сращение межпредсердной перегородки, приводящее к частичному смешиванию артериальной и венозной крови.

Уровни плоидности, содержание белка и ремоделирование формы кардиомиоцитов. Криптоспоридиоз слабой степени тяжести (3—10 ооцист в поле зрения микроскопа) не вызывал изменений соотношения клеток разной плоидности, среднего числа геномов на клетку, а также содержания белка и формы кардиомиоцитов, оцененной по отношению их линейных размеров (длина/ширина). Однако в табл. 2, на рис. 3, а—в и 4 видны тенденции к увеличению доли тетраплоидных клеток и повышению их средней плоидности, а на рис. 5, б и 6, а—в — к снижению содержания общего белка, белка в расчете на $2n$ и к удлинению клеток, которые при увеличении выборки экспериментальных животных могут стать достоверными.

Криптоспоридиоз средней степени тяжести (10—20 ооцист в поле зрения микроскопа) вызывал неожиданно резкие изменения исследуемых параметров. Средняя плоидность клеток у зараженных животных уве-

личилась до $4.55 \pm 0.12 n$, варьируя в пределах от $4.43 n$ в случае 9.7 ± 0.82 ооцисты до $4.68 n$ в случае 18.3 ± 0.82 ооцисты в поле зрения микроскопа, что на 24.5—31.4 % выше, чем у контрольных животных ($3.56 \pm 0.13 n$; табл. 2; рис. 3, а, б, з и 4). Увеличение произошло благодаря скачкообразному (примерно на 15 %) росту доли кардиомиоцитов с тетраплоидными ядрами и появлению клеток с октаплоидными ядрами, отсутствующими в контроле (табл. 2; рис. 3, з; 4). Отношение длины к ширине кардиомиоцитов увеличилось в 1.5—1.6 раза (рис. 5, в; 6, а), а содержание общего белка и белка в расчете на $2n$, наоборот, понизилось на 17—26 и 42—79 % соответственно (рис. 5, в; 6, б, в).

Активация криптоспоридиозной инвазии от средней до сильной (больше 20 ооцист в поле зрения микроскопа) не привела к кардинальным изменениям (табл. 2; рис. 3, д; 4). По сравнению со средним заражением наблюдалось лишь небольшое увеличение средней плоидности клеток, которая составила $4.86 \pm 0.15 n$, варьируя от $4.75 \pm 0.19 n$ в случае 22.5 ± 1.5 ооцисты до $4.98 \pm 0.18 n$ в случае 38.3 ± 2.1 ооцисты в поле зрения микроскопа. Также мы выявили небольшое увеличение доли клеток с двумя октаплоидными ядрами (на 0.3—1.0 %). Отношение длины кардиомиоцитов к ширине уве-

Т а б л и ц а 2

Процентное соотношение кардиомиоцитов разных классов плоидности					
Число ооцист	Число животных	Классы плоидности кардиомиоцитов			
		2n	(2n · 2) + (4n)	(2n · 4) + (4n · 2)	8n + (8n · 2) + 16n
Контроль					
0	6	22.2 ± 0.9	78.7 ± 3.2	—	—
Слабое заражение					
3.1 ± 0.52	3	19.3 ± 1.6	81.7 ± 3.8	1.0 ± 0.2	—
5.2 ± 0.45	3	16.5 ± 1.5	78.9 ± 3.1	4.6 ± 0.5	—
9.7 ± 0.82	3	15.7 ± 1.3	79.0 ± 3.7	6.3 ± 1.3	—
Среднее заражение					
12.3 ± 1.1	3	14.3 ± 1.4	67.7 ± 3.2	18.0 ± 0.5	—
15.6 ± 0.8	3	11.2 ± 1.2	70.3 ± 2.3	18.5 ± 1.2	—
18.3 ± 1.9	3	10.7 ± 1.3	68.0 ± 2.7	21.0 ± 1.3	0.3 ± 0.01
Сильное заражение					
22.5 ± 1.5	3	11.3 ± 1.1	67.7 ± 2.1	21.1 ± 1.2	0.3 ± 0.01
26.1 ± 1.2	3	9.0 ± 1.0	68.0 ± 3.1	21.3 ± 1.2	0.7 ± 0.02
31.4 ± 1.6	3	7.3 ± 0.5	68.1 ± 2.8	23.2 ± 1.0	0.7 ± 0.01
38.3 ± 2.1	3	6.7 ± 0.7	70.3 ± 3.2	24.0 ± 1.2	1.0 ± 0.02

Примечание. Даны средние значения и их статистические ошибки (X ± S_x).

