

О.Ю.Потоцкая

Днепропетровская государственная медицинская академия

Ключевые слова: проэпикард, проэпикардоподобные структуры, перикардимальные пролифераты.

Надійшла: 16.08.2008
Прийнята: 20.09.2008

УДК 611.12:611.013

НОВЫЙ ИСТОЧНИК ЭПИКАРДА У ПТИЦ: МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы „Анализ нормального и аномального гистогенеза тканевых компонентов сердечно-сосудистой системы человека и экспериментальных животных” (номер государственной регистрации 0105U007837).

Резюме. Основным источником эпикарда у птиц является проэпикард, расположенный на правом роге венозного синуса, дорсально по отношению к атриовентрикулярной борозде. Относительно недавно был описан еще один источник, названный перикардимальными пролифератами, который дает начало эпикарду дистальной части выпускного тракта. Тем не менее, после фотоабляции проэпикарда наблюдали формирование компенсаторного эпикарда, происходящего из вентральной стенки тела каудальнее сердца. Таким образом, целью нашей работы было изучение проэпикардоподобных структур перикардимальной полости птиц. Начиная с 13 стадии по НН, в перикардимальной полости птиц мы наблюдали проэпикардоподобные структуры, сходные по клеточному составу с проэпикардом. Они происходили из латеральной плоской мезодермы, располагались на воронке передних кишечных ворот вдоль одной из желточных вен. На 16/17 стадиях по НН от проэпикардоподобных структур отпочковывались везикулы, содержащие мезенхимные клетки, и прилипали к сердцу справа в области атриовентрикулярного канала и желудочковой петли. Локализация проэпикардоподобных структур в том месте, где у млекопитающих происходит формирование поперечной перегородки (источник проэпикарда у млекопитающих) а также способность проэпикардоподобных структур к образованию везикул дают нам основание предполагать, что проэпикардоподобные структуры птиц гомологичны проэпикарду млекопитающих. Окончательно это помогут подтвердить дальнейшие исследования.

Морфология. – 2008. – Т. II, № 4. – С. 37-43.

© О.Ю.Потоцкая, 2008

Pototskaya O.Yu. A novel source of epicardium in birds: morphological observation.

Summary. The main source of epicardium in birds is proepicardium, which is situated on the right horn of the sinus venous, dorsally to atrio-ventricular groove. Recently one more source of epicardium was described, it was named pericardial proliferates, that give rise to the epicardium of the distal part of the outflow tract. But, after proepicardium photoablation, compensatory epicardium aroused from the ventral body wall, caudally to the heart. Thereby the goal of our work was to investigate proepicardium-like structures of the pericardial cavity in birds. Beginning from the 13 stage by HH we observed proepicardium-like structures, which in cellular composition were similar to proepicardium. They derived from the lateral plate mesoderm and were situated on the funnel of the anterior intestinal gate, along to one of the vitelline vein. On the 16/17 stage by HH vesicles, containing mesenchimal cells, was budding of from proepicardium-like structures and attached to the heart on the right side of atrio-ventricular groove and ventricular loop. Localization of the proepicardium-like structures in the place, where in mammalian septum transversum (the source of proepicardium in mammalian) forms, and also the possibility of proepicardium-like structures to form vesicles gave us an occasion to suggest, that proepicardium-like structures are homologous of mammalian proepicardium. It could be concluded only after further investigations.

Key words: proepicardium, proepicardium-like structures, pericardial proliferates.

Введение

После того, как стало известно о происхождении коронарных сосудов сердца из клеточных дериватов эпикарда, изучение потенциалов внешнего сердечного слоя и источников его происхождения привлекает все большее внимание ученых. Одной из перспектив данного направления является васкуляризация ишемизированного миокарда за счет зрелого аутологичного эпикарда, что поможет понизить риск и частоту заболеваний сердца (Wada A.M. et al., 2003).

