

## КАК ВЫЖИВАЕТ КУРИНЫЙ ЭМБРИОН ПОСЛЕ ЗАКРЫТИЯ ПОЛОВИНЫ СКОРЛУПЫ?

© 2009 г. И. М. Коростышевская, В. Ф. Максимов

ГУ НИИ физиологии СО РАМН

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 4

E-mail: kor@physiol.ru

Поступила в редакцию 24.01.08 г.

Окончательный вариант получен 11.08.08 г.

Исследование проведено с целью выяснения особенностей развития газотранспортных систем у куриных эмбрионов после закрытия на 11-е сут инкубации половины поверхности скорлупы. К концу 3-х сут эксперимента (14-е сут инкубации) редукция сосудов в хориоаллантаоисе под закрытой зоной полностью компенсируется расширением и разрастанием сосудов в интактной половине. Параллельно возрастает кислородная емкость крови и усиливается гемопоэз: в полтора раза повышаются показатели гематокрита, гемоглобина и числа эритроцитов. Ускоряется формирование миокарда левого желудочка за счет гиперплазии мышечных клеток и их более зрелой ультраструктурной организации. Полученные данные свидетельствуют, что гипоксия ускоряет развертывание программы эмбрионального развития и приводит к более ранней и быстрой дифференцировке газотранспортных систем. Однако эффективность антигипоксических реакций ограничивается невозможностью увеличения плотности капилляров в дыхательной сети хориона. Через 1 нед эксперимента (18-е сут инкубации) суммарный объем сосудов хориоаллантаоиса снижается вдвое по сравнению с контролем, а в его открытой половине значительно утолщаются стенки артерий, что вызывает повышение периферического сопротивления. В левом желудочке развивается коронаросклероз и дистрофия кардиомиоцитов. Эти признаки нарушения общей гемодинамики сочетаются с заметной задержкой роста эмбрионов. Таким образом, к этому сроку структурная компенсация газотранспортных систем в опытной серии оказывается исчерпанной и неспособной обеспечивать возрастающие метаболические запросы растущего эмбриона.

*Ключевые слова:* хориоаллантаоис, сердце, кровь, гипоксия, куриный эмбрион.

Высокая устойчивость эмбрионов к гипоксии давно интригует исследователей уже потому, что в отличие от взрослых особей они лишены возможности активно регулировать воздухообмен и поступление кислорода. Куриный эмбрион в условиях острой гипоксии (7–8% O<sub>2</sub>) на 17–20-е сут инкубации может снижать уровень метаболизма до 19% от нормы, а новорожденный цыпленок – только до 78% (Vjornes et al., 1987). В аноксических условиях сердце 12-суточного куриного эмбриона может сокращаться 65 мин (Ag et al., 1987). Успешная компенсация длительной гипоксии у эмбриона подразумевает не только поддержание метаболизма, но и увеличение массы тела, достаточное для проклева в воздушную камеру яйца на 18–19-е сут и для вылупления на 21-е сут инкубации. Несмотря на активное изучение органных, тканевых, клеточных и молекулярных механизмов этого феномена, основы его остаются во многом непонятными. Исключение составляют тибетские куры, которые успешно размножаются на высоте более 4 км над уровнем моря, поскольку имеют мутацию, повышающую стабиль-

ность гема и аффинность гемоглобина к кислороду (Gou et al., 2005; Wang et al., 2007).

Самое логичное объяснение антигипоксических возможностей эмбриона подразумевает наличие каких-то особенностей формирования и функционирования органов дыхания. Еще классиками эмбриологии установлено, что внутри- и внеэмбриональные газотранспортные системы у эмбрионов кур закладываются очень рано и развиваются быстрее, чем многие другие системы жизнеобеспечения. Уже к концу 2-х сут инкубации появляются кровяные островки в стенке желточного мешка и начинает сокращаться сердце эмбриона, хотя его морфогенез завершается только к середине (к 10-м сут) инкубации (Keller et al., 1996).

Большую часть эмбриогенеза органом внешнего дыхания у птиц служит самый наружный внезародышевый листок – хориоаллантаоисная оболочка (ХАО). У кур она образуется на 4-е сут инкубации за счет срастания хориона и растущего аллантаоиса с разветвлением в мезодермальном слое двух хориоаллантаоисных артерий и одной вены. С 5-х по 6-е сут площадь ХАО увеличивается в 10–20 раз (Melkonian et al., 2003), что обеспе-

чивает переход эмбриона с желткового на аллантоисный тип дыхания. Крупные сосуды ХАО легко доступны для визуального наблюдения, поэтому ХАО широко используется для изучения ангиогенеза и тестирования ангиотропных веществ. Однако многие детали строения и функционирования уникального органа, который за три недели успевает вырасти, обеспечить важнейшие метаболические потребности развивающегося эмбриона в замкнутом пространстве яйца и атрофироваться, остаются декларативными. Наименее изученный сегмент русла – капилляры, обеспечивающие газообмен с внешней средой. В литературе до сих пор нет четкого представления о строении этих сосудов, так как их методически трудно препарировать и визуализировать (Ribatti et al., 2001). Они пространственно отделены от транспортных сосудов мезодермального слоя ХАО и располагаются на поверхности хориального эпителия в непосредственной связи с подскорлупной пленкой. Эта уникальная по морфофункциональным особенностям капиллярная дыхательная сеть не имеет аналогов у млекопитающих (Коростышевская и др., 2006; Максимов и др., 2006).

Влиянию гипоксии на развитие куриных эмбрионов посвящено огромное количество работ, но большинство результатов было получено в моделях гипобарической гипоксии. Если яйца длительно инкубировать при пониженном парциальном давлении кислорода, масса тела эмбриона уменьшается, а в ХАО дозозависимо увеличивается плотность сосудов (Adair et al., 1987; Dusseau et al., 1986; Dusseau, Hutchins, 1989; Strick et al., 1991; Reizis et al., 2005). Лишь в единичных опытах используется модель изоляции части скорлупы (с помощью воска, клея или специальной пленки), что дает возможность оценить компенсаторную пластичность сосудистого русла ХАО. Если на разных этапах эмбриогенеза закрыть половину скорлупы и инкубировать яйцо в гипероксических условиях, плотность сосудов на закрытой стороне ХАО снижается ниже нормы, а общий объем васкуляризации не меняется. Авторы не нашли у опытных эмбрионов разницы с контрольными по потреблению кислорода, остаточному белку и массе (Wagner-Amos, Seymour, 2002, 2003).

Цель нашей работы – выяснение особенностей развития газотранспортных систем у куриных эмбрионов и оценка их компенсаторных возможностей после закрытия половины поверхности скорлупы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на эмбрионах кур породы Шавер-Рот Айленд из Госплемптицезавода “Новосибирский”. Яйца массой 55–70 г инкубировали при температуре 38–37.5°C и 56–40%-ной влажности и вскрывали (по 5–7 шт.) на 7, 10, 12, 14, 18 и 20-е сут инкубации. В экспериментальной серии на 11-е сут инкубации часть скорлупы (25, 50, 75% по большому экватору и 100% – по 10 шт. на опыт) покрывали густой взвесью алюминиевой

пудры в желтке и, не нарушая ориентацию в пространстве, продолжали инкубацию вместе с контрольной серией. На 14- и 18-е сут яйца вскрывали вдоль большого экватора, забирали для гистологического исследования ХАО под открытой и закрытой зонами и сердце эмбриона. В аналогичном эксперименте (62 яйца) извлекали эмбрионы и собирали кровь из аллантоисных сосудов. Анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Micros 60 (“АВХ”, Франция).

