

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Гудлетт Т.А., Твердохлеб И.В., 2014
УДК 611.12:611.013:611.061.1

**ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА ТКАНЕВЫХ
И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
В ЭМБРИОНАЛЬНОМ СЕРДЦЕ КУРИНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ**

Т.А. Гудлетт, И.В. Твердохлеб

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

Проведены анализ и сопоставление гистоструктурных и ультраструктурных особенностей систолы и диастолы сердца у куриных эмбрионов на 29-46-й стадиях по Hamburger, Hamilton. Определены основные различия между камерами эмбрионального сердца, оценены систоло-диастолические градиенты, показаны геометрические перестройки стенки камер для реализации сокращения, описаны особенности ультраструктуры саркомеров в зависимости от локализации кардиомиоцитов.

Ключевые слова: кардиогенез кур, систола, диастола, гистоструктура, ультраструктура.

В соответствии с современными представлениями о пространственной архитектуре миокарда принято рассматривать три иерархических уровня в рамках их тканевой организации. Первый – это функциональные волокна кардиомиоцитов и их ориентация. Второй уровень описывает организацию мышечных волокон в мышечные пластины. Третичная организация предусматривает объединение миоламмелл в группы, которые в научной литературе обозначены по-разному – как слои, пучки, полосы [2, 11].

Были предприняты многочисленные попытки количественно определить вклад внутриклеточных сократительных процессов и внеклеточной геометрии сокращения, связанной со смещением мышечных пластин и состоянием перимизия [1, 8, 10]. В частности, при изучении биомеханики сокращения с помощью двухплоскостной кинематографической рентгенографии было показано, что у собак около 50% утолщения стенки левого желудочка во время систолы обеспечивается скольжением мышечных пластин друг относительно друга, а утолщение отдельных кардиомиоцитов

составляет лишь пятую часть [7]. Данное исследование было продолжено в работе Costa K.D. et al. [6] с использованием той же методики, но с учетом геометрических изменений в трабекулах левого желудочка и субэндокардиальной зоне его стенки. Авторы показали, что в дополнение к взаимному смещению мышечных пластин при сокращении миокарда активное участие принимает расширение трабекул, и оценили вклад смещения-скольжения в 40% и фактор собственно сокращения трабекулярного и интрамурального компонентов – в 60%.

Указанные результаты были получены с помощью различных подходов и на разных объектах, однако исследования подобного рода были проведены на зрелом экспериментальном материале, тогда как вопросы возникновения данного феномена в эмбриогенезе и его дальнейшего онтогенетического развития оставались до сих пор не изученными.

В связи с этим цель работы заключалась в сопоставлении гистоструктурных и ультраструктурных особенностей систолы и диастолы сердца у куриных эмбрионов с 29-й по 46-ю стадию развития.

Материалы и методы

В работе исследовали зародыши кур кросса Cobb500 от начала 6 сут до 21 сут инкубации. Яйца инкубировали при температуре 39,4°C и относительной влажности воздуха 80%. Стадию развития определяли по Hamburger, Hamilton (НН) в соответствии с рекомендациями [9]. Состояние максимальной диастолы моделировали с помощью хлорида калия по методике Xiaowei Zhang и соавт. [3]. Для моделирования максимальной систолы использовали хлорид бария [4]. Материал фиксировали в растворе Буэна, обезвоживали этанолом, пропитывали хлороформом, заливали в парапласт.

Для ультраструктурного исследования образцы различных участков предсердного и желудочкового миокарда размером до 1 мм в течение 3-4 часов фиксировали при +2°C в 2,5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленном на 0,2М фосфатном буфере (рН 7,4). Последующая фиксация проводилась в 1%-ном забуференном (рН 7,4) растворе OsO₄ («SPI», США) в течение 1 часа. Обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и в пропиленоксиде. Для изготовления эпоксидных блоков использовали композицию эпон-аралдит. Изготовление ультратонких срезов проводили на ультрамикротоме УМТП-6М («SELMИ», Украина) с последующим их размещением на опорных сетках (Mesh Regular Grid 200). Двойное контрастирование проводили по стандартной методике (методом Рейнольдса). Исследование проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа ПЭМ-100-01 («SELMИ», Украина) при ускоряющем напряжении 75 кВ и первичных увеличениях от 2000 до 35000 по стандартной схеме [5].

