

© Дяговец Е.И., Твердохлеб И.В., 2013
УДК: 611.12:611.131/.132:616.151.1]-092. 9

ПРИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЯ ДЛИНЫ КОНУСНО-СТВОЛОВОГО ОТДЕЛА ЭМБРИОНАЛЬНОГО СЕРДЦА МЫШИ В НОРМЕ И ПРИ УСЛОВИИ ДЕГИДРАТАЦИИ МАТЕРИНСКОГО ОРГАНИЗМА

Е.И. Дяговец, И.В. Твердохлеб

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск

В работе проанализированы гистогенетические перестройки конусно-стволового отдела эмбрионального сердца мыши (C57BL/6) в нормальных и экспериментальных условиях. В процессе исследования установлено, что причиной укорочения конусно-стволового отдела эмбрионального сердца является физиологическая задержка пролиферативной активности клеток миокардиальной манжетки.

Ключевые слова: конусно-стволовой отдел, миокардиализация, миокардиальная манжетка, пролиферация.

Группа врожденных конусно-стволовых дефектов сердца у детей является первоочередной среди врожденных пороков сердца по возможностям комбинирования с другими пороками и вовлечения в состав субклинических персистирующих дефектов [2]. Большинство работ, посвященных аномалиям кардиогенеза, базируются на использовании моделей различных патологических состояний, тогда как влияние дегидратации материнского организма на гистогенетические перестройки эмбрионального сердца остается открытым вопросом. При этом обезвоживание организма матери разной степени тяжести сопровождается рядом заболеваний первого триместра беременности (гестозы, экстрагенитальная патология). Сложность гистогенетических перестроек конусно-стволового отдела эмбрионального сердца на пути формирования магистрального сосудистого поля в достаточно короткий период времени обуславливает выбор именно этого отдела сердца для предпочтительной экспериментальной модели [5, 12].

Целью нашей работы было определить гистогенетические перестройки конусно-стволового отдела (КСО) сердца эмбриона мыши, которые лежат в основе

изменения его длины на этапах формирования и развития производных в экспериментальных и нормальных условиях.

Среди причин уменьшения длины КСО или «абсорбции луковицы» [4] на сегодня выделяют редукцию конденсированной мезенхимы или клеток нервного гребня путем апоптоза [7]; миокардиализацию подушек ствола и гребней конуса, что приводит к уменьшению миоидных клеток КСО [8]; гистогенетические перестройки миокардиальной манжетки.

Материалы и методы

В работе использовано 127 сердец эмбрионов мышей линии C56BL/6 в условиях нормы и 64 – в условиях дегидратации материнского организма, взятых в период с 10-о по 15-й день гестации (16-24 стадия по К. Theiler) [11]. Среди представленных патологических моделей обезвоживания организма была выбрана модель дегидратации в условиях перорального приема гиперосмолярного раствора. Согласно данным модели эксперимента М.Д. McKinley с коллегами, выполненной именно на мышцах линии C56BL/6, экспериментальным был выбран вариант введения раствора 0,3 моль/л NaCl с дальнейшей

водной депривацией [9]. В качестве обезболивающего препарата был выбран тиопентал натрия (3-5 мг/кг в/м), животные умерщвлялись путем декапитации. Материал фиксировали в растворе 10%-ного забуференого формалина, обезжировали и заливали в парапласт. Серийные срезы толщиной 5, 7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином и по Стивиду. Для создания трехмерных моделей использовали программное обеспечение Photoshop CS5 (подготовка фотографий), Amira for microscopy 5.0 (создание и измерение контуров), 3ds max 8.0 (окончательная обработка и визуализация). Реконструкцию проводили согласно рекомендациям [4]. Для выявления степени пролиферативной активности ядер отдельных клеточных популяций КСО был выбран маркер – моноклональные антитела Ki-67, клон Sp6. Для определения гладких миоцитов КСО использовался маркер α -глад-комышечного актина (α SMA). Иммуногистохимические реакции проводились с использованием системы визуализации LSAB (Labelled Streptavidin Biotin) (LabVision).

Были использованы гистологические, морфометрические [1], стереологические, иммуногистохимические, биометрические методы [3], а также трехмерное компьютерное моделирование.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что длина КСО на 10-й день (16 стадия по Тейлеру) эмбриогенеза составляла 301 ± 25 мкм. При этом индекс пролиферации ядер миоцитов миокардиальной манжетки равнялся $22,4 \pm 3,4\%$, тогда как пролиферативный индекс ядер кардиомиоцитов правого желудочка $23,6 \pm 2,5\%$.

