

© Гудлетт Т.А., Твердохлеб И.В., 2013
УДК: 611.12:611.013:611.061.1

МОРФОЛОГИЯ ВНУТРЕННЕГО РЕЛЬЕФА ЖЕЛУДОЧКОВОГО МИОКАРДА У КУРИНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ НА 6-8 СУТКИ ИНКУБАЦИИ

Т.А. Гудлетт, И.В. Твердохлеб

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

Цель работы – создание трехмерных компьютерных моделей сердца куриных эмбрионов на 6 и 8 сут инкубации с последующей сопоставительной оценкой внутреннего рельефа желудочков. В работе проведены реконструкция и морфометрический анализ сердца эмбрионов кур при помощи компьютерного моделирования, выделены структуры для дальнейшего изучения. Показано, что развитие внутреннего рельефа осуществляется по разным путям в левом и правом желудочках.

Ключевые слова: сердце куриных эмбрионов, желудочковый миокард, трехмерное компьютерное моделирование, внутренний рельеф.

Поскольку морфогенетические изменения в сердце имеют пространственный характер, чрезвычайно важно проводить трехмерную визуализацию и анализ развития сердца при сочетании с другими методами. Пространственное моделирование является мощным инструментом эмбриологических исследований и существенно помогает понять динамику структурных преобразований эмбриона [6]. В процессе кардиогенеза размеры и форма полостей существенно изменяются, но количественной характеристике этих изменений посвящено незначительное количество исследований.

Принципиально новый взгляд на кардиогенез возникает при сочетании трехмерной реконструкции гистологических срезов и методов выявления белковых и других соединений [3, 12]; также это позволяет получить точное представление о локализации тех или иных процессов в развивающемся сердце. Несмотря на то, что тщательная обработка гистологических срезов и использование значительного количества срезов для реконструкции требуют много времени, такая работа позволяет с высокой точностью интегрировать полученную информацию в пространственную компьютерную модель.

В области изучения кардиогенеза компьютерное моделирование и компьютерная графика применялись для визуализации развивающегося сердца мыши [2, 13], курицы [8] и человека [4, 14]. Изучение реконструкций показало, что сердца на одном и том же сроке эмбрионального развития у одного вида идентичны. Двух или трех реконструкций на один срок, по-видимому, достаточно для создания репрезентативной модели данной стадии развития. Объемные количественные характеристики сердец на аналогичной стадии отличаются в пределах 10%. Эти предварительные результаты указывают на то, что биологическое варьирование не создает проблем для оценки популяции в целом [9]. Волнометрические данные структур развивающегося сердца могут быть использованы в математических и функциональных моделях развития сердца. В то же время информация о структурах полостей, их волнометрических и морфологических изменениях во время развития сердца до сих пор не является полной.

Цель данной работы – создание трехмерных компьютерных моделей сердца куриных эмбрионов на 6 и 8 сут инкубации с последующей сопоставительной оценкой внутреннего рельефа желудочков.

Материалы и методы

В работе исследовали зародыши кур кросса Cobb500 в начале 6 сут и к концу 8 сут инкубации. Яйца инкубировали при температуре 39,4°C и относительной влажности воздуха 80%. Стадию развития определяли по Hamburger, Hamilton (НН) [7] в соответствии с рекомендациями [11]. Материал фиксировали в растворе Буэна, обезвоживали этанолом, пропитывали хлороформом, заливали парапластом. Последовательные срезы толщиной 10 мкм ориентировали в горизонтальной плоскости и окрашивали гематоксилином-эозином, а также железным гематоксилином Гейденгайна по стандартной методике. Состояние максимальной диастолы моделировали с помощью хлорида калия по методике, описанной в [10].

Для создания пространственных моделей использовали 30-35 срезов с предварительным расчетом равномерного шага в зависимости от величины органа. После изготовления и обработки цифровых фотографий срезов в Photoshop CS2 изображения импортировались в программу AMIRA 5.0, подвергались трансляции и интерполированию кубическими сплайнами между каждой парой срезов. Пространственную реконструкцию проводили в соответствии с рекомендациями [1] с помощью Autodesk 3ds Max 8.0. В моделях анализировали внутренний рельеф правого и левого желудочков.