Определение достоверности различий между выборками проводили с учетом парного t-критерия Стьюдента, а также непараметрического критерия Уилкоксона в случае отсутствия нормального статистического распределения величин. Полученные квантифицированные результаты обрабатывали с помощью лицензионной программы

Statistica (версия 6.1; серийный номер AGAR 909 E415822FA).

Результаты и их обсуждение

При анализе серийных срезов сердца куриных эмбрионов в период с 29-й по 35-ю стадию развития обнаружилось, что на ранних стадиях внутренний рельеф правого желудочка (ПЖ) изменялся за счет сужения межтрабекулярных пространств и утолщения трабекул. При этом наблюдалось увеличение диаметра кардиомиоцитов при стабильной длине трабекул. В левом желудочке (ЛЖ) происходило двукратное удлинение и увеличение количества трабекул на фоне опережающего утолщения компактного миокарда. В данный период развития систоло-диастолический градиент диаметра трабекул в обоих желудочках нарастал незначительно.

По данным морфометрии, на 35-й стадии развития за счет активной пролиферации клеток компактного и трабекулярного миокарда происходило существенное усложнение внутреннего рельефа камер обоих желудочков. В частности, наибольшее утолщение свободной стенки ПЖ смещалось от верхушечной области к промежуточной, достигая 44 мкм, так как в данной локализации происходило наиболее активное формирование компактного миокарда. В стенке ЛЖ в состоянии диастолы максимальная толщина составляла 73 мкм в промежуточной области, где компактно расположенные кардиомиоциты формировали 12-15 клеточных рядов. Морфометрическое исследование предсердного миокарда выявило существенные сдвиги толщины компактного миокарда левого предсердия (ЛП) в состоянии систолы и его фазового градиента на протяжении 29-35-й стадий, тогда как в правом предсердии (ПП) изменения были менее выраженными и не имели статистически значимого характера.

Для уточнения характера систоло-диастолических различий на тканевом уровне и оценки вклада внутриклеточных изменений в их формирование на этапах онтогенеза в работе с помощью трансмиссионной электронной микроскопии были

изучены ультраструктурные особенности сократительных кардиомиоцитов.

При ультраструктурном исследовании сердца куриных эмбрионов на 29-й стадии обнаруживались признаки относительной незрелости миофибрилл (рис. 1). Часто телофрагмы состояли из отдельных фрагментов, на своих периферических

участках не имели характерной плотности и были представлены скоплениями мелкодисперсного осмиофильного материала, отражая незавершенный характер формирования дисков. Мезофрагмы выявлялись в виде незначительных скоплений электронно-плотного материала в срединных участках некоторых саркомеров.

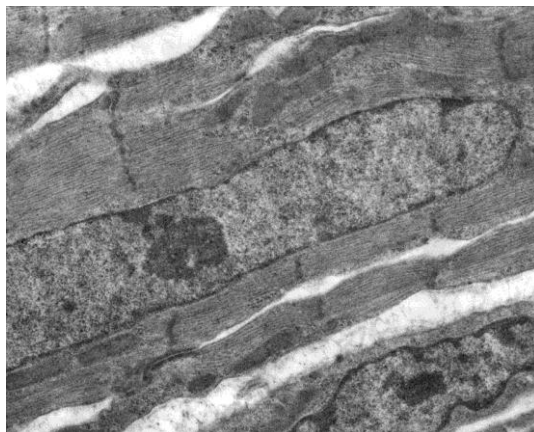


Рис. 1. Сократительный кардиомиоцит компактного миокарда ПЖ куриного эмбриона на 29-й стадии развития в состоянии диастолы. Относительная незрелость саркомеров и их различная длина в составе соседних миофибрилл. Электронограмма. Увел. 12000

