

© В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, 2009
УДК 612.646:612.17:636.57

В.Ф. Максимов и И.М. Коростышевская

РАЗВИТИЕ МИОКАРДА У КУРИНОГО ЭМБРИОНА ПРИ ОГРАНИЧЕНИИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ

Лаборатория микроциркуляции (зав. — канд. биол. наук В.И. Баранов) Научно-исследовательского института физиологии СО РАМН, г. Новосибирск

Исследование проведено с целью выяснения особенностей развития сердечной мышцы у куриных эмбрионов после закрытия на 11-е сутки инкубации половины поверхности скорлупы. К концу 3-х суток эксперимента (14-е сутки инкубации) в миокарде обнаруживаются гиперплазия мышечных клеток и ускорение их дифференцировки. Эти структурные перестройки, наряду с повышением кислородной емкости крови и усилением васкуляризации открытой части хориоаллантаоиса, компенсируют недопоставки кислорода и обеспечивают нормальный рост эмбриона. Через 1 нед эксперимента (18-е сутки инкубации) возможности структурной компенсации в сердце исчерпываются — появляются признаки дистрофии кардиомиоцитов, кардиосклероза и коронаросклероза, что сочетается с задержкой роста эмбрионов.

Ключевые слова: миокард, куриный эмбрион, гипоксия.

Согласно современным представлениям, развитие многих сердечно-сосудистых заболеваний определяется нарушением условий формирования, роста и дифференцировки системы кровообращения в эмбриогенезе. Гипоксия — один из важнейших факторов, влияние которого на жизненно важные органы, в том числе сердце и сосуды, традиционно изучается в модельных экспериментах на куриных эмбрионах. Одни исследователи обнаружили, что при хронической гипоксии относительная масса сердца возрастает [8, 10], другие — приводят противоположные данные [5, 9]. При этом морфогенез миокарда и его пластичность в неблагоприятных условиях остаются практически неисследованными.

Настоящая работа проведена с целью выявления особенностей развития миокарда с оценкой его компенсаторных возможностей у куриных эмбрионов при закрытии половины поверхности скорлупы.

Материал и методы. Работа выполнена на куриных эмбрионах породы Шавер-Род Айленд из Госплемптицезавода «Новосибирский». Яйца массой 55–70 г инкубировали при температуре 38–37,5 °C и влажности 56–40%. В экспериментальной серии на 11-е сутки инкубации половину скорлупы покрывали густой взвесью алюминиевой пудры в желтке и, не нарушая ориентации в пространстве, продолжали инкубацию вместе с яйцами контрольной серии. На 14-е и 18-е сутки яйца вскрывали вдоль большого экватора. Для гистологического исследования миокард стенки левого желудочка сердца эмбриона фиксировали в 10% забуференном формалине и обрабатывали по стандартной методике. Парафиновые срезы толщиной 2–5 мкм приготавливали на ультратоме LKB-3 (Швеция), окрашивали гематоксилином — эозином. Диаметр кардиомиоцитов измеряли окулярной линейкой с ценой деления 1,54 мкм при увеличении 700.

Относительный объем кардиомиоцитов в миокарде левого желудочка определяли с помощью квадратной тестовой решетки (289 точек, 0,018 мм² при увеличении 700). Для электронной микроскопии материал фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида и 2,0% параформальдегида, дополнительно фиксировали в 1,0% растворе четырехоксида осмия, заключали в смесь эпона и аралдита. Препараты контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM100S (Япония). При исходном увеличении 6000 с помощью квадратной тестовой решетки (72 точки) определяли относительные объемы оргanelл в кардиомиоцитах [1].

