

**М.А.Машталир
И.В.Твердохлеб**

Днепропетровская государственная медицинская академия

Ключевые слова: сердце, куриный зародыш, этанол, аномалии развития, задержка развития.

Надійшла: 18.02.2008
Прийнята: 16.03.2008

УДК 611.12:611.012-02:547.262]-092.9

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНОМАЛЬНОГО КАРДИОГЕНЕЗА У КУРИНОГО ЗАРОДЫША ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА: КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ОБЩИМ РАЗВИТИЕМ И РАЗВИТИЕМ СЕРДЦА

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских работ «Морфогенез сердца и сосудов после экспериментальных воздействий» (номер государственной регистрации 0106U012193) и „Анализ нормального и аномального гистогенеза тканевых компонентов сердечно-сосудистой системы человека и экспериментальных животных” (номер государственной регистрации 0105U007837).

Резюме. Целью работы было изучить морфологические изменения в формировании камер сердца и выделить типы нарушений в зависимости от задержки развития зародыша и наличия внесердечных аномалий. Яйца кур бройлеров кросса Cobb 500 обрабатывали в начале 4 суток инкубации 0,2-0,25 мл 50% этанола, исследования зародышей проводили в конце 4, 5 и 7 суток. Мы выделили следующие типы нарушений развития сердца, как правило, включающие общую задержку развития органа или его частей: 1) задержка развития органа без аномалий на фоне общего нормального развития; 2) задержка развития органа с аномалиями на фоне общего нормального развития; 3) задержка развития органа без аномалий на фоне общего недоразвития; 4) задержка развития органа с аномалиями на фоне общей задержки развития зародыша; 5) задержка развития органа с аномалиями на фоне аномального развития зародыша без задержки; 6) задержка развития органа с аномалиями на фоне аномального и задержанного развития зародыша. Наиболее частыми были 4 и 6 тип нарушений, самыми редкими – 1 и 3, что свидетельствует об увеличении частоты сердечных аномалий при тенденции к отставанию в общем развитии и формированию внесердечных аномалий.

Морфологія.- 2008.- Т.ІІ, №2.- С.35-42.

© М.А.Машталир, И.В.Твердохлеб, 2008

Mashtalir M.A., Tverdokhleba I.V. The morphological aspects of the abnormal cardiogenesis in chicks after ethanol treatment: the correlations between whole embryo and heart development.

Summary. The purpose of the current study was to determine the morphological changes in heart chambers and reveal the types of abnormalities depending on the growth retardation of embryo and extracardiac anomalies. The chick embryos of broilers of Cobb 500 cross were treated by 0,2-0,25 ml 50% ethanol at the beginning of 4 days of incubation, embryos were taken in the end of 4, 5 and 7 days. We revealed the following types of abnormal development of heart mostly with retardation of whole heart or its some parts development: 1) without heart anomalies and normal development of embryo; 2) with heart anomalies and normal development of embryo; 3) without heart anomalies with growth retardation of embryo; 4) with heart anomalies and growth retardation of embryo; 5) with heart anomalies with anomalous development of the whole embryo without retardation; 6) with heart anomalies with anomalous and disturbed development of embryo. Most frequent types were a 4 and 6, the rarest – 1 and 3. We suggest that the growth retardation of embryo and extracardiac abnormalities increase the risk of cardiac anomalies.

Key words: heart, chick embryo, ethanol, abnormal development, growth retardation.

Введение

Изучение моделей врожденных пороков сердца на животных дает возможности рассмотрения различных аспектов аномального кардиогенеза, в частности, механизмы их формирования, молекулярно-биологические закономерности. Этаноловая модель для изучения пороков

развития сердечно-сосудистой системы была предложена Т.Т. Fang с соавторами (1987).

В настоящее время установлено, что различные кроссы кур, используемых в моделях аномального кардиогенеза демонстрируют разную чувствительность к тератогенам, особенно, если влияние его связано с процессами миграции

клеток нервного гребня (Cavieres M.F., Smith S.M., 2000; Dedelak K.A., Smith S.M., 2000). Важным, но практически оставшимся без внимания исследователей, остается вопрос о соответствиях в развитии сердца и зародыша в целом и насколько сердечные аномалии коррелируют с внешними уродствами и/или задержкой развития. Одна из фундаментальных работ в этом направлении проведена J.Manner с сотрудниками (1993), которые установили взаимосвязь между головным сгибанием зародыша и развитием сердца. В моделях с применением химических тератогенов такие корреляции проведены не были.