Для гистологического исследования материал фиксировали в 10%-ном забуференном формалине и обрабатывали по стандартной методике. Парафиновые срезы толщиной 2–5 мкм приготавливали на ультратоме LKB-3, Швеция, окрашивали гематоксилином и эозином. Толщину слоев ХАО и диаметр кардиомиоцитов измеряли окулярной линейкой с ценой деления 1.54 мкм, увел.  $\times 700$ . Относительный объем сосудистого русла в мезодермальном слое ХАО и кардиомиоцитов в миокарде левого желудочка определяли с помощью квадратной тестовой решетки (289 точек, 0.018 мм<sup>2</sup>, увел.  $\times 700$ ). Препараты фотографировали (об.  $\times 10$ ) с помощью цифровой камеры MC-2000 (“Motic”, Китай) на микроскопе Axiostar plus (“Zeiss”, Германия). Периметры сосудов и их просветов измеряли на поперечных срезах ХАО, используя пакет программ Motic Images 2000 (1.3); рассчитывали наружный диаметр сосуда ( $D_n$ ), диаметр просвета ( $D_p$ ) и индекс стенка/просвет  $(D_n - D_p)/D_p$ .

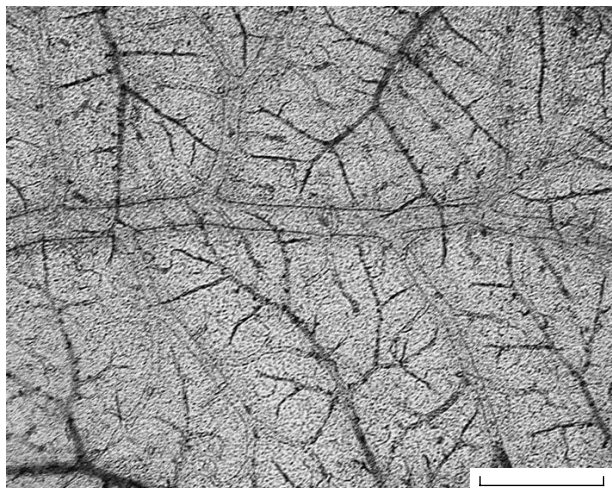
Для выявления дыхательной капиллярной сети фиксированные тотальные препараты ХАО после гидропрепаровки импрегнировали аммиачным серебром по Массону. С помощью квадратной тестовой решетки (81 точка, увел.  $\times 450$ ) определяли в каждом случае в 10 полях зрения относительную площадь капилляров на поверхности хориального эпителия. Диаметр капилляров и длину сегментов капиллярной сети измеряли так же, как толщину слоев ХАО.

Для электронной микроскопии материал фиксировали в смеси растворов 2.5%-ного глутарового альдегида и 2.0%-ного параформальдегида, дофиксировали 1.0%-ным раствором четырехоксида осмия, а затем заключали в смесь эпона и аралдита. Препараты контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM100S (“JEOL”, Япония).

Вариационные ряды обрабатывали с помощью пакета программ Statistica 6.0, результаты представляли в виде среднего значения и ошибки среднего ( $M \pm m$ ). Достоверность различий с контролем определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента для независимых выборок при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

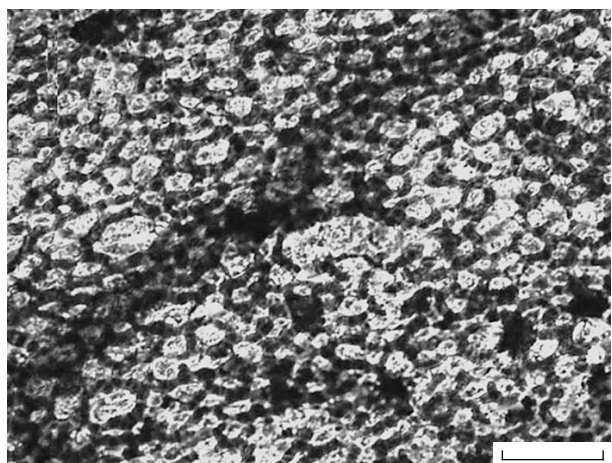
*Онтогенетическое развитие сосудистого русла хориоаллантоиса.* На 7-е сут инкубации хориоаллантоис покрывает от трети до половины поверхности желтка и не связан с подскорлупной



**Рис. 1.** Общая архитектура сосудистого русла в мезодермальном слое хориоаллантаоиса куриного эмбриона; встречно-параллельное ветвление приносящих (с эритроцитами) и выносящих сосудов, 12-е сут инкубации (тотальный препарат, импрегнация аммиачным серебром). Масштаб: 500 мкм.

пленкой. Крупные сосуды ХАО легко доступны для визуального наблюдения. Импрегнация тотальных препаратов выявляет в мезодерме лишь магистральные пути и крупно-петлистую сеть из протососудов средним диаметром  $17.6 \pm 0.59$  мкм. Протососуды практически сразу замыкают магистрали друг на друга, а в образованных ими многоугольных ячейках со сторонами 182–312 мкм невозможно определить направление кровотока.

К 10-м сут инкубации ХАО полностью обрастает яйцо и смыкается на его остром конце. Это сопровождается формированием в мезодерме более зрелого кровеносного дерева, в котором крупные сосуды располагаются попарно (артерии



**Рис. 2.** Окрашенные эритроциты в капиллярах надхориальной дыхательной сети (пленочный препарат хориоаллантаоиса куриного эмбриона, импрегнация аммиачным серебром). Масштаб: 50 мкм.

над венами) на протяжении начальных трех–четырёх совместных ветвлений. Когда калибр сосудов уменьшается до 80–20 мкм, ветвление приносящих и выносящих сосудов становится строго поочередным через равные промежутки. Эти ветви вплоть до мельчайшего калибра располагаются встречно-параллельно (рис. 1). На поперечных гистологических срезах ХАО видно, что самые мелкие разветвления (диаметром около 9 мкм) стремятся максимально приблизиться к источнику кислорода, для чего по межклеточным щелям хориального эпителия сосуды капиллярного типа проникают на поверхность оболочки, вплотную соприкасаясь с подскорлупной пленкой. На импрегнированных пленках видно, что эта сеть сплошным ковром лежит на хориальном эпителии и состоит из 5, 6-угольных ячеек с ребром 8–12 мкм.

До 12-х сут инкубации включительно происходит развитие дыхательной сети капилляров: они становятся тоньше, короче, образованные ими ячейки уменьшаются, а относительная площадь покрытия хориона приближается к максимальной. На этом завершается формирование хориоаллантаоиса как органа со всеми структурными компонентами. На 12–15-е сут надхориальная капиллярная сеть наиболее густая, капиллярные сегменты короткие ( $5.3\text{--}7.0$  мкм) и узкие ( $4.4 \pm 0.23$  мкм), покрывают около 90% поверхности хориального эпителия (рис. 2, 3). По узкому просвету капилляров эритроциты продвигаются в один ряд. С помощью электронного микроскопа мы увидели, что стенки капилляров очень плотно прилежат к подскорлупной пленке и представлены базальной мембраной и сближенными мембранами плазмалеммы. Основная часть цитоплазмы эндотелиоцитов с ядром располагается на противоположной стороне ближе к хориальному эпителию (Коростышевская и др., 2006; Максимов и др., 2006). Эти структурные особенности уменьшают диффузионный путь кислорода до гемоглобина и способствуют эффективному газообмену.

Сформированная подобным образом сосудистая система хориоаллантаоиса обеспечивает большой прирост массы эмбриона с 11-х по 18-е сут в среднем на 20 г. После 18-х сут, когда эмбрион постепенно переходит на дыхание легкими, значение дыхательной функции в ХАО снижается. Морфометрически эти процессы проявляются редукцией и запустеванием капиллярной сети (рис. 3), а также признаками расстройства кровообращения и дистрофическими изменениями сосудов мезодермы.