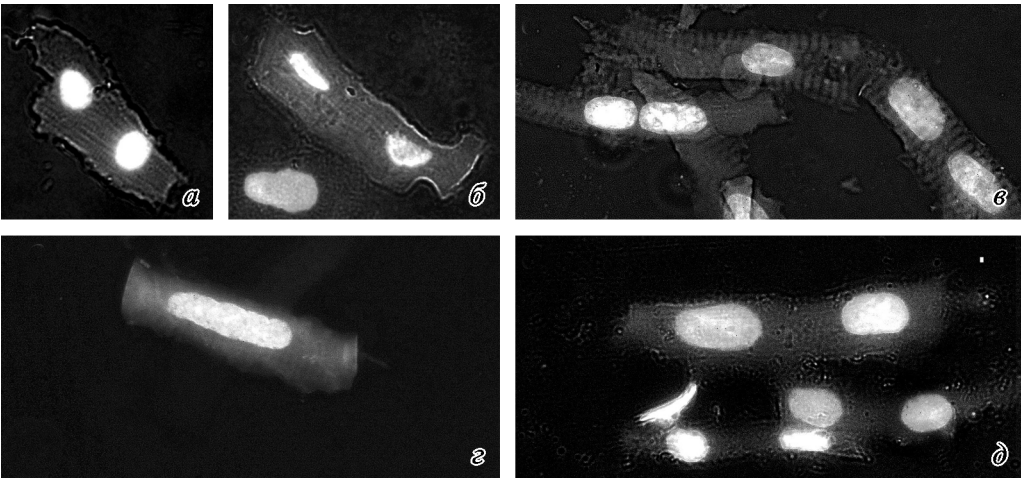


Рис. 3. Избыточная полиплоидизация кардиомиоцитов 10-суточных крыс после криптоспориоза разной степени тяжести. а, б — кардиомиоциты контрольного животного; виды клетки с диплоидными ядрами; в — кардиомиоциты слабозараженного животного с тетраплоидными и диплоидными ядрами; г — кардиомиоцит среднезараженного животного с октаплоидным ядром; д — кардиомиоциты сильнозараженного животного с октаплоидными, тетраплоидными и диплоидными ядрами; видно, что по сравнению с контролем у среднезараженных (в) и сильнозараженных (г) животных менее развита цитоплазма и более вытянутая форма клеток. Окраска ядер красителем Hoechst 33258, фазовый контраст. Об. 40×.

личилось, а содержание общего белка и белка в расчете на 2n уменьшилось всего на несколько процентов (рис. 5, г; 6, а—в). Однако по сравнению с контролем все различия достигали уже 40—80 % (табл. 2; рис. 3, д; 4; 5, г; 6, а—в).
Оценка уровня мРНК *HIF-1α* методом ПЦР в реальном времени с использованием двух внутренних контролей показала, что криптоспориоз слабой степени тяжести не вызывает изменений количества мРНК *HIF-1α* (рис. 7, а—в). Заражение средней тяжести приве-

ло к скачкообразному подъему уровня мРНК. В варианте эксперимента, когда внутренним контролем служила мРНК гена *глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы*, уровень мРНК гена *HIF-1α* увеличился на 29.4 ± 2.3 %, а когда мРНК гена *β-актина* — на 43.8 ± 4.5 % (рис.7, а—в). При сильном заражении уровень мРНК гена *HIF-1α* продолжал слабо расти, так что различия между контролем и опытом составили уже 32.5 ± 3.7 и 46.2 ± 4.7 % в случае гена *глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы* и гена *β-актина* соответственно (рис. 7, а—в).

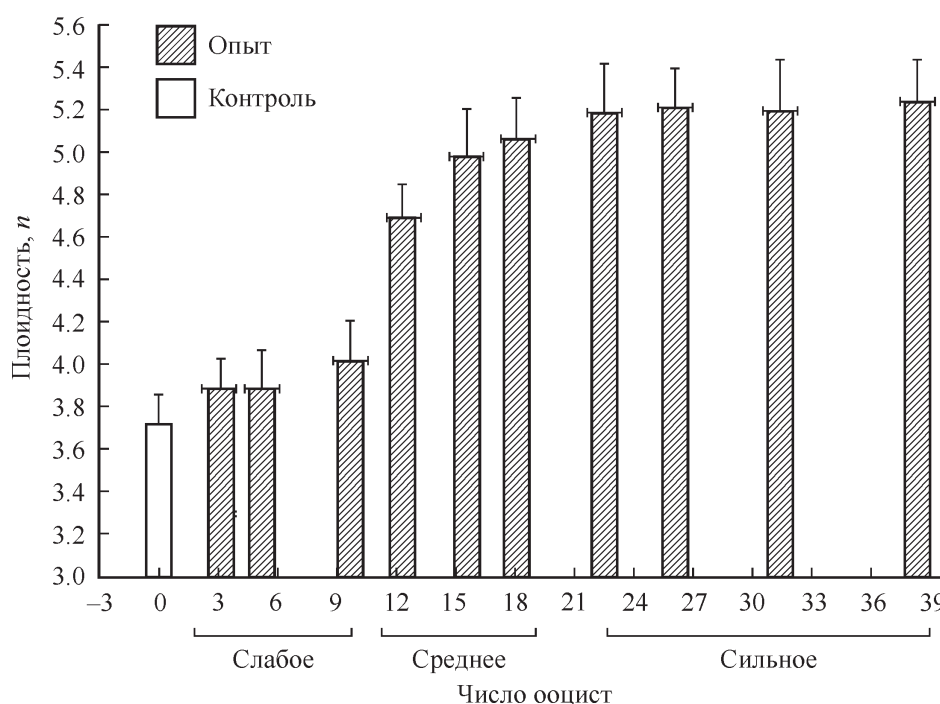


Рис. 4. Увеличение средней плоидности кардиомиоцитов 10-суточных крыс после криптоспоридиозного гастроэнтерита слабой, средней и сильной тяжести.