Цель нашего исследования: изучить морфологические изменения в формировании камер сердца и выделить типы нарушений в зависимости от задержки развития зародыша и наличия внесердечных аномалий.

Материалы и методы

Яйца кур бройлеров кросса Cobb 500 инкубировали при 38°C, относительной влажности 80%. Забор интактных (30) и экспериментальных эмбрионов (134) осуществлялся в конце 4, 5 и 7 суток. Для получения тератогенного эффекта в воздушную камеру яиц в начале 4-х суток инкубации вводили 0,2-0,25 мл 50%-ного этанола, доза выбрана по данным T.T.Fang с соавторами (1987). Яйца запечатывались и инкубировались как обычно. После забора зародыша определяли стадию развития по Hamburger, Hamilton (НН) и разделяли зародышей на группы в зависимости от наличия задержки развития и внешних аномалий. Из каждой группы случайным образом отбирали зародышей (только живых) для приготовления серийных срезов (всего 38 эмбрионов). Серийные срезы, сделанные в поперечном направлении, были окрашены гематоксилином-эозином, железным гематоксилином, по Сиддмену на выявление кислых гликозаминогликанов, на гликоген по Мак-Манусу.

При гистологическом исследовании на 4 и 5 сутки обращали внимание на место впадения венозного синуса, форму и объем предсердий, толщину стенки, строение и толщину межпредсердной перегородки (МПП), форму атриовентрикулярных (АВ) подушек, характер распределения клеток в них, объем и толщину стенки правого и левого желудочков (ПЖ и ЛЖ), характер трабекуляции, наличие межжелудочковой перегородки (МЖП), ее строение, форму и направление конусно-стволовой части (КСЧ) сердца, распределение мезенхимных клеток в ней, уровень миграции плотной мезенхимы, количество апоптотических клеток в АВ отделе и КСЧ.

На 7 сутки обращали внимание на форму и объем предсердий, толщину стенки, строение и толщину МПП, распределение мезенхимы в области митрального и правого АВ клапана, характер распределения клеток в них, объем и толщи-

ну стенки ПЖ и ЛЖ, характер трабекуляции, строение МЖП, положение КСЧ, степень развития перегородки КСЧ, распределение мезенхимных клеток в ее подушках, уровень миграции плотной мезенхимы, количество апоптотических клеток в АВ отделе и КСЧ.

Развитие сердца считалось нормальным, когда оно соответствовало уровню развития зародыша по НН. Это относилось и к тем случаям, когда зародыш вследствие введения этанола имел отставание в развитии. Задержка развития органа без аномалий определялась в случаях, когда степень развития всех камер сердца отставала от наблюдаемой в норме для определенной стадии развития зародыша.

Задержку развития органа с аномалиями констатировали в случаях, когда один или два отдела существенно отставали от уровня развития других камер или они имели значительные деформации на фоне задержки развития.

Результаты и их обсуждение

На 4 сутки контрольные зародыши достигали 23-25 стадий развития по НН, экспериментальные задерживались на 21-22 стадиях, они попадали в группу имеющих отставание в развитии (табл. 1) либо достигали 23 стадии развития и тогда они считались не имеющими отставания.

Из трех исследованных зародышей на 4 сут инкубации, имеющих отставания в общем развитии без внешних аномалий (табл.1), 2 (66, 7%) имели признаки гипотрофии предсердных и желудочковых камер сердца. Это сопровождалось усилением рисунка желудочковой трабекуляции и уменьшением полостей обоих желудочков. Развитие мезенхимных структур в одном случае мало отличалось от нормы, а в другом несколько отставало и более соответствовало характеру развития предсердных и желудочковых камер. Распределение мезенхимных клеток в АВ подушках и эндокардиальных подушках КСЧ не отличались от нормального, но отличалось несколько сниженной их плотностью. Наблюдалась задержка миграции плотной мезенхимы от жаберных дуг в ствол сердца. Не было также признаков формирования МЖП. Один из зародышей (33,3%) не имел нарушений в развитии камер сердца и эндокардиальных структур.

