

Г.С. Маслак¹
Р.М. Онисько²
І.В. Челпанова³

¹ Дніпровський державний медичний університет, Дніпро
² ТЗВО ЛОР «Львівська медична академія імені Андрея Крупинського», Львів
³ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів
Україна

Надійшла: 09.02.2024

Прийнята: 18.03.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.1.62-69>

УДК: 611.12:611.013:611.061.1

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ САРКОМЕРОГЕНЕЗОМ І РОЗВИТКОМ ТКАНИНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ МІОКАРДА В ЕМБРІОНАЛЬНОМУ КАРДІОГЕНЕЗИ КУРКИ

Maslak H.S.  ✉, Onysko R.M.  ✉, Chelpanova I.V.  ✉ The relationship between sarcomerogenesis and the development of tissue organization of the myocardium in embryonic chicken cardiogenesis.

Dnipro State Medical University, Dnipro; Andrey Krupynsky Lviv Medical Academy, Lviv; Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.


ABSTRACT. Background. The general basis for understanding how the limited range of sarcomere contraction ensures cardiac output during systole is the analysis of the ontogenetic formation and local features of the development of the myofibrillar structure of cardiomyocytes by comparing the phase states of the myocardium. **The purpose** of the research is to determine phase and topological features and quantitative ultrastructural characteristics of sarcomerogenesis in cardiomyocytes of chicken embryos. **Methods.** Embryos of Cobb500 crossbred chickens were studied from the beginning of the 6th day to the 21st day of incubation. Ultrastructural features of contractile cardiomyocytes in different areas of ventricular and atrial myocardium in systole and diastole were studied using transmission electron microscopy. **Results.** At the 29th stage of development of chicken embryos in diastole, immature sarcomeres had different lengths. The average length of sarcomeres was $1.86 \pm 0.09 \mu\text{m}$ in the left ventricle and $1.91 \pm 0.21 \mu\text{m}$ in the right ventricle. At the 36th stage in the state of diastole, a significant increase in the length of sarcomeres was observed in the compact myocardium of the left ventricle and left atrium, while in the right parts of the heart, the increase in Z-Z distance was less active. In the right units of the heart, sarcomeres with unequal lengths were more often found in the compact myocardium and in the trabeculae. In different areas of the myolamella and trabeculae, the degree of relaxation of sarcomeres during simulation of maximum diastole was not the same. Incomplete relaxation of sarcomeres was noted in the initial and final sections of the muscle plates. In the middle part of the trabeculae, the length of the sarcomeres was significantly longer ($1.82 \pm 0.04 \mu\text{m}$), and in the intermediate (main) part of the muscle plates of the compact ventricular myocardium, the sarcomeres were 10.4% ($p < 0.05$) longer, than in their basis. **Conclusion.** By the end of prenatal cardiogenesis, the tangential orientation of the Z-discs of myofibrils and the shape of cardiomyocytes in systole was formed and strengthened due to the mutual displacement of neighboring myolamella during the counter-directional rotation of the basal and apical parts of the left ventricle during the shortening of sarcomeres to $1.83 \pm 0.04 \mu\text{m}$. In the right ventricle and atrial myocardium, systolic contraction did not change the orthogonal orientation of telophragms and intercalated discs when sarcomeres were shortened to 1.79-1.84 μm . In the state of diastole, the orthogonal orientation of Z-discs is characteristic of contractile cardiomyocytes of all chambers when the length of sarcomeres reaches $2.17 \pm 0.07 \mu\text{m}$ in the intermediate part of the myolamella of both ventricles, $2.12 \pm 0.13 \mu\text{m}$ in the middle part of atrial and ventricular trabeculae, $2.02 \pm 0.10 \mu\text{m}$ at the base of trabeculae of all chambers and muscle plates of both ventricles. **Key words:** chicken embryo, cardiogenesis, heart, cardiomyocyte, sarcomere, histoarchitecture, ultrastructure.

Citation:

Maslak HS, Onysko RM, Chelpanova IV. [The relationship between sarcomerogenesis and the development of tissue organization of the myocardium in embryonic chicken cardiogenesis]. *Morphologia*. 2024;18(1):62-9. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.1.62-69>

 Ganna Maslak 0000-0003-3573-8606;  Onysko R.M. 0009-0004-4420-0255

 Chelpanova I.V. 0000-0001-5215-814X

✉ gannamaslak@gmail.com; Oniskoroman2022@gmail.com; ilona.med75@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

У фундаментальному дослідженні Н.М. Spotnitz з колегами [1] було вивчено значення змін діаметра шлуночкових кардіоміоцитів протягом серцевого скорочення, а також роль ковзання (зміщення) пучків волокон у забезпеченні потовщення стінки шлуночків у фазі систоли. Автори дійшли висновку, що фазова зміна товщини волокон не може пояснити стовщення стінки шлуночків під час систолічного скорочення. Також показано, що між групами міоцитів є плоскі простори сполучної тканини, які їх розмежують і забезпечують ковзання м'язових пластин відносно одна одної під час систолічного скорочення. Міокард шлуночків зазнає значних змін форми та розміру протягом серцевого циклу, причому ступінь цих змін є найбільшим у субендокардіальній зоні. Хоча існують значні трансмуральні градієнти просторової деформації, характер розслаблення та скорочення міофібрил є напрочуд рівномірним по всій товщі стінки шлуночка в систолі та діастолі [2], і довжина саркомера не перевищує 2,25 мкм при нормальному скороченні серця [3].