*Изменение сосудистого русла хориоаллантаоиса через 3 сут после закрытия половины поверхности скорлупы (14-е сут инкубации).* На 3-и сут эксперимента под открытой половиной скорлупы ХАО выглядит ярко-розовой из-за наличия в ней многочисленных сосудов. Исследование поперечных гистологических срезов из этой зоны показало, что между подскорлупной пленкой и ХАО располагается плотный слой капилля-

ров. Многочисленные сосуды капиллярного типа пронизывают хориальный эпителий и объединяются с сосудами в подлежащей мезодерме. Стереометрия выявила в открытой зоне повышенную, по сравнению с контролем, плотность сосудов в мезодермальном слое ХАО с пропорциональным представителем сосудов приносящего и выносящего звена. Средний диаметр артерий и их просветов оказался достоверно больше, чем в контроле, а индекс “стенка/просвет” – ниже (табл. 1). Все сосуды выглядят перерастянутыми, что подтверждается сдвигом гистограммы распределения сосудов по калибру в сторону больших значений по сравнению с контролем. Особенно это заметно в артериях самого мелкого (10–45 мкм) и крупного (>60 мкм) диаметров. В этих же диапазонах – в мелких прекапиллярных артериолах (до 45 мкм в диаметре) и крупных, но не магистральных артериях (61–100 мкм в диаметре) – зафиксировано достоверное, по сравнению с контролем, снижение индекса “стенка/просвет” (рис. 4, а). Наиболее переполненными выглядят тонкостенные выносящие сосуды, чей относительный объем в мезодермальном слое оказался много больше, чем в контроле. Толщина самого мезодермального слоя в открытой зоне тоже намного превышает контрольные показатели (табл. 1).

Эти наблюдения подтверждаются исследованием импрегнированных тотальных пленок ХАО, на которых газообменные капилляры в открытой зоне представляют плотную ячеистую сеть, заполненную эритроцитами. С помощью морфометрии показано, что капилляры становятся шире и длиннее, чем в контроле (табл. 1), а некоторые имеют настолько большой просвет, что крупные ядерные эритроциты овальной формы помещаются в просвете несколькими рядами. Эта картина принципиально отличается от контроля, где просвет дыхательного капилляра, как правило, полностью заполняет один эритроцит.

В том же опыте под закрытой половиной скорлупы ХАО выглядит бледной. Неравномерный рисунок мелких сосудов и извитой ход магистралей придают ей “мраморный” вид. Гистологическое исследование показало, что толщина ХАО становится значительно меньше, чем в контроле и тем более в открытой зоне, за счет истончения и уплотнения мезодермального слоя. Хориальный эпителий приобретает признаки глубокой дистрофии, капилляры в эпителии и над ним щелевидные и редко выявляются на срезах. В мезодермальном слое мелкие сосуды редуцируются, а вокруг крупных располагаются клетки макрофагального ряда, встречаются сегментоядерные лейкоциты. Просветы сохранившихся магистральных сосудов узкие, их стенка – гофрированная и тонкая, что подтверждают стереометрические показатели. В большей степени редукция затрагивает выносящее звено, относительный объем которого снижается вдвое по сравнению с

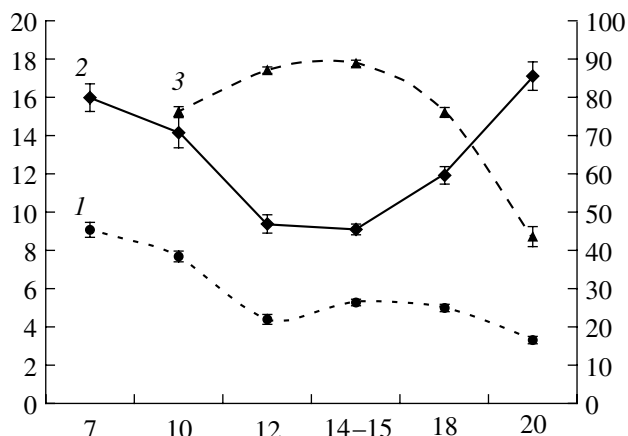


Рис. 3. Изменение параметров дыхательной капиллярной сети хориоаллантаиса в контроле на разных сроках инкубации (по оси абсцисс, сут). По оси ординат: слева, мкм: 1 – диаметр, 2 – длина сегментов; справа, %: 3 – относительная площадь покрытия хориального эпителия.

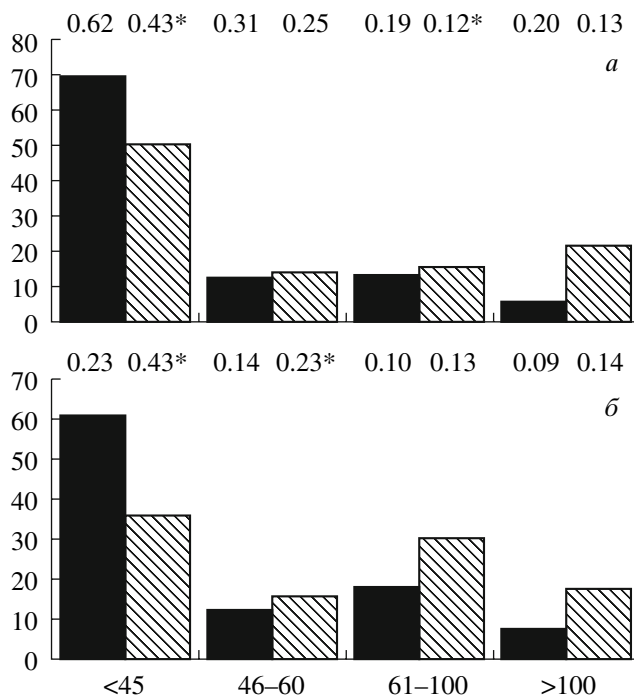


Рис. 4. Распределение сосудов (по оси ординат, %) по наружному диаметру (по оси абсцисс, мкм) после закрытия половины скорлупы газонепроницаемым слоем в открытой зоне хориоаллантаисной оболочки куриного эмбриона; указаны отношения стенка/просвет для каждого разряда, \* различия с контролем достоверны при  $p < 0.05$ .

а – 3 сут опыта, 14-е сут инкубации; б – 7 сут опыта, 18-е сут инкубации; (■) – контроль, (▨) – опыт.

контролем (табл. 1). Более наглядно перестройки сосудов прослеживаются на импрегнированных пленочных препаратах. За 3 сут эксперимента под закрытой скорлупой в мезодермальном слое

**Таблица 1.** Параметры кровеносного русла хориоаллантоиса у куриных эмбрионов на 14-е и 18-е сут инкубации в контроле и после закрытия с 11-х сут половины поверхности скорлупы

Параметр	14-е сут			18-е сут		
	Контроль (7)	Зона		Контроль (9)	Зона	
		открытая (5)	закрытая (5)		открытая (8)	закрытая (5)
Число измерений	70	50	40	80	50	50
Толщина, мкм	49.7 ± 1.62	56.3 ± 3.18*	33.6 ± 2.35*#	83.2 ± 2.29	59.9 ± 5.18*	44.1 ± 1.90#
– хориоаллантоиса						
– мезодермального слоя	38.7 ± 1.25	46.7 ± 3.16*	22.3 ± 2.15*#	68.4 ± 2.00	46.3 ± 5.00*	26.4 ± 1.88*#
Число измерений	70	50	50	80	50	50
Относительный объем в мезодерме, %						
– артерий	5.5 ± 0.66	7.0 ± 0.97	3.6 ± 0.37*#	9.5 ± 0.95	8.4 ± 0.92	7.3 ± 0.74
– вен	7.0 ± 0.59	7.1 ± 1.10	2.9 ± 0.45*#	8.7 ± 0.62	6.5 ± 0.74	2.5 ± 0.37*#
– лимфатических сосудов	0.7 ± 0.22	5.5 ± 0.77*	0.8 ± 0.22#	–	4.6 ± 0.54	1.2 ± 0.24#
Число измерений	208	124	–	209	257	–
Диаметр артерии, мкм						
– наружный	40.5 ± 2.00	66.1 ± 4.94*	–	48.3 ± 2.11	67.5 ± 2.77*	–
– просвета	30.7 ± 1.87	56.3 ± 4.55*	–	41.9 ± 2.03	58.0 ± 2.56*	–
Индекс “стенка/просвет”	0.50 ± 0.02	0.46 ± 0.12	–	0.21 ± 0.01	0.26 ± 0.02*	–
Число измерений	60	75	75	80	60	75
Диаметр капилляра, мкм	5.5 ± 0.18	8.1 ± 0.13*	6.1 ± 0.14*#	5.0 ± 0.16	5.0 ± 0.13	4.9 ± 0.18
Длина сегмента сети, мкм	10.1 ± 0.39	12.4 ± 0.31*	9.0 ± 0.21*#	12.0 ± 0.42	10.0 ± 0.33*	9.9 ± 0.34*
Площадь покрытия хориона, %	87.7 ± 0.64	88.7 ± 0.64	37.0 ± 1.26*#	76.6 ± 1.01	86.4 ± 0.94*	53.5 ± 0.75*#

Примечание. В скобках – число эмбрионов, \* различия с контролем достоверны, # различия между зонами достоверны ( $p < 0.05$ ).