Из трех исследованных зародышей на 4 сут инкубации без отставания в общем развитии и без внешних аномалий у 2 (66,7%) сердце было развито без каких-либо отличий от нормы для соответствующей стадии развития. 1 (33,3%) зародыш демонстрировал незначительную гипотрофию мезенхимных структур, в большей степени АВ подушек.

На 4 сут инкубации оба зародыша (100%) из группы эмбрионов, имеющих отставания в общем развитии и внешние аномалии в виде недоразвития головного отдела, имели значительные нарушения в развитии сердца. У одного из них

также наблюдалась anomальная торсия, у другого – сращение головного отдела с передней грудной стенкой. Обращала на себя внимание резкая задержка конвергенции краниального и каудального концов сердца, что приводило к увеличению расстояния между КСЧ и предсердным отделом, изменению формы желудочкового отдела сердца. При этом КСЧ приобретал более вертикальное направление. Мезенхимные структуры были су-

щественно недоразвиты по сравнению с нормой для соответствующей стадии развития. Незначительное количество мезенхимных клеток в АВ подушках указывало на задержку эпителио-мезенхимной трансформации, которая является основным процессом, определяющим формирование мезенхимных структур сердца (Markwald R. et al., 1996).

Таблица 1

Распределение куриных зародышей в зависимости от наличия аномалий сердца на 4, 5 и 7 сут инкубации

Общее и внешнее развитие	Соответствие развития сердца стадии по НН	Наличие аномалий сердца	4 сут	5 сут	7 сут	Всего
нормальное	соответствует	– +	2 (20%)	2 (13,3%)	1 (7,7%)	5 (13,2%)
	отстает	– (1 тип) + (2 тип)	1 (10%)	1 (6,7%) 2 (13,3%)	3 (23,3%)	1 (2,6%) 6 (15,8%)
отставание	соответствует	– +	1 (10%)	1 (6,7%)		2 (5,3%)
	отстает	– (3 тип) + (4 тип)	1 (10%) 1 (10%)	3 (20%)	4 (30,8%)	1 (2,6%) 8 (21,1%)
аномальное без отставания	соответствует	– +				
	отстает	– + (5 тип)	2 (20%)	3 (20%)	1 (7,8%)	6 (15,8%)
аномальное с отставанием	соответствует	– +				
	отстает	– + (6 тип)	2 (20%)	3 (20%)	4 (30,8%)	9 (23,7%)
Итого			10	15	13	38

На 4 сутки инкубации зародыши из группы не имеющих отставания в развитии и с внешними аномалиями, достигали 23-24 стадии по НН (табл.1). У одного из них наблюдалась гиперфлексия. При гистологическом исследовании обнаружилось, что она обусловлена сращением головной части зародыша с грудной, вследствие

чего произошло вытягивание грудной части туловища и увеличение кранио-каудальных размеров сердца, а также расширение его камер (вынужденная дилатация). Верхушка сердца была обращена дорсально, а не каудально, как в норме (рис. 1).

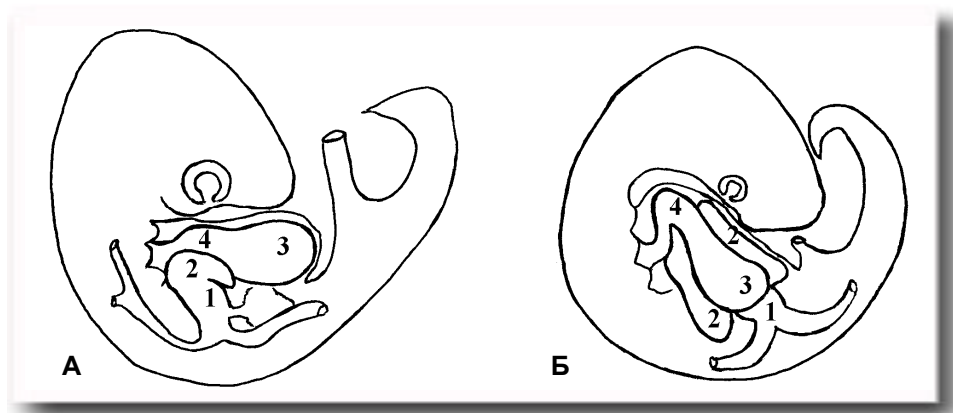


Рис. 1. Схема положения отделов сердца куриного зародыша на 4 сут инкубации в норме (А) и после воздействия этанола, случай со сращением головного отдела и передней грудной стенки (Б).
1 – венозный синус, 2- предсердный отдел, 3 – желудочек, 4 – конусно-стволовой отдел.