Результаты и их обсуждение

В исследовании проведена пространственная реконструкция полостей сердца куриных зародышей на 29-й и 35-й стадиях развития по (НН) (рис. 1, 2). Результаты волюметрического компьютерного анализа желудочков и предсердий, а также желудочкового миокарда были представлены в одной из наших предыдущих публикаций [5]. В настоящей работе проводили гистологическую и морфометрическую оценку внутреннего рельефа сердечных камер. Установлено, в частности, что у куриных эмбрионов к началу 6 суток инкубации (стадия 29 по НН)

структура трабекул правого и левого желудочков сердца была неодинаковой. Величина межтрабекулярных пространств свободной стенки правого желудочка (ПЖ) в области верхушки достигала 34 мкм, тогда как со стороны левого желудочка (ЛЖ) – не превышала 23 мкм. При этом трабекулы в ПЖ были длиннее (до 390 мкм), чем в ЛЖ (до 160 мкм), однако более тонкие (до 26 мкм – в ПЖ, до 35 мкм – в ЛЖ).

Толщина желудочкового миокарда сильно варьировала в обоих желудочках. Наибольшая толщина свободной стенки ПЖ отмечалась в верхушечной области, достигая 35 мкм, причем компактный миокард был представлен всего 3-4 рядами кардиомиоцитов. В стенке ЛЖ максимальная толщина (до 42 мкм) наблюдалась в промежуточной области камеры, где компактно расположенные кардиомиоциты формировали 5-6 рядов клеток.

Трабекулы на поперечных срезах были представлены округлыми структурами, состоящими из центрально расположенных рядов кардиомиоцитов, окруженных неструктурированным внеклеточным матриксом и плотной эндотелиальной «оболочкой». В трабекулах ПЖ кардиомиоциты имели диаметр 4-6 мкм и формировали от 4 до 8 клеточных рядов, тогда как левожелудочковые трабекулы содержали сердечные миоциты диаметром до 9 мкм. Прослойка внеклеточного матрикса была более тонкой в трабекулах ПЖ по сравнению с ЛЖ. Эндотелиоциты в обеих сердечных камерах существенно не различались и содержали крупное активное ядро, широкую периферическую зону, развитую базальную мембрану (рис. 3).

Межжелудочковая перегородка (МЖП) у эмбрионов на 29-й стадии развития по НН имела толщину от 85 мкм в наиболее тонкой базальной части до 240 мкм в верхушечной части перегородки. МЖП не содержала на своей поверхности морфологически обособленных трабекул и состояла из 3-5 листков кардиомиоцитов, окруженных широким пространством аморфного внеклеточного матрикса.

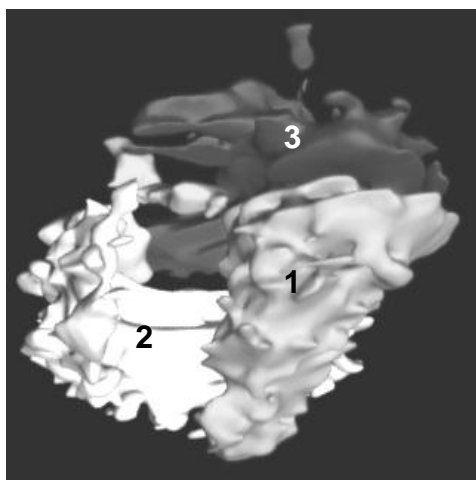


Рис. 1. Пространственная компьютерная модель сердца куриного эмбриона на 6-е сут инкубации (стадия 29 по НН). Фронтальная проекция. 1 – полость левого желудочка; 2 – полость правого желудочка; 3 – полость предсердий

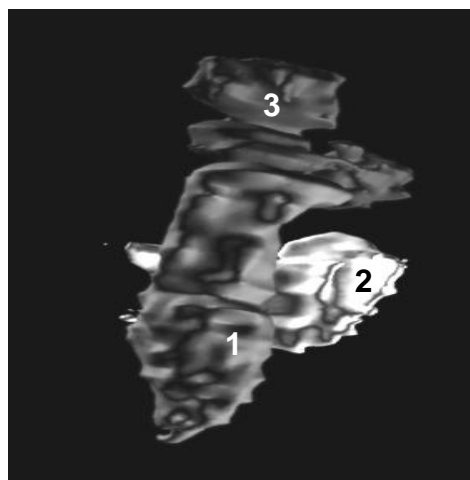


Рис. 2. Пространственная компьютерная модель сердца куриного эмбриона на 8-е сут инкубации (стадия 35 по НН). Проекция слева. 1 – полость левого желудочка; 2 – полость правого желудочка; 3 – полость предсердий