между магистральными стволами исчезают сосуды среднего и мелкого калибра, над этими бессосудистыми зонами практически редуцируется дыхательная капиллярная сеть (табл. 1).

*Изменение сосудистого русла хориоаллантоиса через 7 сут после закрытия половины поверхности скорлупы (18-е сут инкубации).* При вскрытии скорлупы на 18-е сут инкубации визуальные отличия между половинами ХАО такие же, как и на предыдущем сроке, но гистологическое исследование показало, что разница всех исследованных параметров становится меньшей, хотя остается достоверной. По полученным данным, толщина ХАО и ее мезодермального слоя в открытой зоне на треть меньше, чем в контроле. Относительный объем сосудов в мезодерме (немного менее 20%) сохраняется на контрольном уровне, но объемная доля тонкостенных выносящих сосудов превалирует над таковой приносящих (табл. 1). Подробный морфометрический анализ показал, что в артериальном звене заметно уменьшается доля мелких сосудов (до 60 мкм в диаметре) и значительно увеличивается толщина их стенки (рис. 4, б), что выражается в достоверном увеличении среднего калибра и индекса “стенка/просвет” (табл. 1). Особенно сильная гипертрофия стенки отмечается в сосудах на границе с закрытой зоной. Капиллярная дыхательная

сеть, как подсчитано на импрегнированных препаратах, представлена более плотной, чем в контроле, сетью полигональных ячеек. Составляющие ее капиллярные звенья короче, но одного с контролем диаметра (табл. 1).

Исследование поперечных гистологических срезов ХАО в закрытой зоне на 7-е сут эксперимента свидетельствует, что ее мезодермальный слой становится еще тоньше, чем в открытой зоне, и выглядит уплотненным за счет многочисленных стромальных клеток. Сосудистое русло в нем представлено редкими пучками магистральных сосудов и сосудами среднего калибра. В отличие от открытой половины в закрытой зоне редукции подвергается в большей мере выносящее русло, чьи щелевидные тонкостенные сосуды плохо выявляются в уплотненной фиброзной строме. Наряду с этим выявляются признаки частичной регенерации капиллярной сети (табл. 1). Выраженность этого процесса во многом определяется расположением магистральных стволов в мезодерме. Их ветви пронизывают хориальный эпителий широкими тонкостенными сосудами, которые выходят на поверхность хориона и содержат в просветах эритроциты. Импрегнация пленок показывает, что в этих участках капиллярная сеть представлена округлыми ячейками из неравномерных по диаметру капилляров, в ко-

**Таблица 2.** Параметры газотранспортных систем у куриных эмбрионов на 14-е и 18-е сут инкубации в контроле и после закрытия с 11-х сут половины поверхности скорлупы

Показатель	14-е сут		18-е сут	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Число измерений	23	19	23	21
Масса:				
– тела, г	9.14 ± 0.19	8.16 ± 0.15*	22.1 ± 0.44	19.1 ± 0.39*
– сердца, мг	76 ± 1.94	79.4 ± 2.00	124.1 ± 3.83	130.1 ± 2.94
Масса сердца/масса тела, мг/г	8.34 ± 0.21	9.78 ± 0.31*	5.73 ± 0.14	6.79 ± 0.14*
Число измерений	50	50	50	60
Диаметр кардиомиоцита, мкм	4.4 ± 0.12	4.5 ± 0.11	3.7 ± 0.11	3.37 ± 0.11*
Относительный объем кардиомиоцитов, %	54.8 ± 0.72	84.5 ± 0.32*	80.5 ± 0.59	75.3 ± 0.47*
Стромально-паренхимное отношение	0.84 ± 0.03	0.18 ± 0.01*	0.25 ± 0.01	0.33 ± 0.01*
Число измерений	18	14	13	17
Количество эритроцитов, 10 <sup>12</sup> /л	1.2 ± 0.09	1.5 ± 0.07*	1.7 ± 0.13	2.0 ± 0.08
Концентрация гемоглобина, г/л	65.1 ± 6.31	83.6 ± 4.7*	94.9 ± 7.90	107 ± 5.60
Гематокрит, %	16.2 ± 1.27	20.6 ± 1.04*	24.0 ± 1.69	27.9 ± 1.02*

Примечание. \* Различия с контролем достоверны ( $p < 0.05$ ).

торых крупные эритроциты принимают самые причудливые формы. В удаленных от сосудистых пучков участках ХАО отделяется от подскорлупной пленки щелевидным пространством, сосуды из мезодермы не проникают в хориальный эпителий. На импрегнированных препаратах в этих зонах выявляются лишь анастомозирующие сосуды 20–40 мкм в диаметре, которые образуют редкую крупнопетлистую сеть на поверхности оболочки.

*Изменения структуры миокарда и состава крови после закрытия половины поверхности скорлупы.* Исключение половины поверхности яйца из газообмена на 3 сут (с 11-х по 14-е сут инкубации) вызывает небольшое, но достоверное снижение средней массы тела эмбрионов, но визуально они не отличаются от таковых контрольной серии. Соответственно при одинаковой абсолютной массе сердца относительная его масса у экспериментальных эмбрионов оказывается выше. К концу 7-х сут эксперимента (18-е сут инкубации) эти различия выглядят еще нагляднее (табл. 2).

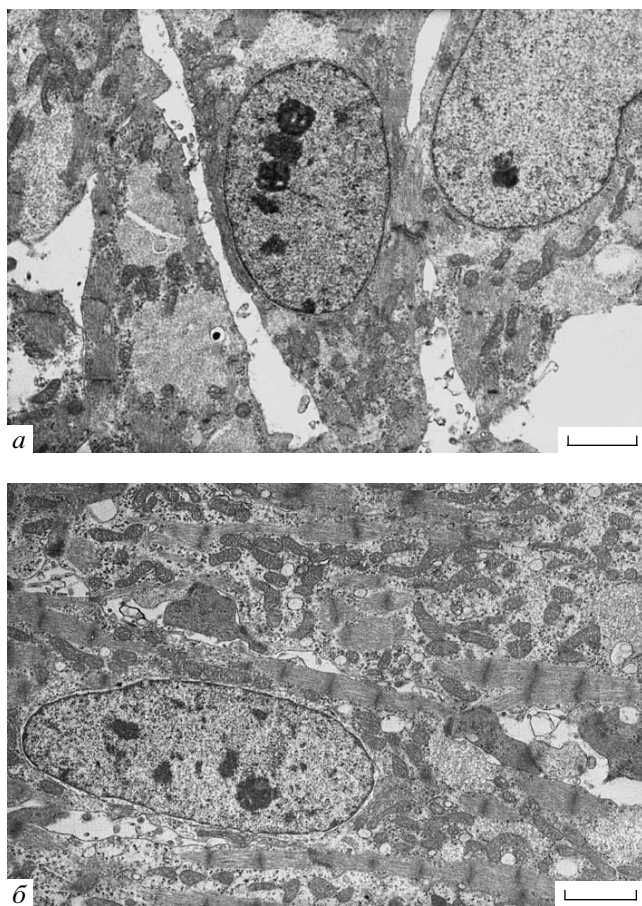
В контроле на 14-е сут инкубации миокард левого желудочка составляют неупорядоченные тонкие мышечные пучки из двух-трех миоцитов. В обводненной интерстиции располагается много мелких малодифференцированных клеток и тонкостенных сосудов. Повсеместно в кардиомиоцитах отмечаются митозы и встречаются двуядерные клетки. На ультраструктурном уровне видно, что клетки слабо связаны между собой короткими вставочными дисками и редкими десмосомами. Интерфазные ядра занимают большую часть

среза клетки, они светлые, практически не содержат гетерохроматина, окружены четкой оболочкой с многочисленными порами. В срезе ядра попадают от двух до четырех крупных рыхлых ядрышек. Значительные участки цитоплазмы заняты скоплениями гликогена, по периферии клеток располагаются немногочисленные неупорядоченные фрагменты миофибрилл. Митохондрии мелкие, вытянутой формы с редкими кристами и уплотненным матриксом, они равномерно распределены по цитоплазме. В околядерном пространстве различаются фрагменты шероховатой саркоплазматической сети, полирибосомы и плоские цистерны комплекса Гольджи (рис. 5, а).