Ступенчатый вид дозозависимой кривой свидетельствует о резком усилении воздействия заболевания при переходе от слабого заражения к среднему. Представлены средние значения и их статистические ошибки ($X \pm S_x$ и $Y \pm S_y$) для 3 животных.

Обсуждение

Результаты настоящей работы показали, что постепенное увеличение интенсивности заражения кишечным криптоспоридиозом сопровождается резкими изменениями в сердце неонатальных крыс на органном, клеточном и молекулярном уровнях. Вместо ожидаемого дозозависимого ответа мы зарегистрировали реакцию, соответствующую закономерности «все или ничего». Ступенчатые изменения анатомических характеристик сердца, плоидности кардиомиоцитов, содержания в них общего белка и линейных размеров, а также уровня экспрессии *HIF-1α* происходили при переходе от слабого заражения к среднему.

Причины найденного явления пока неясны. Очевидно только то, что ответ «все или ничего» может быть следствием перестроек в разных физиологических и даже анатомических процессах. Тем не менее некоторые предположения можно сделать уже сейчас. Результаты сравнительно-онтогенетических исследований млекопитающих и человека свидетельствуют о том, что ответ «все или ничего» характерен для пренатального и раннего постнатального периодов, поскольку в это время происходят стремительное и необратимое формирование органов и дифференцировка клеток (Hochberg, 2009; Barouki et al., 2012). Поэтому даже слабые патологические стимулы могут привести к фатальному нарушению анатомических структур и сбоем дифференцировки клеток, а значит, к возникновению онтогенетического программирования сердечно-сосудистых заболеваний (Hochberg, 2009; Barouki et al., 2012).

Наши исследования были проведены на 10-суточных крысах, зараженных ооцистами криптоспоридий в 6-суточном возрасте. В это время, т. е. в конце 1-й и начале

2-й нед после рождения, у грызунов происходит не только становление энергетического обмена и окончательная дифференцировка кардиомиоцитов (Rumyantsev, 1977; Anatskaya et al., 2010), но и закрывается овальное окно в межпредсердной перегородке, предотвращая смешивание крови из малого и большого кругов кровообращения (Cole-Jeffrey et al., 2012). У человека в норме этот процесс происходит в течение первых (1—2) лет жизни (Calvert et al., 2011).

По нашим данным, с неонатальным криптоспоридиозом связаны замедление роста, воспаление, анатомические изменения сердца, которые могут нарушать нормальную гемодинамику (атрофия и деформация), а значит, способствовать неполному затягиванию овального окна. По этой причине можно считать, что обнаруженное нами овальное окно у 10 — суточных крысят, перенесших криптоспоридиозный гастроэнтерит, — явление вполне закономерное. Наличие овального окна у животных, перенесших криптоспоридиоз средней и сильной тяжести, и его отсутствие у слабозараженных животных, а также соответствие найденной анатомической структуры той, что была описана ранее у 16 видов млекопитающих и человека (т. е. короткого тоннеля, покрытого валиком ткани; Macdonald, Johnstone et al., 2012), служат в пользу нашего предположения.

Заметим, что воздействие криптоспоридиоза в соответствии с законом «все или ничего» мы регистрировали и ранее при изучении изменений в гепатоцитах крыс (Сидоренко и др., 2004; Бейер и др., 2006; Anatskaya et al., 2007). Особенно ярко этот эффект проявлялся в отношении гликогена (Сидоренко и др., 2004). Тогда этому явлению объяснений найдено не было. Возможно, потеря гликогена происходила тоже из-за овального окна в межпредсердной перегородке, которое вызывало гипоксию,