В срок 10,5 суток кардиогенеза (стадия 17 по Тейлеру) КСО достоверно удлинялся на $28,4\%$, в сравнении с предыдущей стадией. Начался манжетковый этап миокардиализации. Согласно результатам исследования N. Okamoto с коллегами термин «миокардиализация» трактовался, как начало трансдифференцировки миоцитов миокардиальной манжетки в мезенхимные клетки – миокардиально-

мезенхимная дифференциация [4]. В ходе нашего исследования о начале данного этапа свидетельствовало появление в кардиогеле подушек ствола эмбрионального сердца популяции клеток с положительной реакцией маркера α -SMA (α -SMA+). Индекс пролиферации миоцитов миокардиальной манжетки повышался на $24,0\%$ ($p < 0,05$) в сравнении с предыдущей стадией, но все равно его значение в сравнении с аналогичным значением кардиомиоцитов правого желудочка было достоверно сниженным (рис. 1).

На 11-й день (стадия 18 по Тейлеру) эмбриогенеза длина КСО увеличивалась на $27,2\%$ ($p < 0,05$), при этом длина левой подушки ствола и переднего конусного гребня значительно превышала длину противоположных эмбриональных структур КСО (рис. 2). Данный отдел сердца в течении 11-х суток достигал максимальной длины $357,6 \pm 31,1$ мкм. Индекс пролиферации ядер мезенхимных клеток структурных компонентов КСО достоверно возрастал на $33,3\%$, кардиомиоцитов правого желудочка – на $27,5\%$ ($p < 0,05$). Пролиферативный индекс ядер миоцитов миокардиальной манжетки на данном сроке достоверных отличий от соответствующего показателя на предыдущей стадии не имел. На этом гестационном сроке продолжалась миокардиализация стволых подушек, а именно ее манжетковый этап. В субэндокардиальном пространстве структурных компонентов ствола начинали появляться α -SMA+ клетки. Это свидетельствовало о начале субэндокардиального этапа миокардиализации.

К середине 11-х суток (стадия 19 по Тейлеру) эмбрионального развития КСО сердца начинал сокращение в длине, укорачиваясь на $28,1\%$ ($p < 0,05$) в сравнении с предыдущим сроком. Индекс пролиферации миоцитов миокардиальной манжетки в сравнении с аналогичным показателем кардиомиоцитов правого желудочка начал стремительно и достоверно уменьшаться, составляя значения в 2 раза меньше. Миокардиализация структурных компонентов КСО продолжалась. Манжетковый этап

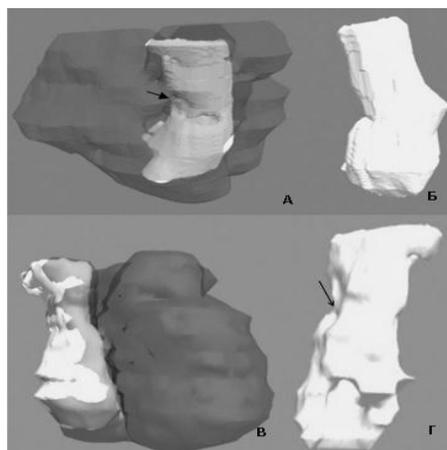


Рис. 1. Трехмерные модели эмбрионального сердца мыши (А, В) и конусно-стволового отдела (Б, Г) на 10-й и 11-й дни эмбриогенеза. Стрелкой указан конусно-стволовой изгиб