В состоянии моделируемой диастолы саркомеры существенно варьировали по длине как в соседних миофибриллах, так и в составе одной миофибриллы. На наш взгляд, неодинаковая степень расслабления саркомеров была связана как с незавершенным созреванием белкового состава самих миофиламентов, так и с неупорядоченным расположением структур гладкого эндоплазматического ретикулула, ответственного за депонирование кальциевых ионов. В наших наблюдениях это подтверждалось отсутствием цистерн вблизи Z-дисков у большинства саркомеров, находящихся в состоянии неполного расслабления.

Изменения диаметра желудочковых кардиомиоцитов в состоянии систолы по отношению к диастоле были незначительными и сопоставимыми как в компактном, так и в трабекулярном миокарде, несмотря на значительное преобладание толщины сократительных клеток в трабекулах ЛЖ.

Наименьший фазовый градиент диаметра миоцитов наблюдался в миокардеПП.

По нашим данным, в период с 6-х по 8-е сут инкубации (стадии 29-35 по НН) происходило перераспределение структур гладкого эндоплазматического ретикулула, которые группировались преимущественно вблизи Z-дисков и были представлены неширокими щелевидными мембранными образованиями в составе желудочковых кардиомиоцитов, однако в клетках предсердий подобные структуры не выявлялись. В состоянии диастолы саркомеры кардиомиоцитов трабекулярного и компактного миокарда желудочков становились сопоставимыми по длине.

На 35-й стадии по НН при моделировании систолы в миофибриллах кардиомиоцитов обнаруживались полиморфные Z-диски, часть из которых имели ступенчатую или зигзагообразную форму, что свидетельствовало о продолжающемся структурном созревании те-

лофрагм и миофибрилл в целом. Об ограниченном характере этого созревания можно было судить по тому, что Z-диски располагались на разных уровнях вследствие сдвига соседних миофибрилл при их недостаточной интеграции элементами цитоскелета. Кроме того, часть мате-

риала телофрагм, как и на предыдущих стадиях, была представлена тонкодисперсным осмиофильным материалом на их периферии (рис. 2). Структура мезофрагм также оставалась относительно незрелой как в желудочках, так и, в особенности, в предсердиях.



Рис. 2. Участок миокарда ЛЖ куриного эмбриона на 35-й стадии развития в состоянии систолы. Активное коллагенообразование вблизи отростков фибробластов. Выраженная гетероморфность миофибрилл. Электронограмма. Увел. 28000

До закрытия отверстия межжелудочковой перегородки (МЖП) на фоне уплотнения клеток компактного миокарда желудочков происходило активное утолщение кардиомиоцитов в ЛЖ, тогда как в ПЖ нарастание их диаметра было менее выраженным. В предсердиях размеры кардиомиоцитов существенно не изменялись. В трабекулах желудочкового миокарда на фоне незначительного нарастания левожелудочковых кардиомиоцитов наблюдалось стремительное нарастание диаметра сократительных клеток в ПЖ, что по сравнению с 29-й стадией составило прирост более чем в 2 раза.

В трабекулах ЛЖ нарастание систолического диаметра кардиомиоцитов и его систоло-диастолического градиента было незначительным, тогда как в ПЖ толщина клеток в систоле более чем двукратно превышала значения 29-й стадии, что приводило к пропорциональному двукратному нарастанию фазовой разницы данного показателя. В предсердном миокарде на данной стадии развития так-

же отмечалось закономерное увеличение систолического диаметра сократительных клеток и фазового градиента, однако изменения были менее выраженными.