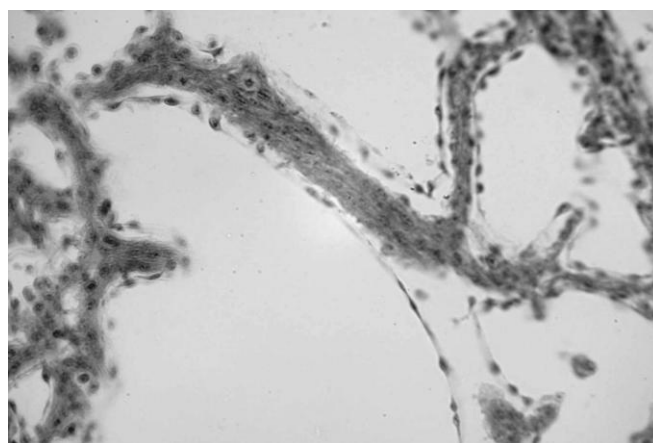


Рис. 3. Структура трабекул левого желудочка сердца куриного эмбриона на 6-е сут инкубации (стадия 29 по НН). Окраска гематоксилином и эозином. ×1500

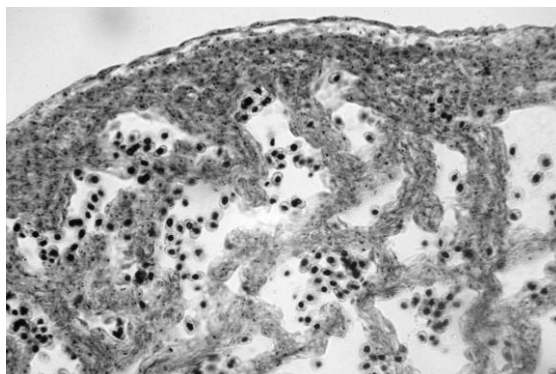


Рис. 4. Участок свободной стенки и трабекул правого желудочка сердца куриного эмбриона на 8-е сут инкубации (стадия 35 по НН). Окраска железным гематоксилином Гейденгайна. $\times 750$

Межтрабекулярные пространства расширились до 30 мкм. Ближе к основанию и у верхушки данные листки разветвлялись и были сгруппированы более плотно по сравнению с промежуточной частью МЖП. Эндотелиальная выстилка МЖП не отличалась существенно от таковой в области свободной стенки желудочков.

У куриных эмбрионов к концу 8 суток инкубации (стадия 35 по НН) трабекулы ПЖ и ЛЖ сердца сохраняли камероспецифичность, характерную для предыдущей стадии развития, однако существенно изменялись по сравнению с ней как по размерам, так и по составу. За счет уплотнения трабекулярного миокарда величина межтрабекулярных пространств свободной стенки ПЖ в области верхушки сокращалась до 28 мкм, в ЛЖ – до 16 мкм. Трабекулы в ПЖ существенно не изменялись по своей длине за прошедшие 2 суток инкубации, однако левожелудочковые трабекулы значительно удлинялись за этот период от 160 мкм до 350 мкм. Напротив, в ПЖ трабекулы заметно утолщались (от 26 мкм до 38 мкм), в ЛЖ – не изменялись.

На данной 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 максимальная толщина составляла 73 мкм в промежуточной области, где компактно расположенные кардиомиоциты формировали 12-15 клеточных рядов.

Трабекулы ПЖ содержали кардиомиоциты значительно большего диаметра, чем на стадии 29 по НН, хотя количество клеточных рядов нарастало умеренно – максимум до 8 (рис. 4). В трабекулах свободной стенки ЛЖ диаметр сократительных клеток и количество их рядов на поперечных срезах трабекул увеличивались незначительно по сравнению с предыдущей стадией развития. В трабекулах обеих камер наблюдалась выраженная редукция аморфного внеклеточного матрикса между кардиомиоцитами и эндотелием трабекул. Эндотелиоциты существенно не изменяли свою морфологию по сравнению с предыдущей изученной стадией развития, однако базальная мембрана заметно уплотнялась в обоих желудочках.

В составе МЖП сердца куриных эмбрионов на стадии 35 по НН наблюдалось значительное уплотнение листков кардиомиоцитов и увеличение их количества

во всех частях перегородки. Ширина межтрабекулярных пространств не превышала 15 мкм. За счет формирования более массивных клеточных пластов МЖП расширялась в верхушечной части до 410 мкм. В данной области субэндотелиальный внеклеточный матрикс выявлялся в виде тонкой прослойки, эндотелиальная выстилка истончалась и уплотнялась.