Тривимірний аналіз показав, що це обумовлено суттєвим зрушенням між сусідніми м'язовими пластинами в субендокардіальній зоні під час систоли [2, 4], а також значним геометричним перетворенням за рахунок скручування лівого шлуночка [5]. На підставі кінематичного моделювання було зроблено припущення, що систолічне скручування шлуночка та трансмуральне скорочення міофібрил є основними факторами, що формують адекватний серцевий викид у систолі [6].

Також було показано експериментально [7] та теоретично [8], що орієнтація м'язових шарів у стінці лівого шлуночка збігається з площинами максимального стиснення шлуночкової стінки. Дані наукової літератури вказують на існування двох механізмів, за допомогою яких змінюється геометрія стінки шлуночків під час серцевого циклу. При цьому міоламельярна організація міокарда виступає як центральний механізм за рахунок потовщення м'язових пластин та їх взаємного зміщення (ковзання). Дослідження, які присвячені детальному опису міоламельярної структури з урахуванням систоло-діастолічного градієнта змін, проведені лише у вільній стінці лівого шлуночка [9, 10] та при деяких патологічних станах. Також поодинокими залишаються дослідження, які присвячені вивченню механізмів ембріонального розвитку міоламельярної архітектури міокарда [11-13].

Наведені дані вказують, що незважаючи на обмежений діапазон фазових змін довжини саркомера, з яким кардіоміоцити скорочуються та розвивають силу, лівий шлуночок може забезпечувати значно більшу фракцію викиду. Той факт, що міоламельярна структура не характерна для поверхневих субепікардіальних ділянок стінки лівого шлуночка, відображає відносно низький рівень

міжламельярних зрушень у цій локалізації [14, 15].

Таким чином, фазові зміни розмірів субендокардіальної та інтрамуральної зон під час серцевого циклу значно більші, ніж може бути досягнуто за рахунок індивідуального локального скорочення кардіоміоцитів [16-19]. Загальною основою для розуміння того, яким чином обмежений діапазон скорочення саркомерів забезпечує серцевий викид під час систоли, є аналіз онтогенетичного утворення та локальних особливостей розвитку міофібрилярної структури кардіоміоцитів за рахунок зіставлення фазових станів міокарда.

Мета дослідження – визначення топологічних особливостей та кількісна ультраструктурна характеристика саркомерогенезу в кардіоміоцитах курячих ембріонів.

Матеріали та методи

У роботі досліджували зародки курей кросу Cobb500 від початку 10-ї доби (стадія 29 за Hamburger-Hamilton, НН) до 21-ї доби (стадія 46 за НН) інкубації. Яйця інкубували при температурі 39,4°C та відносній вологості повітря 80%. Стадію розвитку визначали за Hamburger-Hamilton [20] відповідно до рекомендацій Martinsen B.J. [13].

Дослідження виконувались у відповідності до принципів Хельсінгської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000), відповідних положень ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств згідно з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших навчальних цілях» [21].

Стан максимальної діастолі моделювали за допомогою розчину хлориду калію: перед фіксацією серце ембріона зі збереженим серцебиттям поміщали в 50 мл розчину, що містить 20 мг КСІ при температурі 37,0°C, і витримували протягом 30 сек при зупинці серцевих скорочень з подальшою фіксацією в охолоджену 2,5%-ому розчині глютаральдегіду. Фіксацію серця ембріона у стані максимальної систоли проводили за аналогічною процедурою в середовищі, що містило 52 мг/мл хлориду барію [22].

Для ультраструктурного дослідження зразки міокарда фіксували при температурі +2°C протягом 3-4 годин у 2,5%-ому розчині глютаральдегіду (виготовленому на 0,2М фосфатному буфері (рН=7,4) з наступною постфіксацією протягом 1 години у 1%-ому забуференому (рН=7,4) розчині тетроксиду осмію («SPI», США), зневодненням у спиртах зростаючої концентрації і пропіленоксиді та виготовленням епоксидних блоків з використанням композиції епон-аралдіт. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікросомі УМТП-6М («SELMI», Україна) та розміщали на мідних опорних сітках Mesh Regular Grid 200 («SPI», США). Подвійне контрастування проводили за методом Рейнольдса [23]. Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного

мікроскопа ПЕМ-100-01 («SELMI», Україна) при напрузі прискорення 65-90 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 25000 за стандартною схемою [18]. Ділянки препаратів вивчалися за модифікованим методом [24] та були фотодокументовані на монохромну плівку «Agfa» з подальшим відцифруванням сканером Canon CanoScan 9000F для планіметричного вимірювання довжини саркомерів.