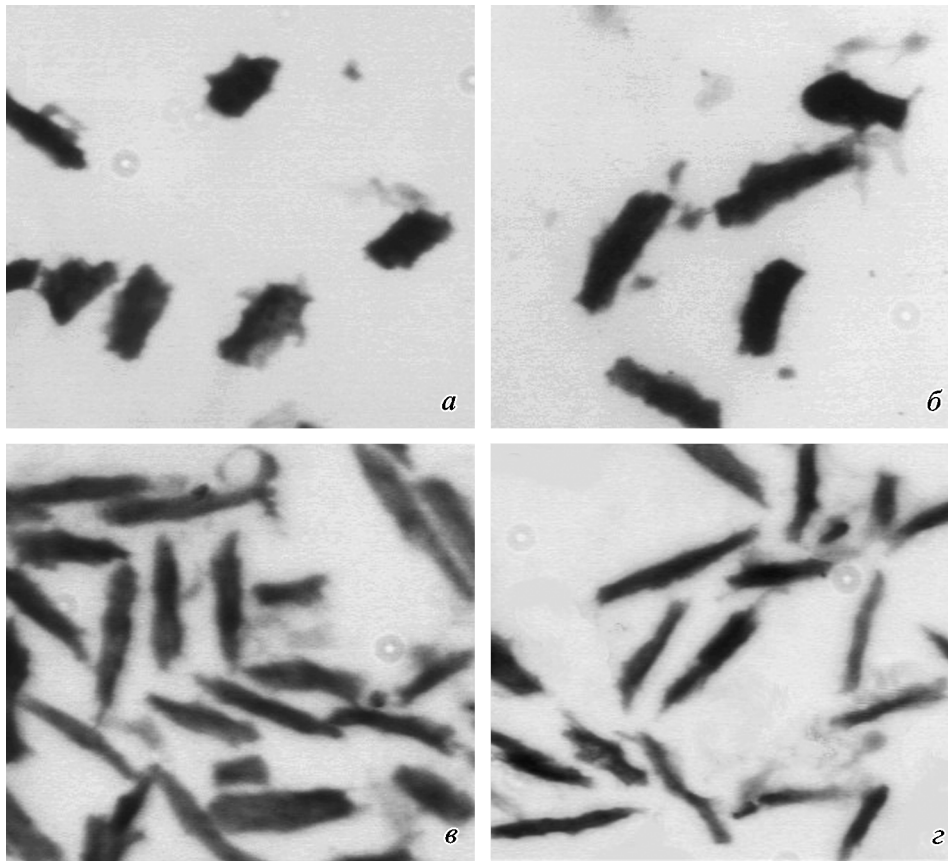


Рис. 5. Ремоделирование кардиомиоцитов 10-суточных крыс после криптоспориديоза слабой, средней и сильной тяжести.

а — кардиомиоциты контрольного животного, имеющие почти прямоугольную форму и большое количество цитоплазмы; *б* — кардиомиоциты слабо зараженного животного; видно, что форма клеток и интенсивность окрашивания цитоплазмы практически такие же, как у контрольного животного; *в* — кардиомиоциты среднезараженного животного (15.6 ± 0.8 ооцисты в поле зрения); видно, что клетки заметно атрофированы и истончены; *г* — кардиомиоциты сильно зараженного животного (22.5 ± 1.5 ооцисты в поле зрения); видно, что атрофия и истончение клеток выражены лишь незначительно сильнее, чем при среднем заражении. Окраска нафтоловым желтым, проходящий свет. Об. 40 $\times$.

стимулирующую распад этого вещества (Villalobos-Molina et al., 1998). Хорошая согласованность данных для сердца и печени подтверждает, что эффект «все или ничего» является отличительной особенностью криптоспоридиоза.

Изменения в кардиомиоцитах тоже соответствуют закономерности «все или ничего» и свидетельствуют о взаимосвязи между криптоспоридиозом и снижением сократительной способности сердца. Избыточная полиплоидизация, атрофия и истончение кардиомиоцитов приводят к тому, что цитоплазма, которая в клетках здоровых животных заполнена миофибриллами, в клетках переболевших особей вместо миофибрилл содержит дополнительные или увеличенные ядра. В результате содержание сократительных белков в расчете на диплоидный геном падает почти в 2 раза, а значительная часть энергии АТФ используется не на мышечное сокращение, а на поддержание дополнительных геномов. Такое перераспределение может приводить к большому перерасходу энергии, поскольку каждое удвоение геномов требует примерно 7-кратной затраты АТФ (Wagner, 2005). Подтверждением энергетического дефицита при криптоспоридиозе могут быть ступенчатое повышение экспрессии мРНК гена *HIF-1 α* , обнаруженное в настоящей работе, и замещение тяжелой цепи α -миозина на тяжелую цепь β -миозина, найденную нами ранее, которая в 5 раз более экономична и менее эффективна (Анацкая и др., 2011).

Важно отметить, что комплекс изменений в кардиомиоцитах, вызванный криптоспоридиозом, характерен для многих патологий сердца. Удлинение, сужение и гиперполиплоидизация клеток часто сопровождают гипертонию, инфаркт миокарда, ишемическую болезнь сердца, тахикардию и некоторые врожденные патологии, связанные с перегрузкой сердца (Мартынова и др., 1983; Ruyantsev et al., 1990; Erokhina et al., 1992; Erokhina и др., 1997; Chen et al., 2010). Повышение уровня мРНК гена *HIF-1 α* в кардиомиоцитах характерно для длительной (более 1 сут) гипоксии, связанной с ишемией, тахикардией или атрофией сердца (Görlach, 2009). И хотя найденные нами различия в экспрессии *HIF-1 α* между больными и здоровыми животными составляют всего 8–46 % (в зависимости от интенсивности заражения), они все же могут быть существенными, потому что транскрипционные факторы экспрессируются слабо и присутствуют в клетках в количестве всего нескольких сотен или даже нескольких десятков молекул (Ideker et al., 2011). Это означает, что относительно небольшое колебание экспрессии мРНК *HIF-1 α* может привести к дисрегуляции почти 200 его генов-мишеней (Semenza, 2012).