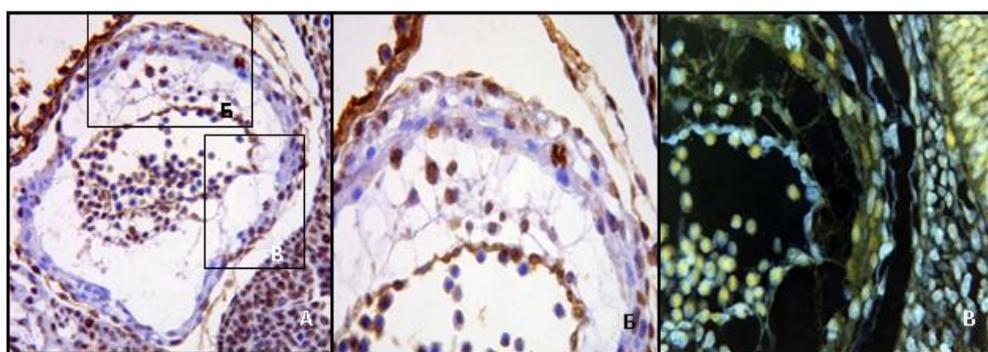


Рис. 2. Гистологический срез стволового отдела эмбрионального сердца мыши, 10,5 день гестации. Иммуногистохимическая реакция, маркер Ki-67, доокрашивание гематоксилином Майера. А - $\times 100$; Б, В - $\times 400$. В – инверсированное изображение реакции

характеризовался значительным уменьшением и истончением миоидных клеток, тогда как α -SMA+ популяция расширялась в сторону аортопульмонального септационного комплекса, преимущественно над его подковой. α -SMA+ конусная популяция расширялась с появлением миоидных комплексов при трабекулярном миокарде конусных гребней. Таким образом, инициировался трабекулярный этап миокардиализации эндокардиальных структур данного отдела сердца.

На 12-е сутки (стадия 20 по Тейлеру) гестации укорачивание КСО продолжалась, и его нынешняя длина составляла

$369 \pm 41,2$ мкм. Миокардиализация структурных компонентов ствола продолжалась и осуществлялась уже в три полноценные стадии: манжетковую, субэндокардиальную и септационную. На этом строке, α -SMA+ клетки наблюдались среди конденсированной мезенхимы субэндотелиального пространства новообразованных сосудов. Согласно исследованиям [4], артериализация стенок магистральных сосудов в процессе их гистогенеза проявлялась трансдифференцировкой мезенхимы в гладкие миоциты меди крупного сосуда. В ходе нашего исследования определялось, что

начало этого гистогенетического процесса наблюдалось в конце септационного и на протяжении субэндотелиального этапов. Следовательно, нам удалось установить, что последние два этапа миокардиализации структурных компонентов ствола эмбрионального сердца можно назвать артериализацией стенок магистральных сосудов. Данный процесс рассматривается в ряде литературных источников либо как продолжение [6], либо как часть миокардиализации [10].

В период 12,5 сут эмбриогенеза (стадия 21 по Тейлеру) показатели длины структурных компонентов КСО продолжали стремительно падать, достоверно уменьшая общую длину КСО на 28,9% ($p < 0,05$). Пролиферация миоцитов миокардиальной манжетки задерживалась на том же уровне. α SMA+ популяция конусных гребней расширялась в виде появления субтрабекулярного слоя миоидных клеток, которые имели меньшую интенсивность реакции и большую степень компактизации, чем подлежащий трабекулярный конусный миокард. Над субтрабекулярным слоем определялись комплексы миоидных клеток. Артериализация стенки новообразованных сосудов набирала обороты, наиболее интенсивно проявляясь на субэндотелиальном этапе.

С 13-х гестационных суток (стадия 22 по Тейлеру) длина КСО продолжала достоверно уменьшаться за счет очевидного сокращения длины ствольных подушек. Верхние 2/3 данных подушек трансформировались в интраперикардимальные части аорты и легочного ствола, а нижняя 1/3 – в зону полулунных клапанов. α SMA+ клетки бывшей ствольной части наблюдались в составе субэндотелиальной и частично септационной фракций. α SMA+ конусная клеточная популяция расширялась в дорсо-вентральном направлении.

На протяжении 14-х эмбриональных суток (стадия 23 по Тейлеру) окончательно сокращалась длина КСО отдела, за счет редукции конденсированной мезенхимной популяции путем апоптоза. α SMA+ субэндотелиальная конусная клеточная фракция передвигалась на проводящие края обоих

гребней, заполняя полностью их субэндотелиальное пространство.

На 15-й день эмбрионального развития (стадия 24 по Тейлеру) КСО как промежуточная эмбриональная структура завершал свое существование за счет того, что участок конусных гребней полностью приближался по строению к частям стенок выхода магистральных сосудов из соответствующих желудочков.