Визначення статистичної значущості відмінностей проводили з урахуванням критерію *t* Стьюдента. У тому випадку, якщо отримане в дослідженні емпіричне розподілення не відповідало нормальному закону, оцінку відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона для пов'язаних вибірок та Манна-Уїтні для непов'язаних вибірок або із використанням рангового критерію Ван-дер-Вардена.

Результати та їх обговорення

На 29-й стадії розвитку курячих ембріонів у кардіоміоцитах шлуночків вміст міофібрил значно перевищував ступінь їх накопичення в скоротливих клітинах передсердного міокарда. Структура Z-дисків та мезофрагм свідчала про відносну незрілість міофібрил. У стані модельованої діастолі саркомери мали неоднакову довжину, що найчастіше виявлялося у клітинах компактного міокарда правого шлуночка (ПШ). Середня довжина саркомерів становила $1,86 \pm 0,09$ мкм у лівому шлуночку (ЛШ) та $1,91 \pm 0,21$ мкм у ПШ. У передсердному міокарді довжина саркомерів у діастолі помітно поступалася шлуночкам ($1,69 \pm 0,17$ мкм та $1,72 \pm 0,20$ мкм відповідно для лівої та правої камер), проте через суттєве варіювання Z-Z-відстані відмінності не мали статистично достовірної характеру. Анізотропні компоненти саркомерів мали різну електронну щільність у складі сусідніх міофібрил. Мезофрагми саркомерів помітно відставали за ступенем зрілості від телофрагм і були поліморфними на протязі міофібрил на тлі примітивних H-смуг.

У складі ядер кардіоміоцитів нуклеоплазма містила переважно деконденсований хроматин, ядерця мали чіткі межі, їхня структура вказувала на високу функціональну активність. Характерною була наявність ядер у деяких скорочувальних серцевих міоцитів, які мали виражений вигнутий контур ядерної оболонки, характерний для частково скороченого стану клітини. Це свідчило про неповне розслаблення даних клітин і може бути пов'язане, на наш погляд, з незрілістю структур гладкого ендоплазматичного ретикулу, відповідального за повноцінне депонування кальцієвих іонів під час діастолі.

На даному етапі розвитку структури гладкого ендоплазматичного ретикулу не виявлялися у вигляді характерних скупчень поблизу Z-дисків і були представлені порізаними розширеними поліморфними мембранними утвореннями

без певної локалізації в саркоплазмі шлуночкових і передсердних скоротливих кардіоміоцитів. Мітохондрії виявлялися в обмеженій кількості, причому їхня структура залежала від внутрішньоклітинної локалізації. Зокрема, у шлуночкових кардіоміоцитах поблизу ядра органели мали незначно розвинені кристи та помірну електронну щільність. Мітохондрії між міофібрилами мали ознаки більшої функціональної активності.

Міжклітинний матрикс міокарда на 29-й стадії розвитку містив незначну кількість фіброblastів і поодинокі колагенові волокна без виразної взаємної орієнтації. Найчастіше протяжні відростки фіброblastів виявлялися між стінкою гемокapіляра і кардіоміоцитом, вільно розташовуючись в аморфній речовині з низькою електронною щільністю. Шлуночкові та передсердні кардіоміоцити характеризувалися вираженим поліморфізмом, часто розгалужувалися та анастомозували один з одним у різних напрямках, формуючи протяжні адгезійні контакти.

У стані систоли загальна ультраструктура саркоплазми скоротливих клітин не відрізнялася від стану діастолі у всіх камерах. Скорочення довжини саркомерів шлуночкового міокарда становило від 8,3 до 10,2% по відношенню до стану в діастолі. У передсердних кардіоміоцитах систоло-діастолічна різниця цього параметра була ще меншою – від 3,0 до 3,5%. Зазначені відмінності не мали статистичної значущості.

На 29-й стадії розвитку Z-диски мали чітку поперечну орієнтацію у стані систоли як у шлуночках, так і в передсердях. Часто телофрагми склалися з окремих фрагментів, на своїх периферичних ділянках не мали характерної щільності та були представлені скупченнями дрібнодисперсного осміофільного матеріалу, відбиваючи незавершений характер формування дисків. Мезофрагми виявлялися як незначні скупчення електронно-щільного матеріалу в серединних ділянках деяких саркомерів.

Зміни діаметра шлуночкових кардіоміоцитів у стані систоли по відношенню до діастолі були незначними як у компактному, так і в трабекулярному міокарді, незважаючи на значну перевагу товщини скоротливих клітин у трабекулах ЛШ. Міжклітинні простори виглядали як щілини, що варіюють по ширині, заповнені матеріалом низької електронної щільності. У трабекулярному міокарді спостерігалось помірне звуження міжтрабекулярних просторів у порівнянні зі станом діастолі.