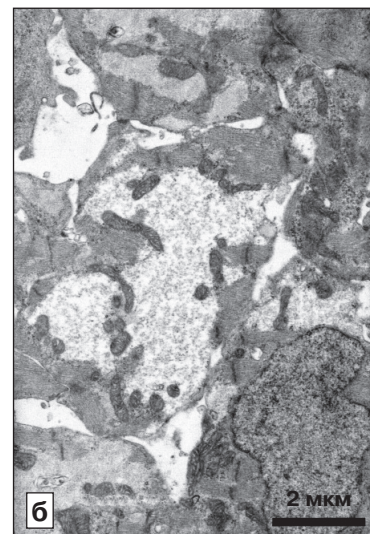
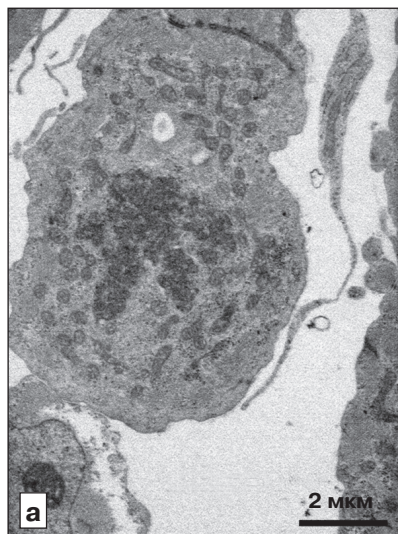
Вариационные ряды обрабатывали в пакете Statistica 6,0, результаты представляли в виде среднего значения и ошибки среднего. Значимость различий с контролем определяли с помощью критерия Стьюдента для независимых выборок при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Известно, что орган внешнего дыхания куриного эмбриона — хориоаллантаоисная оболочка (аналог плаценты млекопитающих) — полностью обрастает яйцо под скорлупой к середине эмбриогенеза (на 10-е сутки инкубации). Как следует из таблицы, исключение половины поверхности яйца из газообмена на 3 сут (11–14-е сутки инкубации) не отражается на массе эмбриона, абсолютной и относительной массе сердца, и эмбрионы визуально не отличаются от таковых в контроле.

В контроле на 14-е сутки эмбриогенеза субэпикардальная зона миокарда левого желудочка представлена отдельными клетками с широкими интерстициальными пространствами между ними. Под эндокардом миоциты группируются в рыхлые пучки по 6–10 клеток, но контактов между ними мало. Редкие тонкостенные капилляры располагаются только около мышечных пучков. Под элек-

Рис. 1. Кардиомиоциты левого желудочка сердца контрольного куриного эмбриона на 14-е сутки инкубации.

а — митотически делящийся кардиомиоцит; б — малодифференцированные кардиомиоциты. В цитоплазме мало миофибрилл и митохондрий, много гликогена.



тронным микроскопом кардиомиоциты имеют на срезах неправильные очертания, почти не ориентированы, примерно половину площади среза клетки занимает ядро. Интерфазные ядра округлой формы практически не содержат гетерохроматина, окружены четкой оболочкой с многочисленными порами. В них зачастую располагаются от двух до четырех крупных рыхлых ядрышек. Повсеместно в кардиомиоцитах отмечаются фигуры митоза (рис. 1, а), встречаются двуядерные клетки. В цитоплазме большинства кардиомиоцитов имеются обширные зоны, заполненные гликогеном, а по периферии располагаются немногочисленные тонкие неупорядоченные миофибриллы. Митохондрии группируются в основном в околоядерной области. Они мелкие, неправильной формы, с немногочисленными кристами (см. рис. 1, б). В зоне комплекса Гольджи обнаруживаются округлые электронно-плотные образования, похожие по размерам и строению на секреторные гранулы или первичные лизосомы.

У подопытных эмбрионов миокард левого желудочка на 14-е сутки инкубации выглядит значительно более дифференцированным, чем в контроле — фигуры митоза встречаются реже, при одинаковом диаметре кардиомиоцитов показатели стромально-миоцитарных отношений в нем сопоставимы с таковыми у 18-суточных контрольных эмбрионов (см. таблицу). Многочисленные коронарные сосуды четко дифференцируются на артерии, вены и капилляры. Архитектоника миокарда, под эпикардом сходна с таковой у контрольных эмбрионов того же срока развития, а внутриклеточные и тканевые перестройки более отчетливы в глубине стенки сердца, где кардиомиоциты собраны в пучки, имеют вытянутую форму, связаны между собой вставочными дисками и частыми боковыми контактами. В цитоплазме органеллы располагаются компактно, при этом свободной гиалоплазмы и гликогена типичного строения остается мало, что подтверждают результаты морфометрии (см. таблицу). Миофибрилл довольно много, они достаточно толстые, ориентированы вдоль длинной клетки и имеют четкую структуру саркомеров.