Еще в 1909 году Т.Kurkiewicz выдвинул предположение о происхождении эпикарда из внесердечного источника, которое длительное время оставалось без внимания. Наибольший объем информации, характеризующей этот источник, был получен за последние 30 лет; в серии классических работ было показано, что источником эпикарда является временная эмбриональная структура – проэпикард (ПЭ), имеющая ряд классовых особенностей (Manasek F.J., 1968; Viragh S., Challice C.E., 1973). Так, у птиц она

происходит из мезотелия правого рога венозного синуса (имеет асимметричное строение) и внешне напоминает цветную капусту. На 17/18 стадии по V.Hamburger, H.Hamilton (НН), (1951) отростки ПЭ «прирастают» к атриовентрикулярной борозде и, наполняя на нее, формируют эпикард (Schulte I. et al., 2007). В свою очередь, у мышей ПЭ происходит из поперечной перегородки и является симметричной структурой, внешне походящей на виноградную гроздь. Отличия наблюдаются также и в способе «наползания» ПЭ на примитивное сердце: у мышей от кончиков проэпикардиальных отростков отпочковываются везикулы, которые «переплывают» перикардальную полость, прилипают к сердцу и сливаются между собой с образованием эпикарда (Ratajska A. et al., 2006).

Для более глубокого понимания функций ПЭ часто использовали эксперименты по его абляции, в ходе которых, не смотря на отсутствие контакта ПЭ с атриовентрикулярной бороздой, наблюдали формирование компенсаторного эпикарда. Последний, как правило, покрывал дистальную часть выпускного тракта (Gittenberger-de Groot A.C. et al., 2000). В 2003 году данный феномен получил научное объяснение - J.M.Perez-Pomares и соавт. (2003) описали дополнительный источник эпикарда дистальной части выпускного тракта и назвали его «перикардиальные пролифераты», производные цефалического перикардиального эпителия второго сердечного поля. Подтверждением непроэпикардиального происхождения эпикарда дистальной части выпускного тракта послужила также более низкая (по сравнению с ПЭ) активность экспрессии RALDH2 и эпителио-мезенхимной трансформации, а также форма эпителия (кубический вместо плоского) (Pérez-Pomares J.M. et al., 2003).

Интересно, что в работе с использованием наиболее совершенной методики по удалению ПЭ – фотоабляции – наблюдали тяж компенсаторного эпикарда, который происходил из вентральной стенки перикардиальной полости или из ее дна (Männer J. et al., 2005). Авторы объяснили этот факт наличием потенциалов к формированию ПЭ в различных участках перикардиальной полости. Но подобная локализация не совпадает ни с одной для описанных ранее источников эпикарда: перикардиальные пролифераты расположены в верхней части полости, а ПЭ – дорсально по отношению к сердцу. При этом компенсаторный эпикард не подвергался эпителио-мезенхимной трансформации, о чем свидетельствовало отсутствие субэпикардиального пространства.

Некоторые авторы при изучении ПЭ упоминают о наличии в перикардиальной полости структур, напоминающих ПЭ, но затрудняются объяснить их назначение (Nahirney P.C. et al.,

2003). Подобное наблюдение может дополнительно вызывать предположение о существовании еще одного источника эпикарда у птиц.

Таким образом, целью данной работы является характеристика проэпикардоподобных структур (ПЭПС) перикардиальной полости птиц, выяснение возможности их участия в формировании эпикарда.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили куры кросса Cobb 500; яйца инкубировали при температуре 38°C, относительной влажности 80%. Вращение яиц осуществлялось 10 раз в сутки. Стадию развития определяли по V.Hamburger, H.Hamilton, (1951) с учетом рекомендаций В.В.Мартинсен (2005). Для предотвращения повреждения структур, расположенных вентрально и каудально по отношению к сердцу, эмбрионы извлекались с участком подлежащей желточной оболочки. Материал фиксировали в жидкости Буэна, обезжизняли в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали хлороформом, заливали в парапласт. Серийные срезы толщиной 5 мкм (ориентированные в горизонтальной плоскости) окрашивали железным гематоксилином Гейденгайна, по Сиддмену, гематоксилином и эозином.