Вивчення міокарда на 31-й та 33-й стадіях розвитку у стані максимальної діастолі виявило вищепереджувальне накопичення міофібрил у шлуночковому міокарді порівняно з передсердними кардіоміоцитами та у порівнянні з попередньою стадією розвитку. Z-диски мали високу електронну щільність, мезофрагми, навпаки, надзвичайно низьку, що характеризувало саркомери як незрілі. У

стані модельованої діастолі виявлялася неоднакова довжина саркомерів як у тонкому компактному міокарді шлуночків, так і в добре розвиненому трабекулярному. Середня довжина саркомерів не змінювалася істотно порівняно з 29-ю стадією в досліджуваних відділах серця; лише у кардіоміоцитах лівого передсердя (ЛП) спостерігалася незначне збільшення Z-Z-відстані (табл. 1,

2). При цьому саркомери суттєво варіювали за довжиною як у сусідніх міофібрилах, так і у складі однієї міофібрили. У саркомерах виявлялися численні дрібні осміофільні утворення, що свідчили про активне структуроутворення незрілих міофібрил.

Таблиця 1
Довжина саркомерів кардіоміоцитів компактного шлуночкового міокарда курячих ембріонів, мкм ($M \pm m$)

Стадія	Лівий шлуночок		Правий шлуночок	
	Діастола	Систола	Діастола	Систола
29	1,86±0,09	1,67±0,08	1,91±0,21	1,75±0,06
31	1,82±0,12	1,62±0,11	1,85±0,18	1,71±0,12
33	1,85±0,17	1,66±0,13	1,87±0,15	1,72±0,17
35	1,88±0,11	1,65±0,10	1,84±0,19	1,74±0,16
36	2,02±0,09	1,72±0,08*	1,87±0,16	1,72±0,12
38	2,07±0,09	1,80±0,06*	1,94±0,12	1,77±0,14
41	2,12±0,08	1,82±0,06*	2,10±0,07	1,80±0,12*
43	2,16±0,08	1,80±0,05*	2,11±0,09	1,80±0,07*
46	2,19±0,06	1,83±0,04*	2,15±0,08	1,82±0,08*

Примітка. * – достовірна відмінність ($p < 0,05$) значень у діастолі від відповідних за стадією значень у систолі.

Таблиця 2
Довжина саркомерів кардіоміоцитів передсердного міокарда курячих ембріонів, мкм ($M \pm m$)

Стадія	Ліве передсердя		Праве передсердя	
	Діастола	Систола	Діастола	Систола
29	1,69±0,17	1,64±0,09	1,72±0,20	1,66±0,18
31	1,73±0,19	1,66±0,09	1,75±0,23	1,63±0,16
33	1,81±0,23	1,70±0,11	1,73±0,26	1,67±0,24
35	1,85±0,16	1,71±0,15	1,78±0,22	1,71±0,19
36	1,90±0,18	1,74±0,14	1,80±0,14	1,73±0,22
38	2,04±0,16	1,75±0,12	1,93±0,15	1,74±0,18
41	2,11±0,11	1,75±0,07*	2,02±0,09	1,76±0,15
43	2,14±0,14	1,77±0,05*	2,10±0,09	1,75±0,08*
46	2,12±0,13	1,79±0,05*	2,13±0,08	1,78±0,05*

Примітка. * – достовірна відмінність ($p < 0,05$) значень у діастолі від відповідних за стадією значень у систолі.

Ядра кардіоміоцитів мали ультраструктурні ознаки високої активності. Як і раніше, виявлялися серцеві міоцити з ядрами різної конфігурації, що додатково свідчило про різний ступінь діастолічного розслаблення клітин.

Протягом 31-33-ї стадій розвитку структури гладкого ендоплазматичного ретикулуму залишалися слабо організованими відносно міофібрил і визначалися у вигляді різних поліморфних утворень без упорядкованої організації в саркоплазмі кардіоміоцитів як у шлуночках, так і в передсердях. Кількість мітохондрій порівняно з 29-ю стадією розвитку помітно зростала. Органели поблизу міофібрил збільшувалися і містили добре розвинений апарат крист і матрикс помірної електронної щільності.

Ультраструктурне дослідження міокарда в стані систоли показало суттєву гетероморфність міофібрил як за товщиною, так і за складом та ступенем зрілості саркомерів у всіх камерах серця на 31-й та 33-й стадіях розвитку. Слід зазначити, що фрагментованість матеріалу Z-дисків спостерігалася лише у складі клітин передсердного міокарда, проте скупчення осміофільного тонкодисперсного матеріалу на периферії телофрагм виявлялися також і в кардіоміоцитах шлуночків. Н-смуги і структура мезофрагм ще більшою мірою свідчили про відносну незрілість міофібрил, що було помітніше виражено в компактному міокарді ПШ.

Скорочення довжини саркомерів у стані модельованої систоли по відношенню до діастолі

становило від 7,6% до 11,0% у шлуночковому міокарді і від 3,5% до 6,9% у передсердних кардіоміоцитах.

На 35-й стадії розвитку курячих ембріонів тривало активне накопичення міофібрил у саркоплазмі кардіоміоцитів, більш виражене в шлуночках при порівнянні з передсерддями. У стані діастолі добре візуалізувалися типові структури саркомерів, що свідчило про значно більш зрілі міофібрили порівняно з початковими етапами дослідження. Тим не менш, на даному етапі розвитку в стані максимальної діастолі спостерігалися саркомери з різною довжиною. Більшою мірою це було характерним для передсердних скоротливих кардіоміоцитів. Також відзначалася істотна гетероморфність Z-дисків і мезофрагм, частина з яких мали вигляд повністю сформованих структур, а частина з них – комплексів з різною щільністю і варіабельною осміофілією.