Выпускной тракт был удлинён и формировал петлю, верхушка которой была обращена краниально. Венозный синус открывался на дорсо-латеральной поверхности ПП (в норме – на дорсальной). Форма предсердий и МПП была атипичной, толщина их стенки была уменьшенной. Полости ЛЖ и ПЖ были расширены, стенка их истончена. Встречались участки, где толщина компактного слоя между местами начала трабекул не превышала одной клетки. Трабекулы в обоих желудочках были расположены менее густо, чем в норме, что является следствием дилатации. Рисунок трабекул и характер их анастомозирования также был изменённым. МЖП не была сформирована. Аномальная форма КСЧ сочеталась с задержкой миграции плотной мезенхимы.

Другой зародыш, имеющий ослабление флексии и аномальную торсию, имел нарушения развития сердца, близкие к описанным в группе с задержкой общего развития и внешними аномалиями. По-видимому, нарушения флексии в данной модели приводят к нарушениям конвергенции концов сердца, что было также описано в исследованиях (Manner et al., 1993).

На 5 сутки контрольные зародыши достигали 26-28 стадий развития по НН, часть экспериментальных эмбрионов задерживались на 21-25 стадиях.

У трех (75%) из четырех исследованных зародышей на 5 сут инкубации, имеющих отставания в общем развитии без внешних аномалий, сердце не имело признаков отставания в росте и формировании камер для соответствующей стадии развития. Обращала на себя внимание некоторая гипотрофичность АВ подушек и подушек конуса и ствола сердца, а также недостаточная заполненность их мезенхимными клетками. В одном случае (25%) развитие сердца соответствовало стадии развития зародыша и на микроскопическом уровне нарушения не наблюдались. У половины зародышей на 5 сут, не имеющих задержки в развитии, наблюдалось отставание в формировании конусно-стволового отдела, количество апоптотических клеток было сниженным в АВ эндокардиальных структурах и подушках ствола и конуса. В одном случае наблюдалось снижение трабекулированности желудочков. Два других зародыша (50 %) не демонстрировали нарушений в положении камер и их развитии.

В группе с отставанием в общем развитии и внешними аномалиями 3 зародыша имели резкие нарушения в формировании отделов сердца. Во всех этих случаях предсердия имели уменьшенный объем и аномальную форму. В МПП наблюдалось аномальное распределение мезенхимы, уменьшенный передне-задний размер вследствие деформации предсердий. АВ подушки имели выраженные деформации (см. рис. 3, 2г). Гипо-

трофию ЛЖ и ПЖ можно было констатировать во всех рассмотренных случаях, так как уровень развития желудочков не соответствовал стадии развития по НН. В обоих желудочках наблюдался более или менее выраженный аномальный характер трабекуляции. Отсутствие МЖП и перегородок КСЧ указывало на отставание формирования сердца относительно уровня общего развития. Плотная мезенхима, происходящая из нервного гребня, задерживалась на уровне аортального мешка. Наблюдалась существенная задержка конвергенции концов сердца. Для анализа нарушений в положении камер в случае, показанном на рис.2, использовали сердце нормального 4 суточного зародыша. В этом случае предсердные и желудочковые камеры сердца имели уменьшенный объем, также наблюдалась задержка конвергенции концов сердца.

В группе без отставания в общем развитии и внешними аномалиями все зародыши имели в разной степени выраженные изменения в камерах сердца, АВ канале и КСЧ. Наблюдалась деформация МПП (рис. 2, 2б, 2в). Количество апоптотических клеток было сниженным во всех мезенхимных структурах, также происходила задержка миграции плотной мезенхимы.