Результаты

На 13 стадии по НН на правом роге венозного синуса наблюдались лишь едва заметные образования, свидетельствующие о начале формирования ПЭ (верхняя стрелка на рис. 1, А1). В то же время, вентрально напротив ПЭ, рядом с веной, проходящей в составе желточной оболочки, располагалась структура, обозначенная стрелкой на рис. 1, А2 (нижняя стрелка на рис. 1, А1). Эту структуру мы отнесли к проэпикардоподобным структурам, ПЭПС, ее длина составляла около 55 мкм; нижняя граница соответствовала месту впадения рядом расположенной вены (ЖВ на рис. 1, А2) в венозный синус. Таким образом, можно заключить, что ПЭПС располагались на воронке желточного протока (над передними кишечными воротами) и тянулись вверх вдоль желточной вены.

ПЭПС представляли собой разрастания латеральной плоской мезодермы, которая является эмбриональным материалом для вентральной стенки полости тела. В составе ПЭПС можно было выделить слои клеток, отграничивающие ее со стороны внезародышевого целома и со стороны основания. Между этими слоями были рыхло расположены мезенхимные клетки и относительно небольшое количество внеклеточного матрикса.

На 14 стадии по НН внешний вид ПЭПС существенным образом не изменялся, но обращало на себя внимание изменение взаимного расположения окружающих структур (рис. 1, А3, А4). Так, рядом с ПЭПС наблюдалась петля же-

лудочка сердца, а вместо венозного синуса (как на предыдущей стадии) располагалась правая

желточная вена (звездочка на рис. 1, А3).