Ядра кардіоміоцитів містили нуклеоплазму з переважанням деконденсованого хроматину, ядра мали чіткі межі, їхня структура вказувала на високу функціональну активність. Ядерна оболонка більшості клітин мала високий вміст ядерних пор, що вказувало на зростання транспортних процесів між ядром та саркоплазмою. Ультраструктура органел на 35-й стадії розвитку значно відрізнялася від початкових етапів дослідження. Зокрема, елементи гладкого ендоплазматичного ретикулуму групувалися поблизу Z-дисків і були представлені неширокими шліноподібними мембранними утвореннями у шлуночкових міоцитах, однак у клітинах передсердь подібні структури не виявлялися. Кількість мітохондрій не зростала суттєво в порівнянні з попередньою стадією, проте ці органели мали більш розвинені кристи і формували значні скупчення навколо ядра.

При моделюванні систоли в міофібрил кардіоміоцитів виявлялися поліморфні Z-диски, частина з яких мали зигзагоподібну форму, що свідчило про структурне дозрівання телофрагм. Тим не менш, про обмежений характер цього дозрівання можна було судити з того, що Z-диски під час систоли розташовувалися на різних рівнях внаслідок зсуву сусідніх міофібрил за їх недостатньої інтеграції елементами цитоскелета. Крім того, частина матеріалу телофрагм, як і на попередніх стадіях, була представлена осміофільним тонкодисперсним матеріалом на їх периферії. Структура мезофрагм також залишалася відносно незрілою як у шлуночках, так і, особливо, в передсерддях. При морфометрії довжини саркомерів в систолі, що моделюється, і розрахунку систолодіастолічного градієнта даного параметра ми не виявили істотних змін порівняно з попередньою стадією розвитку і по відношенню до початкової 29-ї стадії.

На 36-й стадії у стані модельованої діастолі

спостерігалася суттєве наростання довжини саркомерів у скоротливих клітинах компактного міокарда ЛШ та в кардіоміоцитах ЛП, тоді як у ПШ і ПП збільшення Z-Z-відстані було менш активним на даних стадіях розвитку. Поряд із цим у правих відділах серця частіше виявлялися саркомери з неоднаковою довжиною як у компактному міокарді, так і у складі трабекул, проте гетероморфність сусідніх міофібрил у цілому виявлялася значно меншою мірою, ніж на попередніх стадіях розвитку. Привертала увагу така обставина: у різних ділянках міоламель і трабекул ступінь розслаблення саркомерів при моделюванні максимальної діастолі був неоднаковим. Зокрема, у місцях відходження м'язових трабекул та їх прикріплення до вільної стінки шлуночків та передсердь визначалися саркомери із найменшою довжиною. Подібне неповне розслаблення саркомерів відзначалося у початкових і кінцевих ділянках м'язових пластин. У середньому, в основі міоламель та трабекул Z-Z-відстань у стані діастолі складала $1,73 \pm 0,05$ мкм. У серединній частині трабекул довжина саркомерів була помітно більшою ($1,82 \pm 0,04$ мкм), а в проміжній (основній) частині м'язових пластин компактного шлуночкового міокарда саркомери були на 10,4% ($p < 0,05$) довшими, ніж у їхній основі.

На 36-й стадії розвитку ультраструктура кардіоміоцитів свідчила про істотне об'ємне переважання міофібрил над іншими органелами. У складі саркомерів Z-диски мали високу та рівномірну електронну щільність, фрагментовані телофрагми виявлялися рідко та переважно у передсердних кардіоміоцитах. Дрібні осміофільні утворення на тлі рівномірної електронної щільності ізотропних та анізотропних ділянок саркомерів виявлялися у незначних кількостях, що вказувало на більшу зрілість міофібрил у порівнянні з попередніми стадіями розвитку.

У стані модельованої систоли на даному етапі розвитку була характерною наявність Z-дисків, що відхиляються від перпендикулярної орієнтації відносно міофіламентів. Така картина спостерігалася в компактному міокарді обох шлуночків, але не в шлуночкових трабекулах і не передсердному міокарді.

На 36-й стадії розвитку відбувалося незначне подовження саркомерів у компактному міокарді ЛШ, проте систолодіастолічний градієнт досягав величини 0,30 мкм, тобто 14,9% від величини Z-Z-відстані у діастолі, що склало різницю між систолою та діастолою. У міокарді ПШ та передсерддях не виявлялося статистично значущих змін параметра порівняно з попередньою стадією розвитку та по відношенню до початкової 29-ї стадії. При цьому в різних ділянках міоламель і трабекул рівень скорочення саркомерів при моделюванні максимальної систоли, на відміну від діастолі, був рівномірним.