Изменение качественных особенностей гистогенетических перестроек КСО, которые влияют на показатели его длины в экспериментальных условиях, в ходе нашего исследования были опровергнуты. Количественные показатели в условиях дегидратации материнского организма также не имели достоверных отличий с соответствующими нормальными показателями.

Итак, причиной уменьшения длины КСО определялась физиологическая задержка пролиферации миоцитов миокардиальной манжетки. Данная манжетка, не увеличиваясь, сдерживала удлинение КСО. В ходе исследования было установлено, что уменьшение пролиферативной активности миоцитов миокардиальной манжетки было обусловлено их активным участием в процессах миокардиализации структурных компонентов конуса и ствола.

Выводы

1. Манжетковый этап миокардиализации подушек ствола сменяет субэндотелиальный на 11-е сутки эмбрионального развития. Миокардиализация конусных гребней проходит трабекулярный и субэндотелиальный этапы, которые начинаются на 11,5 день гестации и продолжаются два дня.

2. Артериализация стенок новообразованных магистральных сосудов проходит септационную и субэндотелиальную стадии. Являясь отдельным этапом гистогенеза КСО, артериализация следует за миокардиализацией.

3. Проллиферативный индекс ядер миоцитов миокардиальной манжетки достоверно снижен в сравнении с соответствующим показателем ядер кардиомиоцитов правого желудочка на протяжении гистогенетических перестроек КСО эмбрионального сердца.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Інформаційний бюллетень № 167 [Електронний ресурс] // Національний інститут серцево-судинної хірургії ім. М.М. Амосова. – 2012. – Режим доступу: [www.http://amosovinstitute.org.ua]. – Назва з екрану.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. – 4-е изд., переработанное и дополненное / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
4. Твердохліб І.В. Просторова реконструкція біологічних об'єктів за допомогою комп'ютерного моделювання / І.В. Твердохліб // Морфологія. – 2007. – Т. 1, № 1. – С. 135-139.
5. Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations / A. C. Gittenberger-de Groot [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2005. – Vol. 57, № 2. – P. 169-176.
6. Formal genesis of the outflow tracts of the heart revisited / N. Okamoto [et al.] // *Congenital Anomalies.* – 2010. – Vol. 50. – P. 141-158.
7. Keyte A. The neural crest in cardiac congenital anomalies / A. Keyte, M. R. Hutson // *Differentiation.* – 2012. – Vol. 84, № 1. – P. 25-40.
8. Markwald R.R. Formation and septation of the tubular heart: integrating the dynamics of morphology with emerging molecular concepts / R.R. Markwald, T. Trusk, M. Moreno-Rodriguez. – Boston: Birkhauser: Living Morphogenesis of the Heart, 2009. – 84 p.
9. McKinley Michael J. Osmoregulatory fluid intake but not hypovolemic thirst is intact in mice lacking angiotensin / J. Michael McKinley, L. Lesley, L. Walker // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2008. – Vol. 294. – P. 1533-1543.
10. Muscularizing tissues in the endocardial cushions of the avian heart are characterized by the expression of h1-calponin / I. Moralez [et al.] // *Dev. Dyn.* – 2006. – Vol. 235. – P. 1648-1658.
11. Theiler K. The House Mouse: Atlas of Mouse Development / K. Theiler. – New York: Springer-Verlag, 1989. – 185 p.
12. Zhu L. Ovine fetal hormonal and hypothalamic neuroendocrine responses to maternal water deprivation at late gestation / L. Zhu, C. Mao, J. Wu // *Dev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 27, № 4. – P. 385-391.

CAUSES OF LENGTH OF CONOTRUNCUS OF EMBRYONIC MOUSE HEART AT NORMAL CONDITION AND UNDER THE MATERNAL DEHYDRATION

K.I. Dyagovets, I.V. Tverdokhleba

This work presents the histogenetic transformation from conotruncus of embryonic mouse heart (C57BL/6) under the normal and experimental condition. It was established the reason of the shortening of the conotruncus of embryonic heart was delayed physiological proliferative activity of the cells of myocardial cuff during our research.

Keywords: *conotruncus, myocardialization, myocardial cuff, proliferation.*

Дяговец Е.И. – очный аспирант кафедры гистологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск, Украина.

E-mail: KatarinaDyagovets@gmail.com.

Твердохлеб И.В. – д-р мед. наук., проф., зав. кафедрой гистологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск, Украина.

E-mail: ivt@dsma.dp.ua.