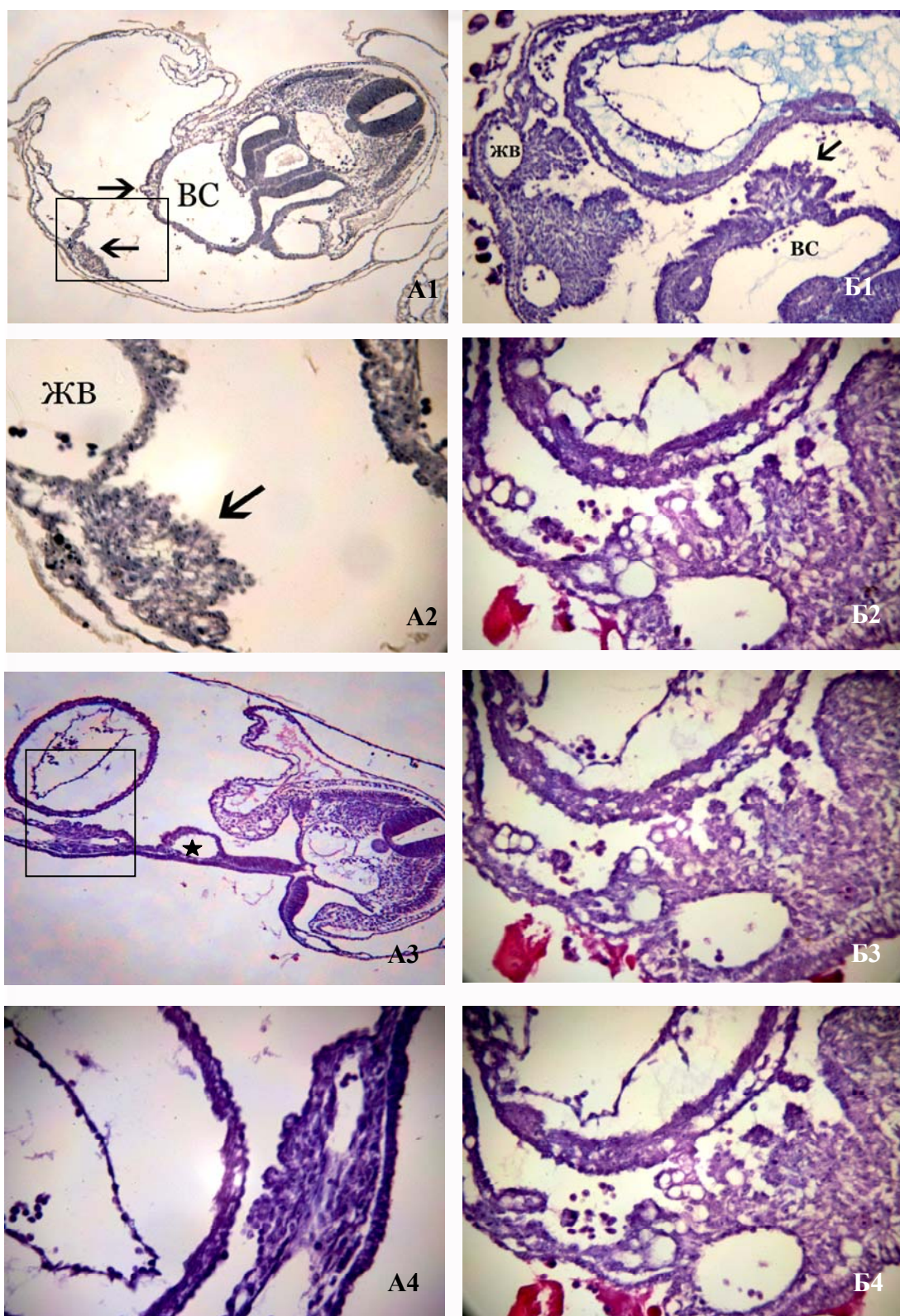


Рис. 1. Куриный эмбрион на: А1, А2 – 13; А3, А4 – 14; Б1-Б4 – 16 стадии развития по НН. А1, А3, Б1 – $\times 100$, А2, А4, Б2-Б4 – $\times 400$. А2 – на 20 мкм ниже увеличенного фрагмента на А1. А4 – увеличенный фрагмент на А3. Б2-Б3-Б4 – серийные срезы, расположенные на 55 мкм ниже выделенного фрагмента на Б1. Окраска: А1, А2 – железный гематоксилин Гейденгайна; Б1 – по Сиддмену; А3, А4, Б2-Б4 – гемалаун – эозин. Пояснения в тексте. ВС – венозный синус; ЖВ – желточная вена; звездочкой на А3 обозначена правая желточная вена.

На стадии 15/16 по НН проэпикард достигал размеров 120 мкм в высоту (стрелка на рис. 1, Б1) и лишь несколько его отростков приближались к атриовентрикулярной борозде сердца. На одном уровне с проэпикардом, венстромедиально по отношению к сердцу, вокруг желточной вены наблюдались ПЭПС (рис. 1, Б1-Б4). Их высота увеличивалась по сравнению с 14 стадией, а длина составляла около 135 мкм. Внешний вид структуры приобретал отростчатый характер, в ее составе по-прежнему можно было выделить три клеточных популяции. При окраске по Стивиду в составе межклеточного вещества обнаруживались кислые гликозаминогликаны (рис.1, Б1).

Ниже места расположения нижних отростков проэпикарда наблюдались места соприкосновений выростов ПЭПС со стенкой сердца (серийные срезы на рис. 1, Б2-Б3). При этом в структуре ПЭПС наряду с отростками, прирастающими к сердцу, наблюдались подобия везикул (без мезенхимных клеток внутри), что не характерно для проэпикарда птиц. Между собой отростки и везикулы были объединены сетью тонких цитоплазматических отростков (рис. 1, Б2-Б4), которые, вероятно, исполняли роль механической стабилизации взаимного расположения структур и синхронизации их деятельности.

В конце 16 стадии ПЭПС наблюдались в виде выростов мезенхимы, расположенной между правой желточной веной, впадающей сверху в венозный синус, и желточной веной меньшего порядка, которая и ранее сопровождала ПЭПС (выделенный фрагмент на рис. 2, А1). Отличительной особенностью этой стадии было начало образования везикул ПЭПС, которые на уровне атриовентрикулярного канала «прилипали» к сердцу (серийные срезы на рис. 2, А2-А4).

На 17 стадии по НН проэпикард увеличился до 165 мкм, наблюдались четкие переходы некоторых его отростков в эпикард сердца. Протяженность ПЭПС в кранио-каудальном направлении составляла 135 мкм. Теперь уже были четко определены отдельные везикулы ПЭПС, они располагались на 35 мкм ниже нижних отростков ПЭ (рис. 2, Б2-Б4). Диаметр везикул составлял 10–50 мкм; их периметр был образован 2–4 плоскими клетками, внутри обнаруживались мезенхимные клетки. На данной стадии ПЭПС по клеточному составу особенно напоминали проэпикард (рис. 2, Б2-Б4). Мезенхимные клетки располагались более рыхло по сравнению с предыдущими стадиями, количество межклеточного матрикса относительно увеличивалось.