Митохондрии преимущественно располагаются в околоядерной области (рис. 2, а). Здесь же в зоне комплекса Гольджи в расширенных цистернах и около них среди многочисленных пузырьков чаще, чем в контроле, обнаруживаются секреторные гранулы.

На 18-е сутки инкубации у контрольных эмбрионов кардиомиоциты группируются в пучки по 8–10 клеток. Пространства между мышечными пучками содержат клетки фибробластического и макрофагального ряда, коллагеновые волокна, сосуды разного типа и миелоноподобные структуры. Вокруг мышечного пучка располагаются, как правило, 1–2 капилляра, внутри пучков сосудов практически нет. В мышечных пучках клетки соединены короткими редкими (по 3–4 на периметр среза клетки) боковыми контактами по типу десмосом. Среди кардиомиоцитов преобладают клетки вытянутой, иногда веретенообразной формы с электронно-плотной цитоплазмой и центрально расположенным овальным ядром. Под сарколеммой и по всей цитоплазме располагаются довольно толстые пучки миофибрилл типичного строения. В цитоплазме около полюсов ядра сосредоточены неравномерно расширенные цистерны и окаймленные пузырьки комплекса Гольджи, полирибосомы, агранулярная и гранулярная эндоплазматическая сеть и многочисленные митохондрии (см. таблицу). Последние имеют электронно-плотный матрикс и широкие межкристистые пространства.

К концу 7-х суток эксперимента (18-е сутки инкубации) все весовые показатели (масса тела, абсолютная и относительная масса сердца) эмбриона отстают от контрольных значений. Визуально отмечается расширение полости левого желудочка, и морфометрия показывает, что средний диаметр кардиомиоцитов значимо меньше такового в контроле (см. таблицу). Выявляется комплекс

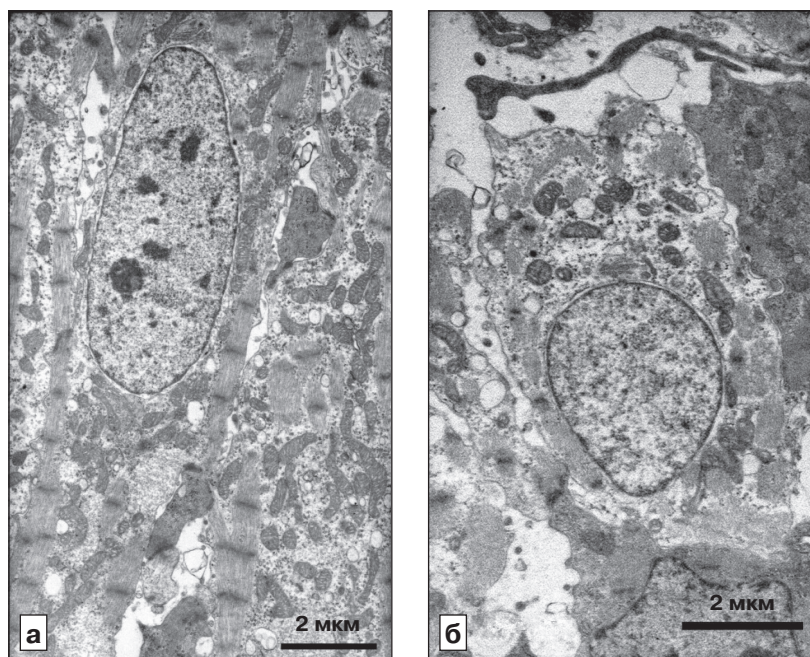


Рис. 2. Кардиомиоциты левого желудочка сердца куриных эмбрионов после 3 (а) и 7 (б) сут эксперимента с закрытием половины поверхности яйца.