В целом результаты нашей работы показали, что неонатальный криптоспоридиозный гастроэнтерит начиная уже со средней степени тяжести может представлять опасность для формирующегося сердца. Реакция «все

или ничего» на органном и клеточном уровнях в ответ на постепенное усиление заражения подтверждает, что заболевание может быть ранним триггером отдаленных дисфункций сердца, поскольку именно такой тип реакции эксперты считают важным критерием (вместе с наличием чувствительного периода и долговременных изменений) онтогенетического программирования (Hochberg et al., 2009). Это связано с тем, что в основе ответа «все или ничего», как правило, находятся необратимое нарушение формирования анатомических структур и сбой дифференцировки клеток (Hochberg et al., 2009). В нашем случае такой анатомической структурой является межпредсердная перегородка, которая при слабом гастроэнтерите зарастает полностью, а при среднем и сильном — лишь частично, образуя овальное окно. Проявлением сбоя дифференцировки клеток является избыточная полиплоидизация, которая необратима, связана с усилением ответа на стресс, дополнительными энергетическими затратами и снижением функциональных возможностей клеток и органов (Anatskaya et al., 2007; Davoli, de Lange, 2011).

Наши данные могут быть интересны медикам, поскольку показывают важную роль гастроэнтерита в онтогенетическом программировании повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний и впервые демонстрируют взаимосвязь между незатянутым овальным окном в межпредсердной перегородке и патологическими изменениями в кардиомиоцитах. Учитывая, что гастроэнтерит является самой распространенной причиной недомоганий у детей, а овальное окно — самым частым анатомическим дефектом раннего постнатального сердца, мы надеемся, что представленные данные смогут помочь в разработке мер по предотвращению неонатального программирования повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Авторы благодарны за ценные замечания и полезное обсуждение И. А. Гамалей и М. Г. Мартыновой.

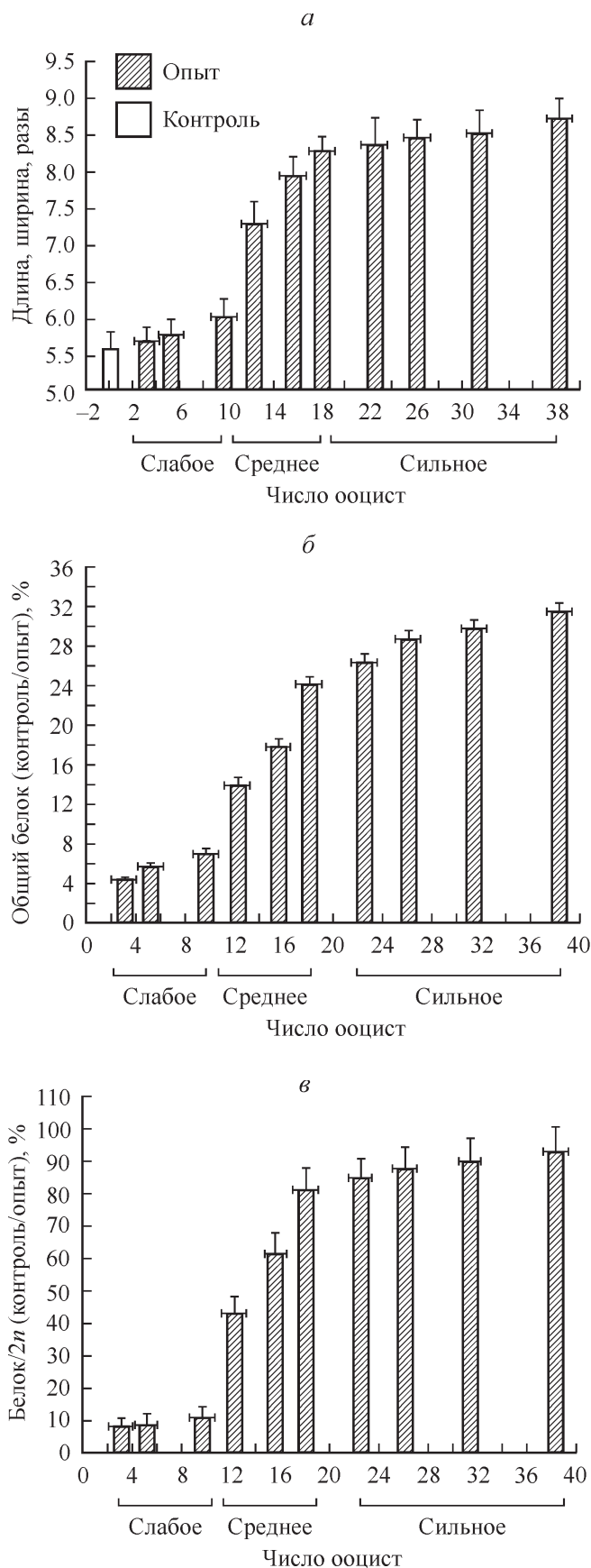
Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01199-а), программы президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций», а также Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8306).