На протяжении 6-8-х суток инкубации межклеточные пространства претерпевали ряд существенных ультраструктурных изменений. Так, в периваскулярных участках данные пространства постепенно расширялись, обогащались функционально активными фибробластами и их отростками. На 35-й стадии по НН обнаруживались группы из нескольких десятков коллагеновых волокон, которые ориентировались параллельно друг другу и располагались в поперечно-циркулярной ориентации по отношению к продольной оси кардиомиоцитов. Локусы коллагенообразования в данный период развития были немногочисленными.

При сопоставлении результатов ультраструктурного исследования с данными гистологического изучения серийных срезов можно сделать заключение о том, что описанные изменения миокарда ка-

мер сопровождаются активным структурно-функциональным созреванием саркомеров на фоне незначительных сдвигов систоло-диастолического градиента их длины и диаметра кардиомиоцитов компактного миокарда. По нашему мнению, в данный период основной вклад в формирование сократительной способности сердца вносят компоненты трабекулярного миокарда, в то время как в компактном миокарде преобладают гиперпластические процессы с сопутствующим развитием микроциркуляторного русла.

Важно отметить, что на 29-35-й стадиях развития куриных эмбрионов в каждой из изученных камер наблюдалось отчетливое соответствие между систоло-диастолическими градиентами толщины компактного миокарда и диаметра кардиомиоцитов. Это свидетельствует о том, что в систолическом утолщении стенок камер главным или, возможно, единственным структурным механизмом выступает расширение саркоплазмы сократившихся сердечных миоцитов.

Одним из важнейших эмбриональных событий кардиогенеза, которое определяет морфогенетическую динамику структуры сердца, является полное разделение полостей левого и правого желудочков. В кардиогенезе курицы закрытие отверстия МЖП происходит на 35-й стадии развития, в связи с чем в период с 36-й стадии по НН наблюдались многочисленные активные изменения структуры сердца на всех изученных уровнях – органном, тканевом, клеточном. По данным анализа серийных срезов, такая стремительная трансформация была основана на ряде гистоструктурных сдвигов, протекающих по-разному в ЛЖ и ПЖ.

С одной стороны, начиная с 36-й стадии в сердце куриных эмбрионов наблюдалось активное развитие стромального компонента, что приводило к разделению ткани компактного миокарда желудочков на группы мышечных волокон. Эти группы формировались в виде узких протяженных плоских пластин, содержащих в толщину от 3 до 5 рядов кардиомиоцитов с постепенным увеличением количества

рядов до 8-12 к концу эмбриогенеза. Образование примитивных желудочковых миоламелл сопровождалось не только значительным утолщением компактного миокарда, но и нарастанием систоло-диастолического градиента его толщины; при этом фазовый градиент толщины компактного миокарда в стенке ЛЖ увеличивался в 3,4 раза, ПЖ – в 2,3 раза.

С другой стороны, при сопоставлении серийных срезов в систоле и диастоле обнаруживались характерные фазовые изменения ориентации мышечных пластин, обуславливающие разные для левого и правого желудочков геометрические механизмы сокращения камер. На заключительных этапах кардиогенеза в ПЖ толстые и относительно короткие миоламеллы располагались в косо-циркулярной ориентации в состоянии диастолы и сохраняли ее во время систолы, что приводило к продольно-циркулярному сокращению камеры при незначительном градиенте толщины стенки ПЖ. При этом полость ПЖ во время систолы своеобразным образом «прижималась» к массивной МЖП за счет сужения щелевидной камеры. В ЛЖ геометрия сокращения была иной. В частности, во время систолы тонкие и протяженные спирально ориентированные мышечные пластины при своем сокращении скользили относительно друг друга и формировали не только более эффективное утолщение стенки ЛЖ, но и поступательное вращательное сокращение ЛЖ в целом. За счет апико-базальной направленности миоламелл ЛЖ в фазе систолы наблюдалось сокращение продольного размера камеры, а за счет спирального хода формировался «эффект скручивания» миокарда стенки конусовидной полости ЛЖ (в базальной части – по часовой стрелке, в апикальной – в противоположном направлении). Очевидно, такое изменение геометрии способствовало более эффективному обеспечению фракции выброса за счет уменьшения объема полости ЛЖ.