Выводы

По результатам проведенного исследования, в период с 29 по 35 стадию развития по НН в диастолическом сердце куриных эмбрионов внутренний рельеф правого желудочка изменялся в направлении сужения межтрабекулярных пространств и утолщения трабекул за счет увеличения диаметра кардиомиоцитов при стабильной длине трабекул. В левом желудочке на фоне стабильного диаметра трабекул происходило двукратное удлинение и увеличение их количества, приводящее к сужению межтрабекулярных пространств, а также утолщение компактного миокарда. Перспективы дальнейших исследований связаны с изучением внутреннего рельефа камер сердца в фазе систолы.

Литература

1. Твердохліб І.В. Просторова реконструкція біологічних об'єктів за допомогою комп'ютерного моделювання / І. В. Твердохліб // Морфологія. – 2007. – Т. 1, № 1. – С. 135-139.
2. 3D reconstructions as identification tool in heart development / A.T. Soufan [et al.] // Image Anal. Stereol. – 2001. – P. 193-198.
3. Changes in shear stress-related gene expression after experimentally altered venous return in the chicken embryo / B.C. Groenendijk [et al.] // Circ. Res. – 2005. – Vol. 96. – P. 1291-1298.
4. Flow in the early embryonic human heart: a numerical study / C.G. DeGroff [et al.] // Pediatr. Cardiol. – 2003. – Vol. 24. – P. 375-380.
5. Goodlett T. The volumetric analysis of cardiac chambers and three-dimensional cardiac reconstruction during chicken embryo cardiogenesis / T. Goodlett // Морфологія. – 2011. – Vol. 5, № 2. – P. 39-44.
6. Graphic and movie illustrations of human prenatal development and their application to embryological education based on the human embryo specimens in the Kyoto collection / S. Yamada [et al.] // Dev. Dyn. – 2006. – Vol. 235. – P. 468-477.
7. Hamburger V. A series of normal stages in the development of the chick embryo / Viktor Hamburger, Howard L. Hamilton // J. Morphol. – 1951. – Vol. 88, № 1. – P. 49-92.
8. Hiruma T. Formation of the pharyngeal arch arteries in the chick embryo: observations of corrosion casts by scanning electron microscopy / T. Hiruma, R. Hirakow // Anat. Embryol. (Berl). – 1995. – Vol. 191. – P. 415-423.
9. Howard C.V. Unbiased Stereology: Three-Dimensional measurement in microscopy / C.V. Howard, M.G. Reed // UK: BIOS Scientific Publishers. – 1998. – P. 39-44.
10. Improved preparation of chick embryonic samples for magnetic resonance microscopy / Xiaowei Zhang [et al.] // Magnetic Resonance in Medicine. – 2003. – Vol. 49. – P. 1192-1195.
11. Martinsen B.J. Reference guide to the stages of chick heart embryology / B.J. Martinsen // Developmental dynamics. – 2005. – Vol. 233. – P. 1217-1237.
12. Radio-isotopic in situ hybridization on tissue sections. Practical aspects and quantification / A. F. Moorman [et al.] // Methods Mol. Biol. – 2000. – Vol. 137. – P. 97-115.
13. Smith B. R. Magnetic resonance microscopy in cardiac development / B.R. Smith // Microsc. Res. Tech. – 2001. – Vol. 52. – P. 323-330.
14. Yamada S. Computerized Three-Dimensional analysis of the heart and great vessels in normal and holoprosencephalic human embryos / Shigehito Yamada // The anatomical record. – 2007. – Vol. 290. – P. 259-267.

**MORPHOLOGY OF THE INNER RELIEF OF CHICK EMBRYONIC
VENTRICULAR MYOCARDIUM AT 6-8 DAY INCUBATION**

T.A. Goodlett, I.V. Tverdokhle

Aim of this work was to create three-dimensional computer models of chick embryonic heart at 6-8 day incubation followed by a comparative assessment of ventricular inner relief. In the present study, we reconstructed and morphometrically analyzed the heart staged chick embryos with the aid of computer software and compared their structures for the further assay. We show that development of the inner relief is implemented in different ways in left and right ventricles.

Key words: chick embryonic heart, ventricular myocardium, three-dimensional computer modeling, inner relief.

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

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.