Список литературы

Анацкая О. В., Матвеев И. В., Сидоренко Н. В., Храченко М. В., Кропотов А. В., Виноградов А. Е. 2011. Ремоделирование кардиомиоцитов крысы после неонатального крипто-

Рис. 6. Удлинение, сужение и атрофия кардиомиоцитов 10-суточных крыс после криптоспоридиа разной степени тяжести.

а — линейные параметры кардиомиоцитов; видно, что после криптоспоридиа отношение длины к ширине клеток возрастает; б — отношение содержания общего белка в кардиомиоцитах контрольных и переболевших животных; в — отношение содержания белка в расчете на $2n$ в кардиомиоцитах контрольных и переболевших животных. На рисунках б и в видно, что при криптоспоридиае клетки атрофированы. На всех рисунках четко видна ступенчатая реакция кардиомиоцитов, соответствующая закономерности «все или ничего», в ответ на постепенное усиление интенсивности паразитической нагрузки. Представлены средние значения и их статистические ошибки ($X \pm S_x$ и $Y \pm S_y$) для 3 животных.



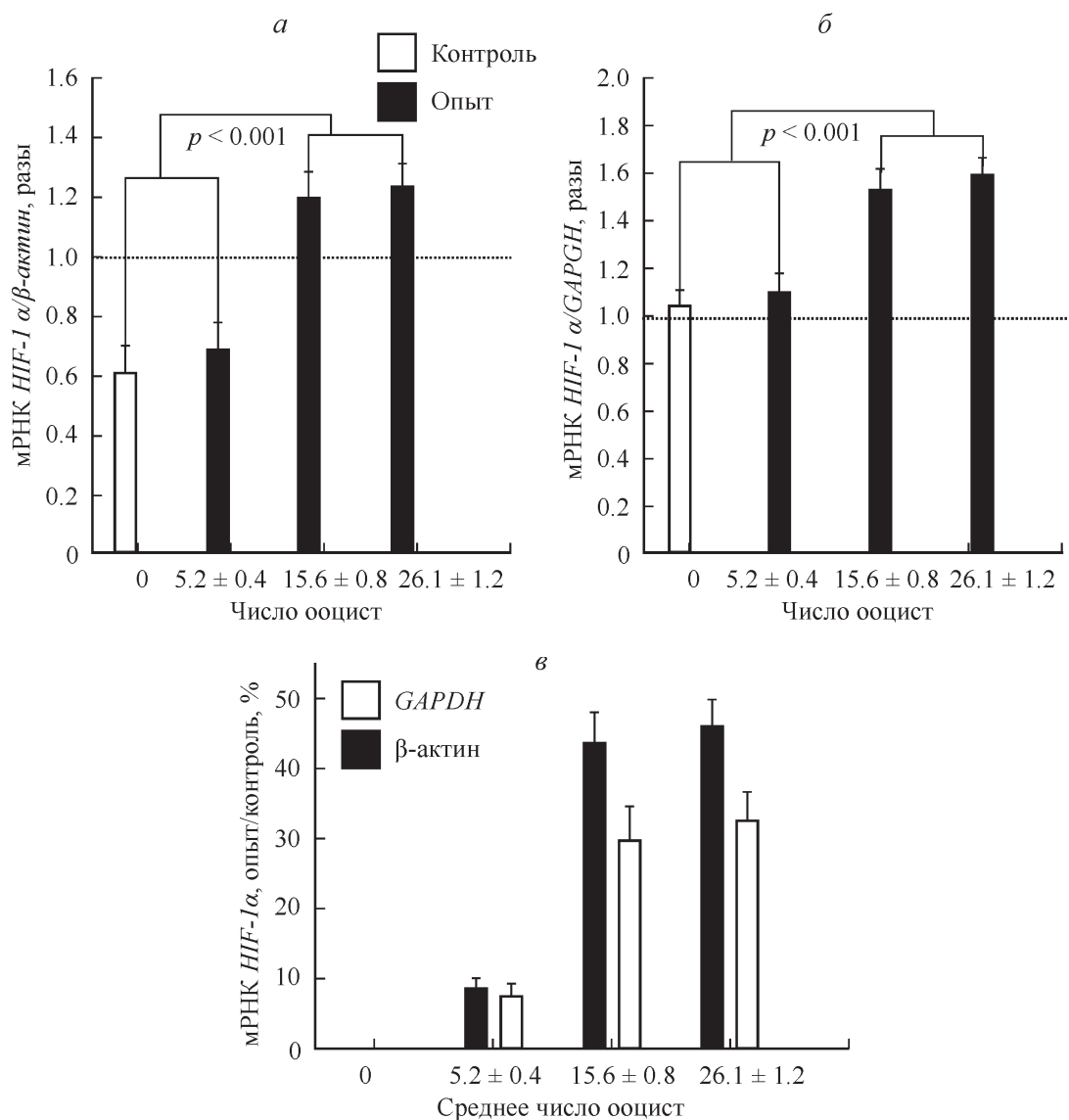


Рис. 7. Повышение уровня мРНК гена *HIF-1α* в кардиомиоцитах 10-суточных крыс после криптоспориоза разной степени тяжести.