На 18 стадии по НН ПЭ достигал 250 мкм в высоту, количество отростков, переходящих в эпикард, увеличивалось. Общий размер ПЭПС почти не изменялся (рис. 3, А2). Но регион ПЭПС (вертикальная стрелка на рис. 3, А1) располагался на значительном отдалении от вер-

хушки сердца (горизонтальная стрелка на рис. 3, А1), следовательно, сближения со структурами сердца не наблюдалось. Везикулы практически отсутствовали; отростки становились короче.

Обсуждение

Начиная с 13 стадии развития по НН, в околосердечной полости птиц наблюдались выросты, похожие на ПЭ, что согласуется с наблюдениями других авторов (Schulte I. et al., 2007). Расположение ПЭПС совпадает с ранее описанной локализацией для тяжелой компенсаторного эпикарда, образованного после абляции ПЭ (Männer J. et al., 2005).

В связи с петлеобразованием (B.J.Martinsen, 2005) и постепенным закрытием передних кишечных ворот, ПЭПС изменяли свое расположение относительно отделов сердца: изначально, на стадии 13 по НН, находились на уровне венозного синуса; затем (на НН 14) петля желудочков опускалась до уровня ПЭПС, а венозный синус, наоборот, поднимался; с продолжением петлеобразования ПЭПС оказывались на уровне атриовентрикулярного канала; со временем передние кишечные ворота постепенно закрывались, увлекая за собой нижнюю границу ПЭПС, и она оказывалась ниже верхушки желудочков.

На данный момент остается открытым вопрос о классовых особенностях стыковки ПЭ с сердцем. Дискутабельным остается возможность образования везикул-источников эпикарда (Winter E.M., Gittenberger-de Groot A.C., 2007). В нашей работе мы показали существование у птиц (наряду с отростками ПЭ) везикул ПЭПС, мест их соприкосновений с примитивным сердцем, которые наблюдаются на 16/17 стадии по НН.

На 17 стадии по НН ПЭПС образуются из мезенхимной структуры, расположенной на воронке передних кишечных ворот между двумя желточными венами (вертикальная стрелка на рис. 3, А2). Важно, что у млекопитающих в данном регионе располагается зачаток диафрагмы - поперечная перегородка, которая отсутствует у птиц (равно как и диафрагма). Кроме того, именно поперечная перегородка у млекопитающих является источником ПЭ (Winter E.M., Gittenberger-de Groot A.C., 2007). На основании этого можно предположить, что описанные нами ПЭПС являются гомологами ПЭ млекопитающих у птиц. В подтверждение этому может служить также факт образования в ПЭПС везикул, что характерно именно для ПЭ млекопитающих, но не птиц.

Интересно, что в 2007 году были проведены эксперименты по выяснению причин правой асимметрии ПЭ у птиц (Schulte I. et al., 2007). Предполагали, что, поскольку эмбрион находится на левом боку, участок прилежащего слева желтка негативно влияет на формирование ПЭ, а желудочковый миокард, находящийся справа – позитивно.