На 38-й стадії розвитку у складі міофібрил Z-

диски мали значну електронну щільність, рівномірно розподілену протягом диска. Фрагментовані телофрагми не виявлялися як у шлуночкових скорочувальних клітинах, так і в передсердних кардіоміоцитах. Дрібні осміофільні утворення на тлі рівномірної електронної щільності ізотропних та анізотропних ділянок саркомерів виявлялися у незначних кількостях, що вказувало на більшу зрілість міофібрилу порівняно з попередніми стадіями розвитку. У стані діастолі телофрагми та ме-

зофрагми мали виразну ортогональну спрямованість по відношенню до міофіламентів у всіх відділах ембріонального серця.

При моделюванні максимальної діастолі найменша Z-Z-відстань виявлялася в кардіоміоцитах основи міоламелл та трабекул. У серединній частині трабекул та у проміжній частині м'язових пластин компактного шлуночкового міокарда саркомери були достовірно довшими, ніж у їх основі (табл. 3).

Таблиця 3

Довжина саркомерів кардіоміоцитів у різних локалізаціях міоламелл та трабекул міокарда курячих ембріонів у діастолі, мкм (M±m)

Стадія	Основа міоламелл і трабекул	Проміжна частина міоламелл	Серединна частина трабекул
36	1,73±0,05	1,91±0,06*	1,82±0,04
38	1,76±0,07	2,01±0,08*	1,98±0,06*
41	1,82±0,09	2,09±0,06*	2,04±0,08*
43	1,94±0,08	2,13±0,08	2,06±0,08
46	2,02±0,10	2,17±0,07	2,12±0,13

Примітка. * – достовірна відмінність ($p < 0,05$) від значень параметра в основі міоламелл і трабекул.

На відміну від діастолі, у стані систоли спостерігалася виражена тангенціальна орієнтація Z-дисків у складі міофібрил кардіоміоцитів ЛШ. Найбільшою мірою це виявлялося у тих ділянках м'язових пластин, які належали до перимізії і були звернені до периваскулярного простору. Нелінійне розширення прошарків перимізії у цих просторах призводило до формування вигнутих контурів кардіоміоцитів. У правошлуночкових кардіоміоцитах, а також у скоротливих клітинах обох передсердь при моделюванні систоли зберігалася переважно ортогональна орієнтація телофрагм та мезофрагм.

На 38-й стадії розвитку відбувалося незначне подовження саркомерів в компактному міокарді ЛШ, проте систоло-діастолічний градієнт вказував на достовірну різницю між систолою і діастолю. У міокарді ПШ та передсердях не виявлялося статистично значущих змін параметра порівняно з попередньою стадією розвитку та по відношенню до початкової 29-ї стадії. Різниця між діастолічним та систолічним значеннями довжини саркомерів не перевищувала порога статистичної значущості. У різних ділянках міоламелл та трабекул ступінь скорочення саркомерів при моделюванні максимальної систоли був рівномірним.

У стані модельованої систоли на 41-й та 43-й стадіях розвитку посилювалася тангенціальна орієнтація Z-дисків та мезофрагм у міофібрилах кардіоміоцитів ЛШ. Навпаки, у ПШ та в обох передсердях скоротливі структури серцевих міоцитів характеризувалися переважно ортогональною орієнтацією телофрагм та мезофрагм щодо поздовжньої вісі міофібрил.

Довжина скорочених саркомерів стабілізувалася у складі шлуночкового та передсердного міокарда, причому за рахунок більш повноцінного розслаблення саркомерів у діастолі величина фазового градієнта їх довжини в період 41-43-ї стадії розвитку досягала статистично значущого рівня не лише у ЛШ, як на попередній стадії, але й у ПШ і в передсердях, складаючи величину від 0,30 до 0,37 мкм.

Дослідження ембріонального серця на заключній 46-й стадії ембріогенезу показало добре сформовані структури саркомерів і відносно зрілість міофібрил. Z-диски та мезофрагми мали однорідну електронну щільність на всьому протяжі, міофібрили займали значний обсяг шлуночкових та передсердних скоротливих клітин, саркомери на протяжності міофібрил та у сусідніх міофібрилах мали однакову довжину.

Ортогональна орієнтація Z-дисків була характерною для скоротливих кардіоміоцитів всіх камер серця в стані діастолі, проте довжина саркомерів була неоднаковою в різних локалізаціях. Найбільший ступінь розслаблення саркомерів (2,17±0,07 мкм) був характерним для проміжної (основної) частини міоламелл обох шлуночків, меншою мірою подовжувалися саркомери в серединній частині передсердних і шлуночкових трабекул (2,12±0,13 мкм), найменша діастолічна Z-Z-відстань (2,02±0,10 мкм) спостерігалася в основі трабекул усіх камер серця, а також у базальних частинах міоламелл обох шлуночків.