Уровень мРНК гена *HIF-1α* относительно гена β -актина (а) и относительно гена *GAPDH* (б); в — соотношение экспрессии мРНК гена *HIF-1α* у зараженных и контрольных животных. Видно резкое повышение уровня мРНК гена *HIF-1α* при переходе от слабого заражения к среднему. На всех рисунках представлены средние значения и их статистические ошибки ($\bar{X} \pm S_x$) для животных.

спориоза. I. Изменение экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина. Цитология. 53 (11) : 848—858.

Анацкая О. В., Сидоренко Н. В., Бейер Т. В., Виноградов А. Е. 2010. Неонатальный гастроэнтерит как причина долговременной атрофии, деформации и необратимой гиперполиплоидизации кардиомиоцитов. Кардиология. 50 (10) : 35—44.

Анацкая О. В., Сидоренко Н. В., Матвеев И. В., Кропотов А. В., Виноградов А. Е. 2012. Ремоделирование кардиомиоцитов крысы после неонатального криптоспориоза. II. Деформация, избыточная полиплоидия и гиперэкспрессия *HIF-1α*. Цитология. 54 (8) : 609—620.

Бейер Т. В., Сидоренко Н. В., Анацкая О. В. 2006. Кишечный криптоспориоз раннего возраста и его негативные последствия. Мед. паразитол. 1 (1) : 3—7.

Ерохина И. Л., Селиванова Г. В., Власова Т. Д., Емельянова О. И. 1997. Корреляция между уровнем полиплоидии и гипертрофии и степенью повреждения кардиомиоцитов предсердия человека при некоторых врожденных и приобретенных патологиях сердца. Цитология. 39 (10) : 889—899.

Мартынова М. Г., Антипанова Е. М., Румянцев П. П. 1983. Содержание ДНК, телец полового хроматина и ядрышек в ядрах мышечных клеток нормальных и гипертрофированных предсердий человека. Цитология. 25 (5) : 614—619.

Матвеев И. В. 2005. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов в различных группах клеток медузы *Aurelia aurita*. Цитология. 47 (5) : 431—435.

Сидоренко Н. В., Филимонов Н. Ю., Анацкая О. В., Свежова Н. В., Бейер Т. В. 2004. Реакция клеток перенхимы печени крыс на заражение кишечным протозойным патогеном *Cryptosporidium parvum* (Sporozoa, Coccidia). Цитология. 46 (2) : 114—125.

Anatskaya O. V., Sidorenko N. V., Beyer T. V., Vinogradov A. E. 2010. Neonatal cardiomyocyte ploidy reveals critical windows of heart development. Int. J. Cardiol. 141 : 81—91.

Anatskaya O. V., Sidorenko N. V., Vinogradov A. E., Beyer T. V. 2007. Impact of neonatal cryptosporidial gastroenteritis on epigenetic programming of rat hepatocytes. Cell Biol. Int. 31 : 420—427.

- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. 2002. Myocyte ploidy in heart chambers of birds with different locomotor activity. *J. Exp. Zool.* 293 : 427–441.
- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. 2004. Paradoxical relationship between protein content and nucleolar activity in mammalian cardiomyocytes. *Genome.* 47 : 565–578.
- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E., Kudryavtsev B. N. 2001. Cardiomyocyte ploidy levels in birds with different growth rates. *J. Exp. Zool.* 289 : 48–58.
- Barker D. J., Winter P. D., Osmond C., Margetts B., Simmonds S. J. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 863 : 577–580.
- Barouki R., Gluckman P. D., Grandjean P., Hanson M., Heindel J. J. 2012. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ. Health.* 11 : 11–42.
- Bishop C. M. 1999. The maximum oxygen consumption and aerobic scope of birds and mammals: getting to the heart of the matter. *Proc. Biol. Sci.* 266 : 2275–2281.
- Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34 : 597–601.
- Calvert P. A., Rana B. S., Kydd A. C., Shapiro L. M. 2011. Patent foramen ovale: anatomy, outcomes, and closure. *Nat. Rev. Cardiol.* 8 : 148–160.
- Chen Y. F., Redetzke R. A., Said S., Beyer A. J., Gerdes A. M. 2010. Changes in left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in hypothyroid rats. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298 : H259–H262.
- Chomczynski C., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156–159.
- Cole-Jeffrey C. T., Terada R., Neth M. R., Wessels A., Kasahara H. 2012. Progressive anatomical closure of foramen ovale in normal neonatal mouse hearts. *Anat. Rec.* 295 : 764–768.
- Curione M., Aratari A., Amato S., Colotto M., Barbato M., Leone S., Tego A., Panetti D., Parlapiano C. 2010. A study on QT interval in patients affected with inflammatory bowel disease without cardiac involvement. *Intern. Emerg. Med.* 4 : 307–310.
- Davoli T., de Lange T. 2011. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 27 : 585–610.
- Erokhina I. L., Selivanova G. V., Vlasova T. D., Komarova N. I., Emeljanova O. I., Soroka V. V. 1992. Ultrastructure and biosynthetic activity of polyploid atrial myocytes in patients with mitral valve disease. *Acta Histochem. Suppl.* 42 : 293–299.
- Finch C. E. 2010. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: evolution of the human lifespan and diseases of aging: roles of infection, inflammation, and nutrition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107 : 1718–1724.
- Görlach A. 2009. Regulation of Hif-1 alpha at the transcriptional level. *Curr. Pharm. Des.* 15 : 3844–3852.
- Hochberg Z. 2009. Evo-devo of child growth II: human life history and transition between its phases. *Eur. J. Endocrinol.* 160 : 135–141.
- Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation strategies and considerations. *Genes Immun.* 6 : 279–284.
- Ideker T., Dutkowski J., Hood L. 2011. Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. *Cell.* 144 : 860–863.
- Kutty S., Sengupta P. P., Khandheria B. K. 2012. Patent foramen ovale: the known and the to be known. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 59 : 1665–1671.
- Li F., Wang X., Yi X. P., Gerdes A. M. 2004. Changes in left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in hypothyroid rats. Structural basis of ventricular remodeling: role of the myocyte. *Curr. Heart Fail. Rep.* 1 : 5–8.
- Macdonald A. A., Johnstone M. 1995. Comparative anatomy of the cardiac foramen ovale in cats (Felidae), dogs (Canidae), bears (Ursidae) and hyaenas (Hyaenidae). *J. Anat.* 186 : 235–243.
- Matveev I. V., Shaposhnikova T. G., Podgornaya O. I. 2007. A novel *Aurelia aurita* protein mesoglein contains DSL and ZP domains. *Gene.* 399 : 20–25.
- Rumyantsev P. P. 1977. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. *Int. Rev. Cytol.* 51 : 186–227.
- Rumyantsev P. P., Erokhina I. L., Antipanova E. M., Martynova M. G. 1990. DNA and sex chromatin content in nuclei of conductive system and working myocytes of normal and hypertrophied human heart. *Acta Histochem. Suppl.* 39 : 225–237.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 523 p.
- Schmittgen T. D., Livak K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3 : 1101–1108.
- Semenza G. L. 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 148 : 399–408.
- Shlüter K. D., Millar B. C., McDermott B. J., Piper H. M. 1995. Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. *Amer. J. Physiol.* 269 : C1347–C1355.
- Villalobos-Molina R., Saavedra-Molina A., Devlin T. M. 1998. Effect of hypoxia and reoxygenation on metabolic pathways in rat hepatocytes. *Arch. Med. Res.* 29 : 219–223.
- Wagner A. 2005. Energy constraints on the evolution of gene expression. *Mol. Biol. Evol.* 22 : 1365–1374.
- Whitehead A., Crawford D. L. 2006. Variation within and among species in gene expression: raw material for evolution. *Mol. Ecol.* 15 : 1197–1211.

Поступила 28 IV 2013

THRESHOLD RAT NEONATAL CARDIOMYOCYTE RESPONSE TO GRADUAL CRYPTOSPORIDIAL INFECTION SEVERITY INCREASE

O. V. Anatskaya,¹ N. V. Sidorenko, I. V. Matveev, A. V. Kropotov,
M. V. Kharchenko, A. E. Vinogradov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: anatskaya@mail.cytspb.rssi.ru

Infectious gastroenteritis is one of the common causes of tachyarrhythmia, malabsorption and growth retardation in children. Our recent studies have indicated that neonatal cryptosporidial gastroenteritis is associated with long-term cardiomyocyte abnormalities. The aim of the present study was to find out how neonatal cryptosporidiosis of various severities affects cardiac anatomy and cardiomyocyte polyploidization, remodeling and *HIF-1α* expression. Using real-time PCR, cytometry, immunohistochemistry, image analysis and interatrial septum visual examination, we revealed that gradual increase in cryptosporidial invasion was associated with threshold changes. At weak parasitic infection, interatrial septum was entire and there was no statistically signifi-

ficant change in cardiomyocytes. At moderate and severe infection, all changes in cardiac anatomy and cardiomyocytes were statistically significant and demonstrated approximately similar degree. Compared to control, heart were atrophied and elongated, interatrial septum contained a small window (*patent foramrn ovale*), and cardiomyocytes lost protein, became elongated, thin and accumulated additional genomes. Also we found *HIF-1 α* mRNA hyperexpression. Notable, the threshold response to gradual stimulus is an important criterion of development programming since such a response is commonly a consequence of abnormal anatomic structure formation and cell differentiation failure. Our results can be interesting for physicians because they indicate that even moderate cryptosporidiosis can be dangerous for neonatal heart and can trigger neonatal programming of cardiovascular pathology. Also, our results for the first time demonstrate the association between gastroenteritis, *patent foramen ovale* and cardiomyocyte malfunction.

Key words: neonatal cardiomyocyte, cryptosporidial gastroenteritis, polyploidy, remodeling, interatrial septum, foramen ovale, *HIF-1 α* , development programming.