На 7 сутки контрольные зародыши достигали 30-32 стадий развития по НН. Во всех исследованных сердцах из группы экспериментальных зародышей, кроме одного из группы без отставания и внешних аномалий, наблюдались различные нарушения на фоне гипотрофичности органа по отношению к стадии развития. В случаях дилатации камер сердца и выпускных сосудов (2 случая (15,4%) в группе с отставанием и внешними аномалиями), также наблюдались признаки общего недоразвития сердца. В этой и в других группах наблюдались изменения в виде уменьшения толщины миокарда во всех отделах сердца, нарушения в формировании предсердных и желудочковых трабекул, задержка редукции миокарда КСЧ, снижении количества апоптотических клеток. Нарушения в закрытии МЖО наблюдались у 10 (76,9%) из 13 зародышей (рис.3). При сопоставлении этих данных с ранее опубликованными нашими данными о распределении пороков развития сердца на 8 сутки инкубации (Машталір М.А., 2006), мы делаем вывод о том, что ДМЖП можно диагностировать на 7 сутки развития куриного зародыша (32 стадия по НН).

В 4 (30,7%) случаях (группа с отставанием в развитии: 2 – с аномалиями, 2 – без аномалий) МЖП имела не трабекулярное, а скорее губчатое строение с тонкими мышечными перегородками и значительными прослойками матрикса вокруг них. АВ клапаны значительно отставали в развитии. Трабекулы желудочков формировали крупноячеистую сеть, сходную с губчатым миокардом. В одном случае легочной ствол был атрезирован и демонстрировал нарушение целостности

стенки по вентральной полуокружности с кровоизлиянием в субэпикард (рис.4). Возможно, что в

этом случае мы наблюдали левосформированное сердце (порок, не зависящий от этанола).