На средних размерах кардиомиоцитов не сказываются 3 сут эксперимента, но их строение более разнообразно, чем в контроле. Под эпикардом преобладает архитектура, сходная с одно-возрастным контролем, а внутриклеточные и тканевые перестройки более отчетливы в глубине стенки сердца. В общем миокард левого желудочка в опыте выглядит значительно более дифференцированным – картины митозов встречаются реже, показатели стромально-паренхимных отношений в нем сопоставимы с таковыми у 18-суточных эмбрионов контрольной серии (табл. 2). Многочисленные коронарные сосуды четко дифференцируются на артерии, вены и капилляры. Их просветы зияют по всей толще миокарда, наиболее мощные сплетения располагаются под эпикардом.

Большинство кардиомиоцитов строго ориентированы в пучках, которые объединяются в плотные мышечные пласты. Узкие пространства





**Рис. 5.** Ультраструктура миокарда левого желудочка куриного эмбриона на 14-е сут инкубации: *а* – контроль, видны рыхло расположенные малодифференцированные кардиомиоциты с фрагментами миофибрилл, мелкими митохондриями и скоплениями гликогена в цитоплазме; *б* – 3-и сут опыта с закрытием половины поверхности скорлупы, видны тесно контактирующие кардиомиоциты с более развитой ультраструктурой. Масштаб: 1.5 мкм.

между ними содержат клетки фибробластического и макрофагального ряда, коллагеновые волокна и миелиноподобные фигуры. Вокруг мышечного пучка обычно в срез попадает не более одного-двух капилляров. Сами мышечные клетки, как правило, вытянутой, иногда веретенообразной формы; они связаны между собой развитыми вставочными дисками и частыми боковыми контактами. В центрально расположенном овальном ядре может содержаться несколько крупных ядрышек. Цитоплазма кардиомиоцитов плотнее заполнена органоидами, чем в контроле, крупные скопления гликогена встречаются редко. Под сарколеммой располагается один слой достаточно толстых миофибрилл типичного строения. Многочисленные митохондрии вместе с органоидами белкового синтеза сосредоточены в пространстве около полюсов ядра (рис. 5, б).

К концу эксперимента у 18-суточных эмбрионов происходит расширение полости левого желудочка, а в его миокарде проявляется целый комплекс патогистологических изменений. В строме наиболее очевидны расширения интерстициального пространства, разволокнение мышечных пучков и чрезвычайно мощная васкуляризация всех слоев миокарда, что отражается на соответствующих морфометрических показателях (табл. 2). Стенки коронарных артерий утолщены, просветы сосудов всех калибров зияют.

Хотя средний диаметр кардиомиоцитов в опыте не достигает контрольных значений (табл. 2), ультраструктурная разница между контрольными и опытными образцами миокарда левого желудочка выражена значительно меньше, чем на первом этапе эксперимента. Между кардиомиоцитами много клеточных контактов и достаточно хорошо обозначены вставочные диски. Пространства между мышечными пучками заполнены соединительной тканью с достаточно толстыми коллагеновыми волокнами, капиллярами и более крупными сосудами. Большая часть кардиомиоцитов содержит активное ядро и много миофибрилл. Они ориентированы вдоль длинной оси клетки, имеют типичное строение дисков и чередуются с рядами достаточно крупных митохондрий с просветленным матриксом. В некоторых клетках цистерны саркоплазматической сети расширены. В опытной серии значительно чаще, чем в контроле, встречаются кардиомиоциты с признаками внутриклеточного лизиса. Их крупные светлые округлые ядра практически лишены гетерохроматина, содержат рыхлые ядрышки. В электронно-светлой цитоплазме все органоиды располагаются очень рыхло, гликогена почти нет. Миофибрилл мало, они фрагментированы и группируются по периферии клеток.

Закрытие половины газообменной поверхности яйца на 11-е сут инкубации вызывает к концу 3-х сут эксперимента значительное повышение кислородной емкости крови. Это выражается в достоверном увеличении, по сравнению с контролем, всех исследованных показателей красной крови (табл. 2). Параллельно в сосудах опытной серии, в отличие от контроля, наряду с обычными эритроцитами встречаются единичные (или группами по 3–5) незрелые клетки эритропоэтического, грануло- и агранулоцитарного рядов. Через 7 сут эксперимента разница показателей крови между экспериментальной и контрольной сериями становится менее очевидной (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мы выбрали для опыта в качестве газоизолирующего материала алюминиевую пудру на яичном желтке, так как эта смесь абсолютно безвредна для эмбриона, хорошо держится на поверхности и не пропускает воздух. Закраску скорлупы вдоль длинной оси яйца проводили с учетом того,

что проницаемость скорлупы и плотность сосудов в ХАО в области воздушной камеры максимальная и минимальная – на остром конце яйца (Рольник, 1968; Reizis et al., 2005). Кроме того, выдерживали симметрию открытой и закрытой части относительно положения зародыша в яйце. Учитывали, что латеральная диффузия кислорода в пористой подскорлупной пленке может снижать эффективную зону закраски, особенно на остром конце яйца.

На основании полученных данных об онтогенетическом развитии сосудистого русла ХАО мы выбрали 11-е сут инкубации как исходную точку экспериментов с ограничением газообменной поверхности яиц. Мы учли, что к середине эмбриогенеза завершается формирование внезародышевых оболочек эмбриона и сосудистая система хореоаллантоиса достигает своего максимального структурного расцвета (Коростышевская и др., 2006; Максимов и др., 2006; Dusseau, Hutchins, 1986, 1989; Strick et al., 1991). Кроме того, утвердилось мнение, что средняя треть эмбриогенеза – критический период влияния длительной гипоксии на метаболизм (Dzialowski et al., 2002) и что для ХАО “окно чувствительности” к гипоксии приходится на 12–18-е сут инкубации (Chan, Burggen, 2005). Было показано, что хроническая гипобарическая гипоксия в первые 10 сут инкубации (14% O<sub>2</sub>) не оказывает влияния на массу эмбриона и его органов при вылуплении (Miller et al., 2002) и что закрытие даже 25% поверхности яйца в эти сроки не влияет на формирование сосудистого русла ХАО (Reizis et al., 2005). Продолжительность нашего эксперимента (3 и 7 сут) определялась динамикой роста эмбриона. К середине инкубации (11-е сут) эмбрион набирает менее 10% конечной массы и менее 16% максимального размера (Ar et al., 1987). За вторую половину эмбриогенеза масса эмбриона увеличивается приблизительно в 10 раз, но наиболее быстрый ее прирост приходится на последнюю неделю.