Третий, еще один важнейший аспект рассматриваемого вопроса, связанного с развитием сократительной способности желудочкового миокарда после закрытия

отверстия МЖП, был проанализирован нами на ультраструктурном уровне. В частности, было установлено, что после полного разделения желудочков на фоне формирования миоламеллярной структуры желудочкового миокарда в сократительных кардиомиоцитах появлялись миофибриллы, в которых во время систолы Z-диски приобретали наклонную (тангенциальную) ориентацию. При взаимном смещении соседних миоламелл во время систолы отмечалось нелинейное расширение межклеточных пространств, которые содержали микрососуды в окружении отростков активных фибробластов. В моделируемой диастоле ортогональная организация миофибрилл восстанавливалась. Различия в структуре миофибрилл обнаруживались крайне редко.

По своей длине расслабленные саркомеры также не различались существенно между собой, что свидетельствовало о более зрелом состоянии кальций-депонирующих структур гладкого эндоплазматического ретикулума.

Систолю-диастолический градиент длины саркомеров сократительных клеток в ЛЖ приобретал статистически значимый характер значительно раньше, чем в ПЖ (табл. 1) и предсердиях (табл. 2). Указанные изменения отчетливо согласуются с полученными нами данными о характере сдвигов систоло-диастолической разницы толщины компактного миокарда желудочков и диаметра кардиомиоцитов, однако не объясняют в полной мере столь активного нарастания фракции выброса ЛЖ.

Таблица 1

Динамика изменений абсолютного (мкм, $M \pm m$) и относительного (%) систоло-диастолического градиента длины саркомеров кардиомиоцитов компактного желудочкового миокарда куриных эмбрионов

Стадия	Левый желудочек		Правый желудочек	
	Градиент, мкм	Градиент, %	Градиент, мкм	Градиент, %
29	0,19±0,04	10,2	0,16±0,05	8,3
31	0,20±0,03	11,0	0,14±0,03	7,6
33	0,19±0,02	10,3	0,15±0,04	8,0
35	0,23±0,03	12,2	0,10±0,03	5,4
36	0,30±0,03	14,9*	0,15±0,05	8,0
38	0,27±0,03	13,0*	0,17±0,03	8,8
41	0,30±0,02	14,2*	0,30±0,03	14,3*
43	0,36±0,02	16,7*	0,31±0,02	14,7*
46	0,36±0,03	16,4*	0,33±0,03	15,3*

* – достоверное отличие ($p < 0,05$) значений в диастоле от соответствующих по стадии значений в систоле

Таблица 2

Динамика изменений абсолютного (мкм, $M \pm m$) и относительного (%) систоло-диастолического градиента длины саркомеров кардиомиоцитов предсердного миокарда куриных эмбрионов

Стадия	Левое предсердие		Правое предсердие	
	Градиент, мкм	Градиент, %	Градиент, мкм	Градиент, %
29	0,05±0,02	3,0	0,06±0,02	3,5
31	0,07±0,02	4,1	0,12±0,04	6,9
33	0,11±0,03	6,1	0,06±0,03	3,5
35	0,14±0,04	7,6	0,07±0,02	3,9
36	0,16±0,03	8,4	0,07±0,03	3,9
38	0,29±0,03	14,2	0,19±0,04	9,8
41	0,36±0,04	17,1*	0,26±0,03	12,9
43	0,37±0,03	17,3*	0,35±0,03	16,7*
46	0,33±0,02	15,6*	0,35±0,04	16,4*

* – достоверное отличие ($p < 0,05$) значений в диастоле от соответствующих по стадии значений в систоле