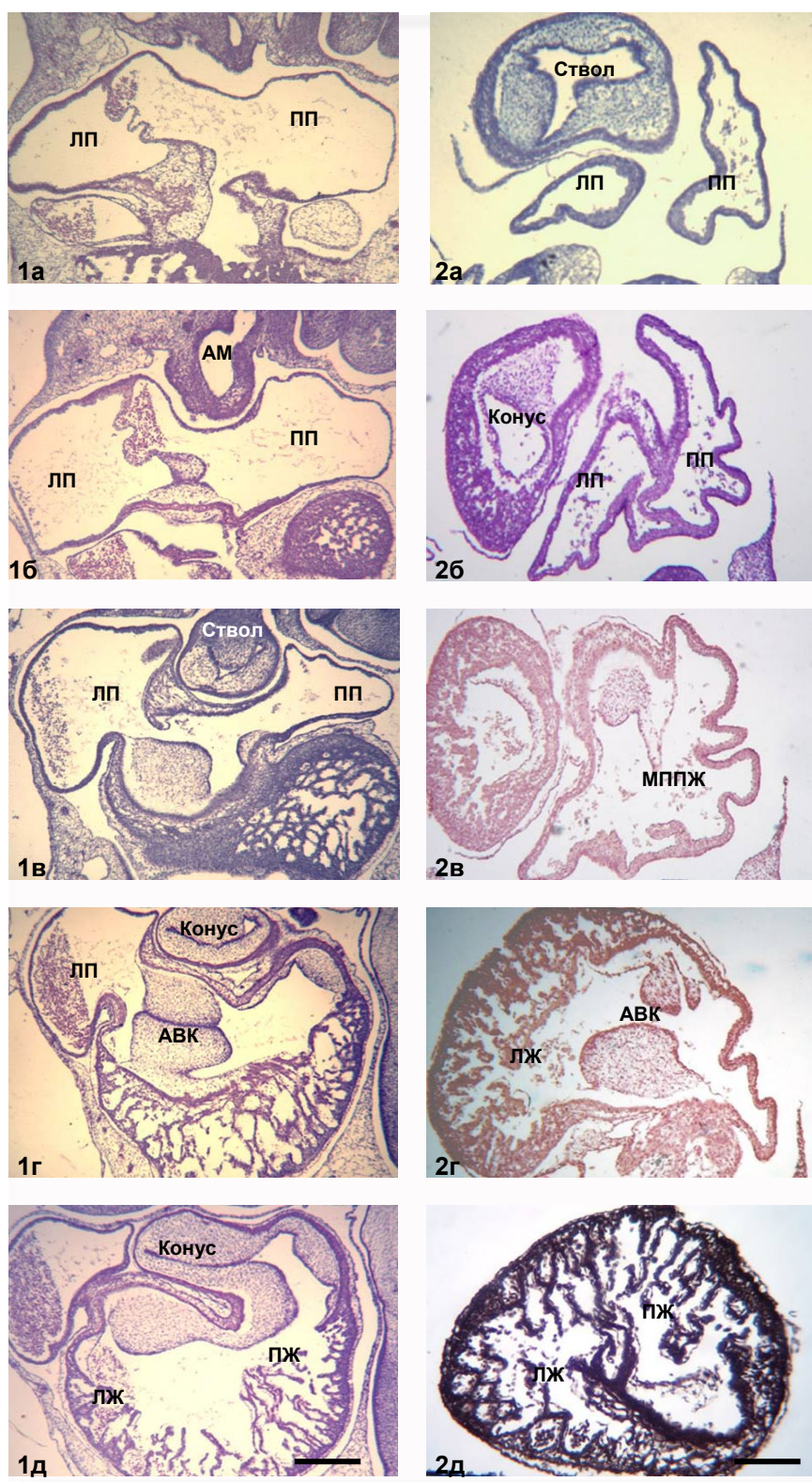


Рис. 2. 1а-1д – поперечные срезы сердца зародыша на 4 сут инкубации в норме (24 стадия по НН), длина масштабной линии – 250 мкм; 2а-2д - поперечные срезы сердца зародыша на 5 сут инкубации после воздействия этанола (24 стадия по НН), длина масштабной линии – 150 мкм. Окраска гематоксилином-эозином – 1а-1д, 2б-2г; гематоксилином Гейденгайна – 2д, по Сиддмену – 2а.

Ам – аортальный мешок, ПП – правое предсердие, ЛП – левое предсердие, МППЖ – межпредсердная перегородка; ПЖ – правый желудочек, ЛЖ – левый желудочек, АВК – атриоventрикулярный канал.