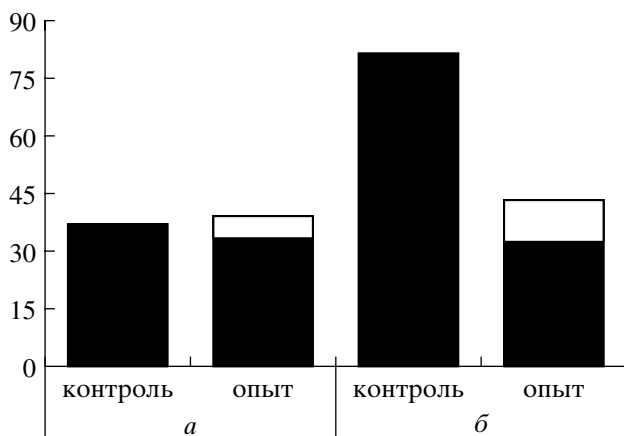
Предварительные исследования выживаемости и весовых характеристик эмбрионов показали, что после полной закраски поверхности яйца на 11-е сут инкубации все эмбрионы погибают в течение нескольких часов. После закрытия 75% поверхности яиц в течение 3 сут (11–14-е сут инкубации) эмбрионы имеют высокую смертность, очень отстают в развитии, у них развиваются отеки и другие патологические изменения, не совместимые с жизнью. После закрытия половины поверхности смертность эмбрионов приходится на 19–21-е сут инкубации, в период перехода от аллантоисного к легочному типу дыхания, при этом ни один выживший цыпленок не смог вылупиться самостоятельно. В опыте с закрытием четверти скорлупы цыплята появляются в срок, и птенцы не имеют видимой патологии. В этом варианте опыта воздействие компенсируется видовыми генетически закрепленными механизмами. Известно, что курица при насиживании яиц закрывает телом око-

ло 20% их поверхности. Из вышесказанного вытекает, что для решения поставленных задач наиболее адекватным оказался вариант опыта с закраской половины поверхности скорлупы, поскольку за период наблюдения фиксируются достоверные, но не летальные эффекты.

Уже на 3-и сут эксперимента с уменьшением вдвое дыхательной поверхности скорлупы мы зафиксировали вполне логичные компенсаторные изменения в составе крови – повышение гематокрита и концентрации гемоглобина, мобилизация красного ростка гемопоэза (табл. 2), которые свидетельствуют о значительном увеличении кислородной емкости крови. К концу недельного эксперимента (на 18-е сут) концентрация эритроцитов в крови достигает показателя у вылупившихся в стандартных условиях птенцов (Рольник, 1968). Все исследователи описывают эти согласованные реакции при хронической гипоксии и склонны считать их отражением истинной гипоксемии (Handrich, Girard, 1985; Dusseau, Hutchins, 1989; Dzialowski et al., 2002; Chan, Burggen, 2005). Из приведенных данных можно однозначно утверждать, что после закрытия половины скорлупы эмбрионы испытывали гипоксию, и можно даже попытаться приблизительно оценить ее уровень. По данным Руйтенбека (Ruijtenbeek et al., 2002, 2003) и Виллмора (Villamor et al., 2004), на 19-е сут при инкубации в среде с 15%-ным O<sub>2</sub> дефицит массы тела эмбрионов составляет 16–17%, повышение гематокрита – 13% и увеличение относительной массы сердца – 22% по сравнению с контролем. Согласно данным табл. 2, одноименные показатели в нашем эксперименте составили 14, 14 и 18.5% соответственно.

Влияние гипоксии на формирование и дифференцировку клеток крови считается доказанным. Начиная с 10-х сут эмбрион использует эритроциты на разных стадиях созревания, поэтому большинство циркулирующих эритроцитов представлены поли- и ортохроматофильными эритроблестами. В норме последнюю неделю инкубации (с 13–14-х сут) эмбрион развивается в условиях прогрессирующей гипоксии и гиперкапнии из-за роста массы тела и недостаточной проницаемости скорлупы (Dragon, Baumann, 2003). Гипоксия напрямую усиливает выделение норадреналина из надпочечников (с максимумом на 15-е сут инкубации) (Mulder et al., 2002). Катехоламины через β-адренорецепторы стимулируют созревание эритроцитов: усиливаются синтез карбонангидразы, 2,3-дифосфоглицерата и другие биохимические процессы, которые повышают аффинность гемоглобина к кислороду (Koller et al., 1994). Учитывая, что свойства эритроцитов постоянно адаптируются к уровню гипоксии, можно предположить, что мы спровоцировали более раннее (приблизительно на 3-и сут) и/или быстрое развертывание онтогенетической программы. Бауманн с соавт. (Baumann et al., 1986, 1987) тоже показали, что умеренная хроническая гипоксия в первой половине эмбриогенеза вызывает изменения в крови, по-





**Рис. 6.** Суммарный объем сосудов мезодермального слоя хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона на 14-е (а) и 18-е (б) сут инкубации в контроле и после закрытия половины поверхности скорлупы газо-непроницаемым слоем с 11-х сут инкубации, мм<sup>3</sup>. Зоны: (■) – открытая, (□) – закрытая.

вышающие аффинность эритроцитов к кислороду, как и у более зрелых эмбрионов в норме.

Объем периферического сосудистого бассейна как важнейшая составляющая условий газообмена и гемодинамики определяет периферическое сопротивление, артериальное давление, скорость кровотока и т.д. Некоторые исследователи даже предложили ввести понятие “структурное сосудистое сопротивление” (мм рт. ст. / (мл × мин × 100 г) как гидравлическое сопротивление максимально (посмертно) расширенного русла, зависящее только от числа и анатомических размеров сосудов (Adair et al., 1987). Чтобы с помощью полученных нами морфометрических данных можно было оценить изменение объема сосудистого русла ХАО на этапах эксперимента, мы воспользовались формулой Паганелли (Paganelli et al., 1974), которая позволяет по массе яйца ( $W$ ) вычислить площадь поверхности скорлупы ( $A$ ):  $A = 4.835 \times W^{0.662}$ . Для расчетов примем, что площадь поверхности яйца соответствует таковой ХАО и что уменьшение массы яйца в ходе онтогенеза сопровождается увеличением объема воздушной камеры и соответствующим уменьшением площади поверхности ХАО. Измерив толщину мезодермального слоя ХАО (табл. 1), мы можем вычислить его объем, нам известны также данные (табл. 1) об относительном объеме сосудистого русла в мезодерме ХАО в контроле и в разных зонах экспериментальных яиц. Эти показатели дают нам возможность оценить объем (в мм<sup>3</sup>) сосудистого русла ХАО в яйце в целом.

Из расчетов видно, что на 14-е сут (после 3 сут инкубации яиц с закрытой половиной скорлупы) значительная редукция сосудов ХАО под закрытой зоной полностью компенсируется разрастанием, увеличением калибра сосудов и их просветов в интактной половине (рис. 6). По полученным дан-

ными, наиболее реактивными являются артериолы (менее 45 мкм в диаметре), которые регулируют кровотоки в капиллярной сети (рис. 4, а). Перераспределению кровотока в пользу открытой половины ХАО способствуют особенности регуляции тонуса сосудов в оболочке: они все открыты, всегда максимально расширены и не имеют автономной иннервации (Ag et al., 1987; Dusseau et al., 1989).

Многолетние разнообразные исследования дали основание для формулировки классического заключения, что у развивающегося эмбриона гипоксия усиливает рост всех сосудов (внутри- и внеэмбриональных разного калибра), что существенно компенсирует жизнь в гипоксических условиях (Adair et al., 1987). Однако, по полученным нами данным, этот механизм не реализуется в капиллярном отделе ХАО во второй половине эмбриогенеза. Напомним, что к началу эксперимента (рис. 3) дыхательная сеть в контроле покрывает почти 90% поверхности оболочки, площадь которой ограничена скорлупой. Возможности ангиогенеза капилляров ничтожны – им просто некуда расти. В этих условиях повышение кровотока через капиллярный отдел русла обеспечивается только за счет расширения капиллярных сегментов сети в полтора раза (табл. 1).

Более противоречивы и сложнее в интерпретации сведения о работе сердца эмбриона и изменении сердечной мышцы при гипоксии. Большинство исследователей обнаружили, что при хронической гипоксии прирост массы сердца по ходу инкубации тормозится меньше, чем прирост массы тела, поэтому относительная масса сердца возрастает (Handrich, Girard, 1985; Rouwet et al., 2002; Villamor et al., 2004), однако приводится и противоположная динамика (Richards et al., 1991–1992; Ruijtenbeek et al., 2003; Chan, Burggen, 2005).