а — кардиомиоциты на 14-е сутки инкубации; б — кардиомиоцит с признаками внутриклеточного лизиса на 18-е сутки инкубации.

патогистологических изменений, среди которых наиболее очевидны разволокнение мышечных пучков и расширение интерстициальных пространств, которые заполнены соединительной тканью с толстыми пучками коллагеновых волокон. Отмечается чрезвычайно мощная васкуляризация всех слоев миокарда, при этом капилляры располагаются внутри мышечных пучков, тесно контактируя с кардиомиоцитами. Стенки крупных коронарных артерий утолщены за счет мышечной оболочки, просветы сосудов всех калибров зияют.

Все это проявляется сдвигом стромально-миоцитарных отношений в пользу стромы (см. таблицу).

Около половины кардиомиоцитов имеют такую же ультраструктурную организацию, как в контроле. Их отличительной особенностью можно считать обилие секреторных гранул в зоне комплекса Гольджи. Вперемежку с такими клетками располагаются кардиомиоциты с явными признаками внутриклеточного лизиса. Цитоплазма выглядит просветленной из-за почти полного исчезновения гликогена и рыхлого расположения органелл. В ней много вакуолей, секвестров и миелоноподобных структур, встречаются жировые включения. Миофибриллы почти всегда фрагментированы, плотность миофиламентов и линий Z снижена. В некоторых кардиомиоцитах миофибриллы истончены и располагаются только под сарколеммой. Саркоплазматическая сеть расширена, а местами

Характеристика миокарда левого желудочка у куриных эмбрионов при инкубации яиц с закрытой половиной скорлупы

Параметр	14-е сутки		18-е сутки	
	Контроль [7]	Закрытие 50% [7]	Контроль [9]	Закрытие 50% [5]
Масса эмбриона, г	9,21±0,25	9,4±0,3	23,6±0,4	18,5±1,1*
Масса сердца, мг	74±4	84,9±2,5	135±6	117±8
Относительная масса сердца, мг/г	8,4±0,5	9,51±0,23	6,31±0,23	4,7±0,4*
Диаметр кардиомиоцитов, мкм	4,4±0,12 (45)	4,50±0,11 (60)	3,70±0,11 (45)	3,40±0,11 (60)*
V _v кардиомиоцитов, %	54,8±0,7 (50)	84,5±0,3 (50)*	80,5±0,6 (50)	75,3±0,5 (60)*
V _v стромы/ V _v кардиомиоцитов	0,841±0,025	0,180±0,005 *	0,24±0,10	0,330±0,008 *
V _v ядра/ V _v цитоплазмы	0,46±0,04 (15)	0,53±0,03 (31)	0,321±0,020 (24)	0,380±0,021 (22)
V _v миофибрилл, %	33,0±0,8 (87)	43,1±0,7* (90)	48,2±0,8 (90)	49,0±1,0 (82)
V _v митохондрий, %	26,5±0,5	25,4±0,4	32,0±0,5	32,5±0,6
V _v митохондрий/ V _v миофибрилл	0,84±0,03	0,610±0,021*	0,681±0,020	0,70±0,03
V _v комплекса Гольджи, %	14,8±0,4	12,8±0,3*	6,10±0,21	6,0±0,23
V _v гликогена, %	12,9±0,6	8,6±0,4*	5,4±0,3	4,10±0,17*
V _v остальной цитоплазмы, %	12,8±0,4	10,1±0,4*	8,3±0,5	8,5±0,7
Количество митохондрий/10 мкм ²	6,50±0,17	5,40±0,15*	5,10±0,11	5,71±0,17*

Примечание. В квадратных скобках — число эмбрионов; в круглых скобках — число измерений; V_v — относительный объем.

* Различия по сравнению с контролем значимы при P<0,05.

вакуолизирована. Митохондрии самой разнообразной формы, значительно набухшие, часто сливаются (см. рис. 2, б).