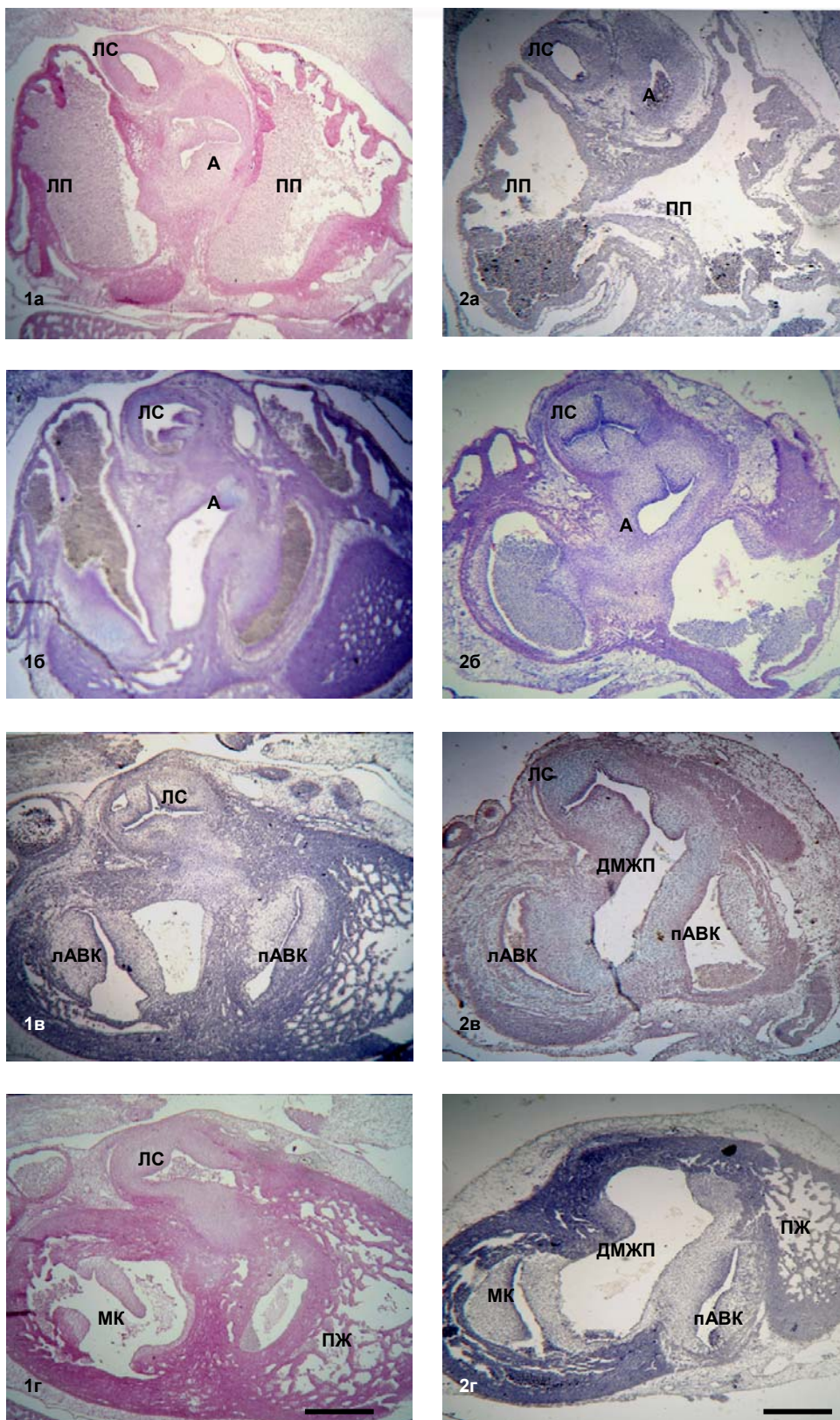


Рис. 3. 1а-1г – поперечные срезы сердца зародыша на 7 сут инкубации в норме (32 стадия по НН), длина масштабной линии – 400 мкм; 2а-2г - поперечные срезы сердца зародыша на 7 сут инкубации после воздействия этанола (32 стадия по НН), длина масштабной линии – 300 мкм. Окраска гематоксилином-эозином – 2б; гематоксилином Гейденгайна – 1в, 2а, 2г; по Сиддмену – 1б, 2в; на гликоген по Мак-Манусу – 1а, 1г.

А – аорта, ЛС – легочной ствол, ПП – правое предсердие, ЛП – левое предсердие, ПЖ – правый желудочек, пАВК – правый атриовентрикулярный канал, лАВК – левый атриовентрикулярный канал, МК – митральный клапан, ДМЖП – дефект межжелудочковой перегородки.

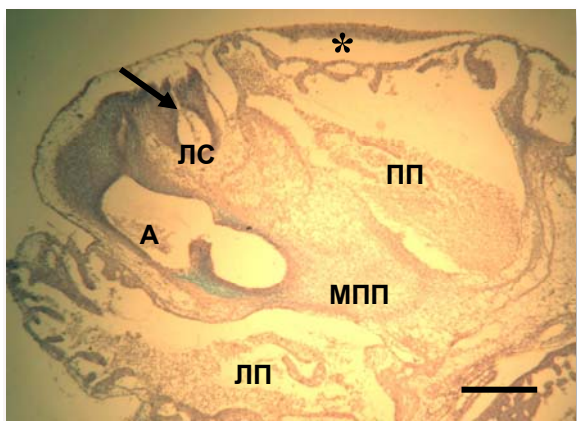


Рис. 4. Поперечний срез серця куриного зародка на 7 сут інкубації після впливу етанолу (32 стадія по НН), довжина масштабної лінії – 250 мкм. Окреска по Стивідмену.

А – аорта, ЛС – легочний ствол, ПП – праве передсердя, ЛП – ліве передсердя, МПП – міжлуночковна перегородка. Стрілкою позначено порушення цілостності передньої стінки легочного ствола, зірочкою – кровоизливання в субепікардіальній пространстві. Ср. рис. 3 (1а, 1б).

Заключення

В нашому дослідженні виділяються наступні типи порушення розвитку серця в залежності від наявності загальної затримки розвитку і внесерцевих аномалій (табл.1): 1) затримка розвитку органу без аномалій на фоні загальної нормального розвитку; 2) затримка розвитку органу з аномаліями на фоні загальної нормального розвитку; 3) затримка розвитку органу без аномалій на фоні загальної недорозвитку; 4) затримка

розвитку органу з аномаліями на фоні загальної затримки розвитку зародка; 5) затримка розвитку органу з аномаліями на фоні аномального розвитку зародка без затримки; 6) затримка розвитку органу з аномаліями на фоні аномального і затриманого розвитку зародка.