По расчетам Тазавы (Tazawa et al., 2001), во второй половине эмбриогенеза у кур частота сердечных сокращений не изменяется или даже уменьшается, а доставляемое к тканям количество кислорода, рассчитанное на сердечный удар ( $O_2$ -пульс), растет линейно. Авторы заключают, что возрастающие метаболические потребности эмбриона удовлетворяются по большей мере за счет ударного объема, который растет параллельно массе эмбриона. Достаточно условно можно представить, что сила сокращений определяется количеством мышечных клеток и объемом сократительных структур в них. По данным Румянцева (1982), пролиферативный пул миоцитов сердца эмбрионов кур составляет на 5-е сут инкубации около 100%, постепенно снижается до 45% к 16-м сут, а на 21-е составляет 15%. Относительный объем миофибрилл в них возрастает в период с 12-х по 18-е сут инкубации с 7.4 до 16.4% (Vozner, 1976). Обнаруженная нами гиперплазия миоцитов в левом желудочке сердца эмбрионов экспериментальной серии в период с 11-х по 14-е сут настолько изменяет стромально-паренхимные

отношения, что приближает их к контрольным показателям у 18-суточных эмбрионов. Это свидетельствует о первоочередном подключении пролиферативных резервов для усиления работы сердца. Описанные ультраструктурные признаки ускоренной дифференцировки и накопления миофибрилл в кардиомиоцитах обеспечивают усиление насосной функции сердца. Другие авторы тоже высказывают предположение о том, что умеренная гипоксия в эмбриогенезе может ускорять рост левого желудочка, увеличивая скорость гиперплазии клеток или продлевая ее период, но механизм этого явления остается непонятным (Villamor et al., 2004). Эта стратегия принципиально отличается от реагирования взрослого организма, когда в сердце в ответ на гипоксию или любой другой стресс наблюдается увеличение размеров клеток без увеличения их числа, что сопровождается гипертрофией сократительных структур в них (Непомнящих, 1991; Хитров, Пауков, 1991).

Судя по массе тела эмбрионов (табл. 2), можно заключить, что согласованные и однонаправленные компенсаторные перестройки во всех изученных звеньях газотранспортных структур в первые 3 сут достаточно успешно компенсируют уменьшение вдвое дыхательной поверхности яиц. Этому способствует небольшой среднесуточный прирост массы тела в период с 11-х по 14-е сут (2.3 г – в норме и 2.0 – в опыте). Нужно отметить, что выявленные нами антигипоксические перестройки (компенсаторное усиление васкуляризации открытой половины ХАО, повышение кислородной емкости крови, увеличение плотности мышечных клеток и ускоренное формирование в них миофибрилл, развитие коронарного русла в миокарде) являются следствием более раннего и, возможно, более быстрого развертывания механизмов нормального эмбрионального развития заинтересованных структур и органов. Во взрослом организме некоторые из этих механизмов уже недоступны. Согласно этой логике, узкое звено компенсаторных перестроек обнаруживается именно в дыхательной капиллярной сети хориоаллантаиса, потому что этот орган к началу эксперимента уже был полностью сформирован и потерял потенции к развитию.

Все компенсаторные перестройки имеют свою “цену”. Ускоренное развитие отдельных органов может неблагоприятно влиять на развитие других органов и систем эмбриона, в первую очередь мозга (Chan, Burggen, 2005). Ранняя экспрессия генов в заинтересованных структурах уменьшает или исчерпывает возможности их развития. Так, о гемодинамической перегрузке русла в открытой зоне ХАО свидетельствует увеличение относительных объемов интерстиция и сосудов выносящего звена – перерастянутых тонкостенных венозных и лимфатических сосудов (табл. 1). Появление атипичных клеток и сгущение крови, увеличение относительной массы сердца и нару-

шение соотношения паренхимы и стромы в миокарде могут служить предпосылками того, что в последующие 4 сут газотранспортные структуры уже не могут предотвратить развитие кислородной недостаточности и гипометаболизма у эмбриона. В контроле среднесуточный прирост массы тела с 14-х по 18-е сут инкубации составляет около 3.3 г, а в эксперименте снижается до 2.7 г (табл. 2).

Через неделю эксперимента (на 18-е сут инкубации) признаки декомпенсации наиболее очевидно проявляются в хориоаллантаисе эмбрионов. Расчеты показывают почти двукратную недостаточность объема сосудистого русла ХАО по сравнению с контролем (рис. 6). В открытой зоне вообще не отмечено динамики этих параметров с предыдущего срока исследования (табл. 1). По сравнению с одновозрастным контролем в мезодерме преобладают сосуды крупного калибра; артериол диаметром до 60 мкм заметно меньше. В отличие от первого этапа эксперимента (11–14-е сут) просветы всех сосудов сужены по сравнению с контролем за счет значительного утолщения стенки и особенно в прекапиллярном звене (рис. 4, б). В закрытой зоне наблюдается частичное восстановление объема сосудистого русла по сравнению с состоянием на 14-е сут инкубации, но численные показатели не достигают и половины контрольных значений для этого срока. Частичная регенерация сосудистого русла, в том числе и капиллярной сети под закрытой половиной скорлупы (табл. 1; рис. 6), обеспечивается поступлением в ХАО по аллантаической артерии смешанной крови из большого круга кровообращения эмбриона. Целесообразность этих затрат можно объяснить тем, что сохраняется необходимость доставки к эмбриону из скорлупы кальция и других минеральных солей. В норме этот процесс достигает максимума к 17-м сут инкубации (Akins, Tuan, 1993).

Обнаруженные признаки расширения полости и отека стенки левого желудочка, дистрофия кардиомиоцитов при усиленном кровоснабжении миокарда и утолщение стенок внеэмбриональных и коронарных артерий дают возможность предположить развитие у эмбрионов после 7 сут эксперимента сердечной слабости на фоне артериальной гипертензии. К патогенетическим факторам гипертензии можно отнести изменения реологических свойств крови, повышение периферического сопротивления из-за существенного уменьшения объема внеэмбрионального сосудистого русла, увеличение объема крови.

Полученные данные находят подтверждение в немногочисленных работах по влиянию длительной гипобарической гипоксии на сердечно-сосудистую систему куриного эмбриона. В работе Рове (Rouwet et al., 2002) также высказывается предположение о том, что нарушение сократительной функции сердечной мышцы (увеличение сопротивления, снижение эластичности и растяжимости) и сужение просвета аорты в этих условиях со-

здают предпосылки для развития гипертензии. Манчини с соавторами (Mançini et al., 1991) описали у эмбрионов, инкубированных в условиях гипоксии с 3-х по 18-е сут, утолщение эпикарда и его обильную васкуляризацию, истончение миокарда за счет гипотрофии кардиомиоцитов и уменьшения содержания в них миофибрилл. Увеличение плотности и расширение сосудов в сердце по сравнению с контролем авторы трактуют как адаптационные перестройки в ответ на гипоксию.