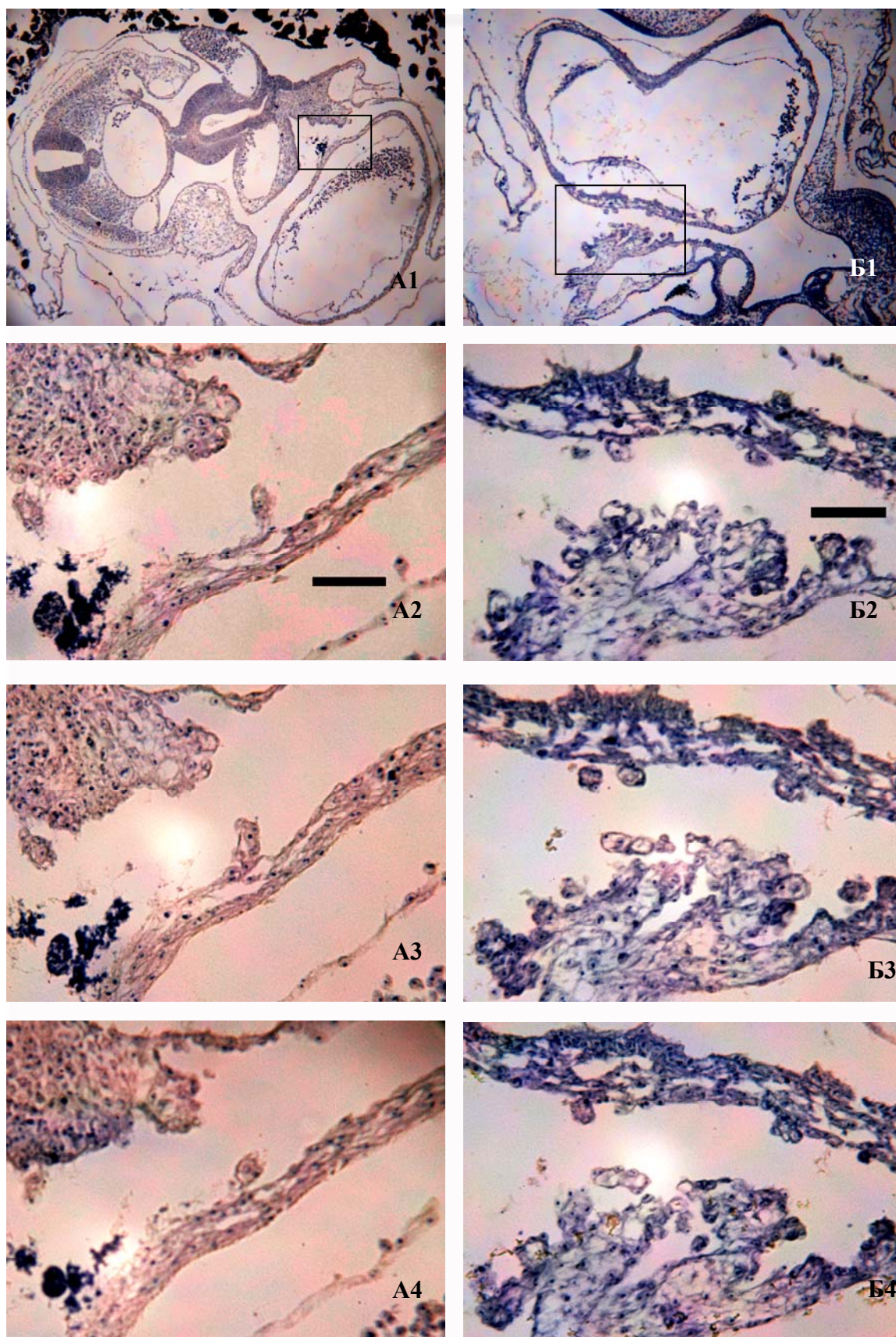


Рис. 2. Куриный эмбрион на: А1–А4 – в конце 16 стадии; Б1–Б4 - 17 стадии развития по НН. А1, Б1 - $\times 100$. А2–А4 – серийные срезы выделенного фрагмента на А1. Б2–Б4 – серийные срезы выделенного фрагмента на Б1. Окраска железным гематоксилином Гейденгайна. Отрезок на А2, Б2 = 50 мкм. Пояснения в тексте.