Найбільш частими були 4 і 6 тип порушень, найбільш рідкими – 1 і 3, що свідчить про збільшення частоти серцевих аномалій при тенденції до відставання в загальному розвитку і формуванню внесерцевих аномалій. При використанні цієї моделі ми не зустріли випадків, коли аномалії серця розвивалися при відповідності серця загальному рівню розвитку і загальному нормальному розвитку або його затримці без внесерцевих аномалій. При аномальному загальному розвитку (не залежно від відповідності стадії розвитку зародка) розвиток серця мав риси відставання і аномального розвитку.

Судячи з характеру виявлених змін, кросс Cobb 500 є чутливим до впливу етанолу при використанні традиційної моделі аномального кардіогенезу. Це свідчить про генетично обумовлену уязвості популяції клітин нервного гребеня у кур цього кроссу до дії хімічних тератогенів, в частині до етанолу.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження можуть встановити молекулярно-біологічні основи взаємодії різних частин зародка в період органогенезу, а також розширити уявлення про морфогенетичні механізми аномального розвитку при впливі тератогенів.

Літературні джерела

Машталір М.А. Розвиток серця мишачих та курячих зародків на кінцевих етапах септації після впливу етанолу // Мат-ли ІІІ наук. морфол. конф. «Карповські читання».- Дніпропетровськ, 2006.- С.40.

Cavieres M.F., Smith S.M. Genetic and developmental modulation of cardiac deficits in prenatal alcohol exposure // Alcohol. Clin. Res.- 2000.- Vol.24, №1.- P.102-109.

Dedelak K.A., Smith S.M. Avian genetic background modulates the neural crest apoptosis induced by ethanol exposure // Alcohol. Clin. Res.- 2000.- Vol.24, №3.- P.307-314.

Epithelial-mesenchymal transformations in early avian heart development / R.Markwald, C.Eisenberg, L.Eisenberg et al. // Acta Anat.- 1996.- Vol.156.- P.173-186.

Ethyl alcohol-induced cardiovascular malformations in the chick embryo / Fang T.T., Bruyere H.J.Jr., Kargas S.A. et al. // Teratology.- 1987.- Vol.35, №1.- P.95-103.

Manner J., Jeidl W., Steding G. Correlation between the embryonic head flexures and cardiac development // Anat. Embryol.- 1993.- Vol.188, №3.- P.269-285.

Машталір М.А., Твердохліб І.В. Морфологічні аспекти аномального кардіогенезу у курячого зародка після впливу етанолу: кореляції між загальним розвитком та розвитком серця.

Резюме. Метою дослідження було виявлення морфологічних змін у формуванні камер серця і виділення типів порушень залежно від затримки розвитку зародка і наявності позасерцевих аномалій. Яйця курей бройлерів кросу Cobb 500 обробляли на початку 4 діб інкубації 0,2-0,25 мл 50% етанолу, дослід-

дження зародків проводили в кінці 4, 5 і 7 діб. Ми виділили наступні типи порушення розвитку серця, які, звичайно, включали загальну затримку розвитку органа або його частин: 1) затримка розвитку органу без аномалій на фоні загального нормального розвитку; 2) затримка розвитку органу з аномаліями на фоні загального нормального розвитку; 3) затримка розвитку органу без аномалій на фоні загального недорозвинення; 4) затримка розвитку органу з аномаліями на фоні загальної затримки розвитку зародка; 5) затримка розвитку органу з аномаліями на фоні аномального розвитку зародка без затримки; 6) затримка розвитку органу з аномаліями на фоні аномального і затриманого розвитку зародка. Найчастішими були 4 і 6 тип порушень, найрідкіснішими – 1 і 3, що свідчить про збільшення частоти серцевих аномалій при тенденції до відставання в загальному розвитку і формування позасерцевих аномалій.

Ключові слова: серце, курячий зародок, етанол, аномальний розвиток, затримка розвитку.