Ядра кардіоміоцитів містили ознаки помірної активності, більша частина гетерохроматину виявлялася на внутрішній поверхні ядерної оболонки, ядерця мали добре окреслені межі та чітку

структурованість. Ядерна оболонка більшості клітин мала більш високий вміст ядерних пор, ніж на попередніх стадіях розвитку. Отже, на заключному етапі ембріогенезу на тлі відносного зниження активності нуклеоплазми спостерігалось значне зростання інтенсивності транспорту між ядром і саркоплазмою. Мітохондрії між міофібрилами набували довгастої форми, містили добре розвинені кристи, помірно електроннощільний матрикс. У кардіоміоцитах шлуночків міжміофібрилярні мітохондрії часто формували скупчення в кілька рядів. Ознаки функціональної активності мітохондрій у навколядерних ділянках кардіоміоцитів були менш вираженими. У передсердних клітинах мітохондрії мали невеликий розмір і розташовувалися поодиноці.

У стані систоли довжина скорочених саркомерів варіювала дуже незначно і становила в середньому $1,83 \pm 0,04$ мкм. Систолю-діастолічний градієнт довжини саркомерів у ЛШ досягав $0,36 \pm 0,03$ мкм, що становило 16,4% від діастолічної Z-Z-відстані. У ПШ і передсердному міокарді систолічне скорочення не змінювало ортогональної орієнтації телофрагм і вставних дисків при однорідному скороченні саркомерів в межах 1,79-1,84 мкм. Фазовий градієнт довжини саркомерів за величиною можна порівняти з показниками ЛШ.

Підсумок

Таким чином, до кінця ембріонального розвитку курячих зародків формувалася і посилювалася тангенціальна орієнтація Z-дисків міофібрил та форми кардіоміоцитів у стані систоли за рахунок взаємного зміщення сусідніх міоламелл у ході протиспрямованого обертання базальної та апікальної частин ЛШ при скороченні саркомерів до $1,83 \pm 0,04$ мкм. У ПШ і передсердному міокарді систолічне скорочення не змінювало ортогональної орієнтації телофрагм і вставних дисків при скороченні саркомерів до 1,79-1,84 мкм. У стані діастолі ортогональна орієнтація Z-дисків характерна для скоротливих кардіоміоцитів всіх камер при досягненні довжини саркомерів $2,17 \pm 0,07$ мкм – у проміжній частині міоламелл обох шлуночків, $2,12 \pm 0,13$ мкм – у серединній частині передсердних і шлуночкових трабекул, $2,02 \pm 0,10$ мкм – в основі трабекул усіх камер та м'язових пластин обох шлуночків.

Перспективи подальших досліджень полягають у морфологічному дослідженні постнатального розвитку скоротливого апарату міокарда.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Виконання даного дослідження та написання рукопису було виконано без зовнішнього фінансування.

Літературні джерела References

1. Spotnitz HM, Spotnitz WD, Cottrell TS. Cellular basis for volume related wall thickness changes in the rat left ventricle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1974;6:317-31.
2. Torrent-Guasp F, Kocica M, Corno F. Systolic ventricular filling. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2004;25:376-86.
3. Weisman HB, Bush DE, Mannisi JA. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation.* 1988;78:186-201.
4. Kwan J. 3D geometry of a normal tricuspid annulus during systole: A comparison study with the mitral annulus using real-time echocardiography. *Eur. J. Echocardiography.* 2007;283:375-83.
5. Arts T, Costa KD, Covell JW, McCulloch AD. Relating myocardial laminar architecture to shear strain and muscle fiber orientation. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2001;280:2222-9.
6. Qyen N, Poulsen G, Boyd H. National time trends in congenital heart defects. *Amer. Heart J.* 2009;157(3):467-73.
7. Costa KD, Takayama Y, McCulloch AD, Covell JW. Laminar fiber architecture and three-dimensional systolic mechanics in canine ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* 1999;276:595-607.
8. Chen J, Liu W, Zhang H. Regional ventricular wall thickening reflects changes in cardiac fiber and sheet structure during contraction: quantification with diffusion tensor MRI. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2005;289:1898-907.
9. Cheng A, Langer F, Rodriguez F. Transmural sheet strains in the lateral wall of the ovine left ventricle. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2005;289:1234-41.
10. Gilbert SH, Benson AP, Li P. Localisation of left ventricular sheet structure: integration with current models of cardiac fibre, sheet and band structure. *Regional Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2007;32:231-49.
11. Damon BJ, Rémond MC, Bigelow MR. Patterns of muscular strain in the embryonic heart wall. *Dev. Dyn.* 2009;238(6):1535-46.
12. Ewald AJ, McBride H, Reddington M. Imaging microscopy, an automated method for visualizing whole embryo samples in three dimensions at high resolution. *Dev. Dyn.* 2002;12:369-75.
13. Martinsen BJ. Reference guide to the stages of chick heart embryology. *Dev. Dyn.*

2005;233:1217–37.

14. Costa KD, May-Newman K, Farr D. Three-dimensional residual strain in midanterior canine left ventricle. *Am. J. Physiol.* 1997;273:1968-76.

15. Zhou J, Shu Y, Lü S. The spatiotemporal development of intercalated disk in three-dimensional engineered heart tissues based on collagen/matrigel matrix. *PLoS One.* 2013;8(11):814-20.

16. Helm PA, Younes L, Beg MF et al. Evidence of structural remodeling in the dyssynchronous failing heart. *Circ. Res.* 2006;98:125-32.