Фигуры митоза кардиомиоцитов на 18-е сутки инкубации в контроле и в опыте встречаются значительно реже, чем у 14-суточных эмбрионов. Зато во всех сериях среди кардиомиоцитов имеются единичные мышечные клетки с признаками дегенерации. В электронно-плотной гомогенной цитоплазме плохо просматриваются миофибриллы и другие структуры. Ядро уплотнено и имеет размытую структуру. Клеточные контакты отсутствуют.

Обсуждение полученных данных. Ранее нами было дано обоснование модельного эксперимента и показано, что после закрытия половины поверхности скорлупы газонепроницаемым слоем в середине эмбриогенеза куриные эмбрионы испытывают гипоксию. В этих условиях через 3 сут в 1,5 раза возрастают показатели гематокрита и содержания гемоглобина в крови, увеличивается объем сосудистого русла в открытой зоне хориоаллантоисной оболочки [2]. Исследователи описывают подобные реакции при других моделях хронической гипоксии и склонны считать их отражением истинной гипоксемии [5, 6].

Проведенные морфологические и количественные исследования миокарда свидетельствуют об его усиленном развитии и ускоренной дифференцировке, что обеспечивает достаточно полную компенсацию гипоксии и нормальный рост эмбриона в первые 3 сут опыта. В этих условиях к сердечной мышце предъявляется повышенная нагрузка, что достигается мобилизацией запрограммированных морфогенетических механизмов. Обнаруженная нами на 14-е сутки инкубации гиперплазия кардиомиоцитов свидетельствует о первоочередном подключении пролиферативных резервов для усиления работы сердца. По данным П.П. Румянцева [4], в норме пролиферативный пул кардиомиоцитов эмбрионов кур составляет на 5-е сутки инкубации около 100%, постепенно снижается до 45% к 16-м суткам и быстро исчерпывается вскоре после вылупления. Отмеченные нами ультраструктурные изменения гиперплазированных кардиомиоцитов (сбалансированное накопление миофибрилл и митохондрий, уменьшение содержания гликогена) традиционно рассматриваются как признаки их дифференцировки. Обнаруженная обильная васкуляризация миокарда у эмбрионов экспериментальной серии тоже способствует усилению насосной функции сердца. Другие авторы также предполагают, что умеренная гипоксия в эмбриогенезе может ускорять рост левого желудочка, увеличивая ско-

рость гиперплазии клеток или продлевая ее период, но механизм этого явления остается непонятным [10]. Эта компенсаторная стратегия принципиально отличается от реагирования взрослого организма, когда в сердце в ответ на гипоксию и любой другой стресс наблюдается увеличение размеров клеток без увеличения их числа и сопровождается гипертрофией сократительных структур в них [3].

Через 1 нед эксперимента структурная компенсация сердечно-сосудистой системы эмбриона оказывается уже исчерпанной и неспособной обеспечивать возрастающие метаболические запросы растущего организма. Это доказывается гипотрофией эмбрионов на 18-е сутки инкубации и тем, что ни один цыпленок из подопытной серии не смог самостоятельно вылупиться из яйца. Признаки декомпенсации в сердце обнаруживаются на всех уровнях: органном (снижение массы, расширение полости левого желудочка), тканевом (кардиосклероз, коронаросклероз), клеточном (уменьшение диаметра кардиомиоцитов), ультраструктурном (частичный внутриклеточный лизис). Эти данные согласуются с результатами, полученными L. Mancini и соавт. [7], которые у эмбрионов, инкубированных в условиях гипоксии в период с 3-х по 18-е сутки, обнаружили утолщение эпикарда и его обильную васкуляризацию, истончение миокарда за счет гипотрофии кардиомиоцитов и уменьшения содержания в них миофибрилл. Увеличение плотности расположения и расширения сосудов в сердце по сравнению с контролем авторы трактуют как адаптационные перестройки в ответ на гипоксию.