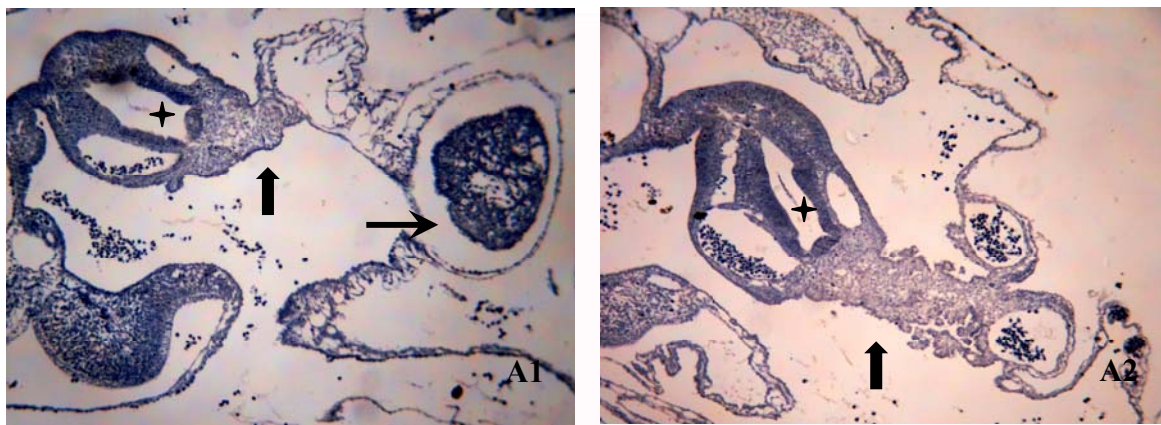


Рис. 3. Куриный эмбрион на 18 стадии развития по НН. $\times 100$. Срез А2 расположен на 35 мкм ниже среза А1. Окраска железным гематоксилином Гейденгайна. Звездочка – передний отдел кишечной трубки. Горизонтальная стрелка на А1 – верхушка миокарда желудочков. Пояснения в тексте.

По этому поводу провели три эксперимента, но ни один из них так и не подтвердил подобное предположение. Можно гипотетически предположить, что индукция развития правого зачатка происходит следующим образом. Изначально у птиц происходит закладка ПЭ, гомологичного ПЭ млекопитающих (точнее на вентральной стенке тела). Поскольку у птиц поперечная перегородка/диафрагма (из зачатка которой формируется ПЭПС) никогда не достигнет необходимой для формирования эпикарда позиции, потенции этого зачатка передаются расположенному напротив правому рогу венозного синуса (см. рис. 1, А1, стрелки), который и выступает в дальнейшем основным источником эпикарда. В свою очередь, зачатки ПЭ млекопитающих, названные нами ПЭПС, продолжают играть лишь добавочную роль.

Из сказанного выше следует очевидный вопрос: почему же подобные структуры еще не были описаны ранее как источники эпикарда? Этому есть ряд объяснений. Во-первых, для лучшей визуализации региона сердца и прилежащего к нему проэпикарда большинство оболочек удаляются вместе с желточным протоком кишки. Во-вторых, ПЭПС как самостоятельная структура лучше всего визуализируются только на горизонтальной плоскости срезов, на остальных они могут быть совсем не видны. В-третьих, для констатации факта существования ПЭПС необходимо проанализировать серии срезов, в противном случае везикулы можно принять за отростки проэпикарда. И, наконец, уже на 18 стадии ПЭПС расположены на уровне верхушки сердца – регион не всегда попадающий в поле зрения исследователя ПЭ.

Заключение

На 13-18 стадиях по НН в перикардиальной

полости птиц наблюдаются ПЭПС, в которых, по аналогии с проэпикардом, выявляются слои клеток, отграничивающие их со стороны внезародышевого целома, со стороны основания, и расположенная между ними мезенхима с внеклеточным веществом, богатым кислыми гликозаминогликанами.

На 16/17 стадии по НН в структуре ПЭПС появляются везикулы, 10–50 мкм в диаметре, содержащие мезенхимные клетки. Везикулы «прилипают» к поверхности сердца в области атриовентрикулярного канала и верхушки желудочков.

ПЭПС выявляют сходство с ПЭ млекопитающих по структуре (образование везикул), а также подобие в источнике происхождения (мезенхима над передними кишечными воротами, вентральной стенкой полости тела птиц и поперечной перегородки млекопитающих).

Перспективы дальнейших исследований

Большой интерес представляет изучение мест соприкосновения ПЭПС и сердца с помощью электронной микроскопии с целью изучения межклеточных контактов, что позволит более детально изучить вклад ПЭПС в формирование эпикарда.

Создание компьютерных моделей ПЭПС поможет дополнительно подтвердить возможность формирования везикул на разных стадиях развития, оценить симметричность структуры.

Также необходимо установить значение клеток эпикарда и субэпикардиального пространства, происходящих из ПЭПС, для кардиоэмбриогенеза.