17. Buckberg GD. Stonehenge and the heart: similar construction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2006;29:286-90.

18. Harrington KB, Rodriguez F, Cheng A. Direct measurement of transmural laminar architecture in the anterolateral wall of the ovine left ventricle: new implications for wall thickening mechanics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;288:1324-30.

19. Dokos S, Smaill BH, Young AA, LeGrice JJ. Shear properties of passive ventricular myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002;283:2650-9.

20. Hamburger V. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 1951;88(1):49-92.

21. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. 18 Mar 1986. 53 p.

22. Jacobs RE, Fraser KE. Magnetic resonance microscopy of embryonic cell lineages and movements. *Science.* 1994;263:681–4.

23. Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols. Totowa, New Jersey : Humana Press Inc; 2007. 608 p.

24. Tverdokhlib IV, Petruk NS, Ivanchenko MV, Silkina JuV, Khripkov IS, Pertseva NO, Shevchenko KM, Goodlett TO, Malkov II, Berehovenko IM, Zinenko DYU, Galaida NO, Varin VV, inventors; State Institution «Dnipropetrovsk medical academy of the Health Ministry of Ukraine». Method of determining the coordinates of ultrastructures in transmission electron microscopy of biological objects. Ukrainian patent UA 83611. 2013 Sep 25. Int. Cl. G01N 1/28. Ukrainian.

Маслак Г.С., Онисько Р.М., Челпанова І.В. Взаємозв'язок між саркомерогенезом і розвитком тканинної організації міокарда в ембріональному кардіогенезі курки.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Загальною основою для розуміння того, яким чином обмежений діапазон скорочення саркомерів забезпечує серцевий викид під час систоли, є аналіз онтогенетичного утворення та локальних особливостей розвитку міофібрилярної структури кардіоміоцитів за рахунок зіставлення фазових станів міокарда. **Мета** дослідження – визначення фазових і топологічних особливостей та кількісна ультраструктурна характеристика саркомерогенезу в кардіоміоцитах курячих ембріонів. **Методи.** У роботі досліджували зародки курей кросу Cobb500 від початку 6-ї доби до 21-ї доби інкубації. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії вивчали ультраструктурні особливості скоротливих кардіоміоцитів у різних ділянках шлуночкового та передсердного міокарда у стані систоли та діастолі. **Результати.** На 29-й стадії розвитку курячих ембріонів у стані діастолі незрілі саркомери мали різну довжину. Середня довжина саркомерів становила $1,86 \pm 0,09$ мкм у лівому шлуночку та $1,91 \pm 0,21$ мкм у правому шлуночку. У передсердному міокарді довжина саркомерів поступалася параметрам шлуночків. На 36-й стадії у стані діастолі спостерігалось суттєве наростання довжини саркомерів у компактному міокарді лівого шлуночка та лівого передсердя, тоді як у правих відділах серця збільшення Z-Z-відстані було менш активним. У правих відділах серця частіше виявлялися саркомери з неоднаковою довжиною у компактному міокарді та в трабекулах. У різних ділянках міоламелл і трабекул ступінь розслаблення саркомерів при моделюванні максимальної діастолі був неоднаковим. Зокрема, у місцях відходження м'язових трабекул та їх прикріплення до вільної стінки шлуночків та передсердь визначалися саркомери із найменшою довжиною. Неповне розслаблення саркомерів відзначалося у початкових і кінцевих ділянках м'язових пластин. У середньому, в основі міоламелл та трабекул Z-Z-відстань у стані діастолі складала $1,73 \pm 0,05$ мкм. У середній частині трабекул довжина саркомерів була помітно більшою ($1,82 \pm 0,04$ мкм), а в проміжній (основній) частині м'язових пластин компактного шлуночкового міокарда саркомери були на 10,4% ($p < 0,05$) довгими, ніж у їхній основі. **Підсумок.** До кінця пренатального кардіогенезу формувалася і посилювалася тангенціальна орієнтація Z-дисків міофібрил та форми кардіоміоцитів у стані систоли за рахунок взаємного зміщення сусідніх міоламелл у ході протиспрямованого обертання базальної та апікальної частин лівого шлуночка при скороченні саркомерів до $1,83 \pm 0,04$ мкм. У правому шлуночку і передсердному міокарді систолічне скорочення не змінювало ортогональної орієнтації телофрагм і вставних дисків при скороченні саркомерів до $1,79$ - $1,84$ мкм. У стані діастолі ортогональна орієнтація Z-дисків характерна для скоротливих кардіоміоцитів всіх камер при досягненні довжини саркомерів $2,17 \pm 0,07$ мкм – у проміжній частині міоламелл обох шлуночків, $2,12 \pm 0,13$ мкм – у середній частині передсердних і шлуночкових трабекул, $2,02 \pm 0,10$ мкм – в основі трабекул усіх камер та м'язових пластин обох шлуночків.

Ключові слова: зародок курки, кардіогенез, серце, кардіоміоцит, саркомер, гістоархітектура, ультраструктура.