Известно, что в эмбриогенезе гуморальные, а не нервные факторы играют более существенную роль, чем во взрослом организме. В связи с этим, интересны наблюдения о наличии большого количества секреторных гранул в кардиомиоцитах левого желудочка в экспериментальных сериях по сравнению с контролем. Считается, что в гранулах содержится предсердный натрийуретический гормон, который на ранних этапах эмбриогенеза продуцируется всеми кардиомиоцитами, а затем по мере дифференцировки эндокринная функция в желудочках сердца постепенно затухает и сохраняется после рождения преимущественно в менее дифференцированных предсердных клетках [11]. Возможно, имеет место усиление его роли в морфогенезе сердечно-сосудистой системы при гипоксии.

Таким образом, ограничение внешнего дыхания на первом этапе ускоряет морфогенез в сердце эмбриона, затем эта стратегия исчерпывает себя и проявляется деструктивными процессами на всех уровнях организации миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., Медицина, 1990.
2. Максимов В.Ф. и Коростышевская И.М. Развитие газотранспортных систем куриного эмбриона в условиях ограничения дыхательной поверхности яйца. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова, 2007, т. 93, № 12, с. 1413–1422.
3. Непомнящих Л.М. Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце. Новосибирск, Наука, 1991.
4. Румянцев П.П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л., Наука, 1982.
5. Chan T. and Burggen W. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows on the embryo of the chicken (*Gallus gallus*). *Resp. Physiol. Neurobiol.*, 2005, v. 145, p. 251–263.
6. Dzialowski T.M., von Plettenberg D., Elmonoufy N.A. et al. Chronic hypoxia alters the physiological and morphological trajectories of developing chicken embryos. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2002, v. 131, № 4, p. 713–724.
7. Mancini L., Bertossi M., Ribatti D. et al. The effects of long-term hypoxia on epicardium and myocardium in developing chick embryo hearts. *J. Microcirc. Clin. Exp.*, 1991, v. 10, № 4, p. 3591–371.
8. Rouwet E.V., Tintu A.N., Schellings M.W.M. et al. Hypoxia induces aortic hypertrophic growth, left ventricular dysfunction, and sympathetic hyperinnervation of peripheral arteries in the chick embryo. *Circulation*, 2002, v. 105, p. 2791–2796.
9. Ruijtenbeek K., Kessels L.C.G.A., DeMey J.G.R. et al. Chronic moderate hypoxia and protein malnutrition both induce growth retardation, but have distinct effects on arterial endothelium-dependent reactivity in the chicken embryo. *Pediatr. Res.*, 2003, v. 53, № 4, p. 573–579.
10. Villamor E., Kessels C.G., Ruijtenbeek K. et al. Chronic in ovo hypoxia decreases pulmonary arterial contractile reactivity and induces biventricular cardiac enlargement in the chicken embryo. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004, v. 287, № 3, p. R642–651.
11. Wei Y., Rodi C.P., Day M.L. et al. Developmental changes in the rat atriopeptin hormonal system. *J. Clin. Invest.*, 1987, v. 79, p. 325–329.

Поступила в редакцию 16.06.08

Получена после доработки 16.11.08

MYOCARDIUM DEVELOPMENT IN CHICK EMBRYO DURING EXTERNAL RESPIRATION RESTRICTION

V.F. Maksimov and I.M. Korostyshevskaya

The purpose of the present study was to determine the peculiarities of myocardium development in the chick embryos after closure of the half of the eggshell surface on day 11 of incubation. By the end of experimental day 3 (day 14 of incubation), myocardium demonstrated muscle cell hyperplasia and acceleration of their cytodifferentiation. These structural remodeling together with the oxygen blood capacity augmentation and increased vascularization of the intact part of the chorioallantoic membrane, compensate for the oxygen deprivation and provide for the embryo normal growth. By experimental day 7 (day 18 of incubation) the heart structural adaptive resources seem to be exhausted – the morphological signs of cardiomyocyte dystrophy, cardiac and coronary sclerosis, and marked embryo growth retardation were detected.

Key words: *myocardium, chick embryo, hypoxia.*

Laboratory of Microcirculation, State Research Institute of Physiology, RAMS Siberian Branch, Novosibirsk.