По нашим данным, к окончанию эмбриогенеза куриных зародышей тангенциальная ориентация Z-дисков в систоле усиливалась в ЛЖ. Напротив, в ПЖ и в предсердиях систолическое сокращение не изменяло ортогональной ориентации телофрагм и вставочных дисков. В состоянии диастолы такая ориентация была характерной для всех камер. При этом наибольшая длина саркомеров наблюдалась в промежуточной части миоламелл, наименьшая – в основании мышечных листков и трабекул желудочков. Это происходило на фоне увеличения систоло-диастолической разницы длины саркомеров с соответствующим нарастанием фракции выброса.

Выводы

Формирование миоламеллярной структуры миокарда желудочков начинается сразу же после закрытия отверстия межжелудочковой перегородки после 35-й стадии по Hamburger, Hamilton и развивается по-разному в левом и правом желудочках. Систолю-диастолический градиент длины саркомеров сократительных клеток в левом желудочке приобретает статистически значимый характер значительно раньше, чем в правом желудочке и предсердиях, что отчетливо согласуется с характером сдвигов систоло-диастолической разницы толщины компактного миокарда желудочков и диаметра кардиомиоцитов.

Литература

1. Cellular basis for volume related wall thickness changes in the rat left ventricle / H.M. Spotnitz [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1974. – Vol. 6. – P. 317-331.
2. Heuristic problems in defining the three-dimensional arrangement of the ventricular myocytes / R.H. Anderson [et al.] // *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* – 2006. – Vol. 288. – P. 579-586.
3. Improved preparation of chick embryonic samples for magnetic resonance microscopy / Xiaowei Zhang [et al.] // *Magnetic Resonance in Medicine.* – 2003. – Vol. 49. – P. 1192-1195.
4. Judd R.M. Effects of Barium-Induced Cardiac Contraction on Large- and Small-Vessel Intramyocardial Blood Volume / R.M. Judd, B.I. Levy // *Circ. Res.* – 1991. – Vol. 68. – P. 217-225.
5. Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols / J. Kuo. – Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2007. – 608 p.
6. Laminar fiber architecture and three-dimensional systolic mechanics in canine ventricular myocardium / K.D. Costa [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P. 595-607.
7. Laminar structure of the heart: ventricular myocyte arrangement and connective tissue architecture in the dog // I.J. LeGrice [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol. 269. – P. 571-582.
8. Left ventricular structure and function: basic science for cardiac imaging / P.P. Sengupta [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – Vol. 48. – P. 1988-2001.
9. Martinsen B.J. Reference guide to the stages of chick heart embryology / B.J. Martinsen // *Dev. Dyn.* – 2005. – Vol. 233. – P. 1217-1237.
10. Shear properties of passive ventricular myocardium / S. Dokos [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – P. 2650-2659.
11. The myocardium and its fibrous matrix working in concert as a spatially netted mesh: a critical review of the purported tertiary structure of the ventricular mass / P.P. Lunkenheimer [et al.] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2006. – Vol. 29. – P. 41-49.

**DYNAMICS OF TISSUE AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES
IN THE EMBRYONIC HEART OF THE CHICK EMBRYO**

T.A. Goodlett, I.V. Tverdokhleб

The analysis and comparison of histostructural and ultrastructural features of systole and diastole of the chick embryo heart at 29-46th stages on Hamburger, Hamilton were carried out. The main differences between the chambers of the embryonic heart by the nature of developmental dynamics of systolic and diastolic gradients, shows geometrical transformation of the walls of the chambers to reduce, described the features of the ultrastructure of sarcomeres, depending on the location of cardiomyocytes.

Keywords: chick cardiogenesis, systole, diastole, histostructure, ultrastructure.

Гудлетт Т.А. – очный аспирант кафедры гистологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск, Украина.

E-mail: tanyagoodlett@gmail.com.

Твердохлеб И.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой гистологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск, Украина.

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