Перспективным является исследование экспрессии в ПЭПС различных маркеров, ранее выявленных в ПЭ, латеральной плоской мезодерме.

Gittenberger-de Groot A. C. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation / Adriana C. Gittenberger-de Groot, Mark-Paul F.M. Vrancken Peeters [et al.] // *Circ. Res.* - 2000. - Vol. 87. - P. 969-971.

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.

Manasek F. J. Embryonic development of the heart. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo / F. J. Manasek // *J. Morphol.* - 1968. - Vol. 125. - P. 329-365.

Männer J. Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of-proepicardial-function in chick embryos / Jorg Manner, Jan Schlueter, Thomas Brand // *Developmental Dynamics.* - 2005. - Vol. 233. - P. 1454-1463.

Martinsen B. J. Reference guide to the stages of chick heart embryology / Brad J. Martinsen // *Developmental dynamics.* - 2005. - Vol. 233. - P. 1217-1237.

Nahirney P. C. Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos / Patrick C. Nahirney, Takashi Mikawa, Donald A. Fischman // *Developmental Dynamics.* - 2003. - Vol. 227. - P. 511-523.

Pérez-Pomares J. M. Epicardial-like cells on the distal arterial end of the cardiac outflow tract do not derive from the proepicardium but are derivatives of the cephalic pericardium / Jose M. Perez-Pomares, Aimee Phelps, Martina Sedmerova, Andy Wessels // *Developmental Dynamics.* - 2003. - Vol. 227. - P. 56-68.

Ratajska A. Vasculogenesis of the embryonic heart: origin of blood island-like structures / Anna Ratajska, Elzbieta Czarnowska, Agnieszka Kołodzinska [et al.] // *Anatomical record.* - 2006. - Vol. 288A. - P. 223-232.

Schulte I. Morphological and molecular left-right asymmetries in the development of the proepicardium: A comparative analysis on mouse and chick embryos / Inga Schulte, Jan Schlueter, Radwan Abu-Issa [et al.] // *Anat. Embryol. (Berl).* - 2007. - Vol. 176, № 2. - P. 9-183.

Viragh S. Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse / Viragh S., Challice C.E. // *J. Ultrastruct. Res.* - 1973. - Vol. 42. - P. 1-24.

Wada A. M. Epicardial/mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium / Aya M. Wada, Travis K. Smith, Megan E. Osler [et al.] // *Circulation Research.* - 2003. - Vol. 92. - P. 525-531.

Winter E. M. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration / E. M. Winter, A. C. Gittenberger-de Groot // *Cell. Mol. Life Sci.* - Vol. 64. - 2007. - P. 692-703.

Потоцька О.Ю. Нове джерело епікарда у птахів: морфологічне спостереження.

Резюме. Основним джерелом епікарда у птахів є проепікард, розташований на правому розі венозного синуса, дорсально по відношенню до атріо-вентрикулярної борозни. Відносно нещодавно було описано ще одне джерело, назване перикардальні проліферати, яке дає початок епікарду дистальної частини випускного тракту. Тим не менш, після фотоабляції проепікарда спостерігали формування компенсаторних тяжів епікарда, що походили з вентральної стінки тіла каудально до серця. Таким чином, метою нашої роботи було вивчення проепікардоподібних структур перикардальної порожнини птахів. Починаючи з 13 стадії по НН в перикардальній порожнині птахів ми спостерігали проепікардоподібні структури, сході за клітинним складом з проепікардом. Вони походили з латеральної плоскої мезодерми, розташовувались на лійці передніх кишкових воріт вдовж однієї з жовткових вен. На 16/17 стадіях по НН від проепікардоподібних структур відбруньковувались везикули, які містили мезенхімні клітини, та прилипали до серця справа в області атріо-вентрикулярного каналу та шлуночкової петлі. Локалізація проепікардоподібних структур в тому місці, де у ссавців відбувається формування поперечної перегородки (джерело проепікарда у ссавців) а також здатність проепікардоподібних структур до утворення везикул дають нам можливість передбачити, що проепікардоподібні структури птахів гомологічні проепікарду ссавців. Остаточні це допоможуть підтвердити подальші дослідження.

Ключові слова: проепікард, проепікардоподібні структури, перикардальні проліферати.