В заключение отметим, что закрытие половины поверхности скорлупы в середине эмбриогенеза вызывает перестройку всех звеньев газотранспортной системы, направленную на компенсацию недопоставок кислорода и гипоксемии, что является одной из стратегий выживания в неблагоприятных условиях. В первые 3 сут повышение гематокрита и гемоглобина, а также мобилизация красного гемопоэза увеличивают кислородную емкость крови, а гиперплазия мышечных клеток и накопление в них сократительных белков усиливают работу сердца. Редукция сосудов ХАО под закрытой зоной полностью компенсируется расширением и разрастанием сосудов в интактной половине. Полученные данные свидетельствуют, что гипоксия ускоряет развертывание программы эмбрионального развития и приводит к более ранней и быстрой дифференцировке тканей заинтересованных систем. Этим компенсаторные реакции эмбриона принципиально отличаются от таковых во взрослом организме. По-видимому, лимитирующим звеном компенсаторных перестроек является капиллярная дыхательная сеть хориоаллантаиса. Возможности ангиогенеза в ней ничтожны, поскольку ей некуда расти: плотность ее на 11-е сут инкубации в контроле уже приближается к максимальной, а площадь ограничена газообменной поверхностью скорлупы. В последующие 4 сут эксперимента структурная компенсация газотранспортных систем оказывается исчерпанной и неспособной обеспечивать возрастающие метаболические запросы, поэтому развивается заметная гипотрофия эмбрионов. К концу 7-х сут эксперимента недостаточная пропускная способность сосудистого русла ХАО выражается в снижении суммарного объема сосудов вдвое по сравнению с контролем. В этой ситуации ни повышенная кислородная емкость крови, ни развитие артериальной гипертензии не могут компенсировать недостаток газообмена, а по порочному кругу провоцируют развитие дистрофии миокарда левого желудочка.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Коростышевская И.М., Максимов В.Ф., Баранов В.И. Многофункциональная морфология хориоаллантаисной оболочки куриного эмбриона // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92. № 7. С. 889–901.
- Максимов В.Ф., Коростышевская И.М., Курганов С.А. Функциональная морфология сосудистой сети хориоаллантаиса у кур // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 9. С. 341–345.
- Непомнящих Л.М. Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце. Новосибирск: Наука, 1991. 352 с.
- Рольник В.В. Биология эмбрионального развития птиц. Л.: Наука, 1968. 424 с.
- Румянцев П.П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука, 1982. 288 с.
- Хитров Н.К., Пауков В.С. Адаптация сердца к гипоксии. М.: Медицина, 1991. 240 с.
- Adair T.H., Guyton A.C., Montani J.-P. et al. Whole body structural vascular adaptation to prolonged hypoxia in chick embryos // Am. J. Physiol. 1987. V. 252. P. H1228–H1234.
- Akins R.E., Tuan R.S. Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane. I. Isolation and characterization of chorionic ectoderm cells // J. Cell. Sci. 1993. V. 105 (Pt. 2). P. 369–379.
- Ar A., Girard H., Dejours P. Oxygen consumption of the chick embryo's respiratory organ, the chorioallantoic membrane // Resp. Physiol. 1987. V. 68. № 3. P. 377–388.
- Baumann R., Haller E.A., Schoning U. et al. Hypoxic incubation leads to concerted changes of carbonic anhydrase activity and 2,3 DPG concentration of chick embryo red cells // Devel. Biol. 1986. V. 116. № 2. P. 548–551.
- Baumann R., Fischer J., Engelke M. Functional properties of primitive and definitive red cells from chick embryo: oxygen-binding characteristics, pH and membrane potential, and response to hypoxia // J. Exp. Zool. Suppl. 1987. V. 1. P. 227–238.
- Bjornes P.O., Aulie A., Hoiby M. Effects of hypoxia on the metabolism of embryos and chicks of domestic fowl // Ibid. 1987. V. 1. P. 209–212.
- Bozner A. Developmental dynamics of ultrastructure of myocardial cells in embrional and early postnatal stage in chicken. Influence of isoprenaline on this process. Stereological studies // J. Cell Biol. 1976. V. 70. № 2. P. 364a.
- Chan T., 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.
- Dragon S., Baumann R. Hypoxia, hormones, and red blood cell function in chick embryos // News Physiol. Sci. 2003. V. 1. № 18. P. 77–82.
- Dusseau J.W., Hutchins P.M. Microvascular responses to chronic hypoxia by the chick chorioallantoic membrane: a morphometric analysis // Microvasc. Res. 1989. V. 37. № 2. P. 138–147.
- Dusseau J.W., Hutchins P.M., Malbasa D.S. Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane // Circ. Res. 1986. V. 59. P. 163–170.
- 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.
- Gou X., Li N., Yan D. et al. Hypoxia adaptation and hemoglobin mutation in Tibetan chick embryo // Sci. China C Life Sci. 2005. V. 48. № 6. P. 616–623.
- Handrich Y., Girard H. Gas diffusive conductance of sea-level hen eggs incubated at 2900 m altitude // Resp. Physiol. 1985. V. 60. № 2. P. 237–252.
- Keller B.B., MacLennan M.J., Tinney J.P. et al. In vivo assessment of embryonic cardiovascular dimensions and func-

- tion in day-10.5 to – 14.5 mouse embryos // *Cir. Res.* 1996. V. 79. P. 247–255.
- Koller M., Dragon S., Baumann R. Control of red cell function of late chick embryos: role of extracellular ATP/AMP and egg size // *Am. J. Physiol.* 1994. V. 267. P. R542–R548.
- 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. 359–371.
- Melkonian G., Eckelhoefer H., Wu M. et al. Growth and angiogenesis are inhibited *in vivo* in developing tissues by pyrazine and its derivatives // *Toxicol. Sci.* 2003. V. 74. P. 393–401.
- Miller S.L., Green L.R., Peebles D.M. et al. Effects of chronic hypoxia and protein malnutrition on growth in the developing chick // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002. V. 186. № 2. P. 261–267.
- Mulder A.L.M., Mieldema A., de Mey J.C.R. et al. Sympatetic control of the cardiovascular response to acute hypoxemia in the chick embryo // *Am. J. Physiol.* 2002. V. 282. P. R1153–1163.
- Paganelli C.V., Olszowka A., Ar A. The avian egg: surface area, volume and density // *Condor.* 1974. V. 76. P. 319–325.
- Ribatti D., Nico B., Vacca A. et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo* // *Anatom. Record.* 2001. V. 264. P. 317–324.
- Richards M.P., Stock M.K., Metcalfe J. Effects of brief hypoxia and hyperoxia on tissue trace element levels in the developing chick embryo // *Magnes. Trace Elem.* 1991–1992. V. 10. № 5–6. P. 302–320.
- Reizis A., Hammel I., Ar A. Regional and developmental variations of blood vessel morphometry in chick embryo chorioallantoic membrane // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. P. 1483–2488.
- 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.
- Ruijtenbeek K., DeMey J.G.R., Blanko C.E. The chicken embryo in developmental physiology of the cardiovascular system: a traditional model with new possibilities // *Am. J. Physiol.* 2002. V. 282. P. R331–R333.
- 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.
- Strick D.M., Waycaster R.L., Montani J.P. et al. Morphometric measurements of chorioallantoic membrane vascularity: effects of hypoxia and hyperoxia // *Am. J. Physiol.* 1991. V. 260. P. H1385–H1389.
- Tazawa H., Pearson J.T., Komoro T. et al. Allometric relationships between embryonic heart rate and fresh egg mass in birds // *J. Exp. Biol.* 2001. V. 204. P. 165–174.
- 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.
- Wagner-Amos K., Seymour R.S. Effect of regional changes to shell conductance on oxygen consumption and growth of chicken embryos // *Resp. Physiol.* 2002. V. 129. № 3. P. 385–395.
- Wagner-Amos K., Seymour R.S. Effect of local shell conductance on the vascularisation of chicken chorioallantoic membrane // *Resp. Physiol. Neurobiol.* 2003. V. 134. № 2. P. 155–167.
- Wang C., Yuan C., Zhang L. et al. Differential gene expression of phosphoglyceric kinase (PGK) and hypoxic adaptation in chicken // *Sci. China C Life Sci.* 2007. V. 50. № 3.

## How Chicken Embryo Survives after Half of Shell Is Sealed?

I. M. Korostyshevskaya and V. F. Maksimov

*State-Research Institute of Physiology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, ul. Akademika Timakova 4, Novosibirsk, 630117 Russia*  
e-mail: kor@physiol.ru

**Abstract**—The goal of this study was to explore the development of the gas transport systems in chick embryos after half of the shell surface is closed on incubation day 11. By the end of day 3 of the experiment (incubation day 14), the vascular reduction in the chorioallantois under the covered zone is fully compensated by the vessel dilatation and growth in the intact half. In parallel, the oxygen capacity of blood elevates and hematopoiesis increases: the indices of hematocrit, hemoglobin, and erythrocyte count increase by half. The development of the left ventricular myocardium accelerates through the myocyte hyperplasia and their more mature ultrastructure. The obtained data indicate that hypoxia accelerates the embryonic development and leads to earlier and faster differentiation of the gas transport systems. However, the efficiency of antihypoxic responses is limited by the upper bound of capillary density in the chorionic respiratory network. After 1 week of the experiment (incubation day 18), the total vascular volume in the chorioallantois is halved relative to control, while the arterial walls substantially thicken in the open part, which increases the peripheral resistance. Atherosclerosis and dystrophy of cardiomyocytes developed in the left ventricle. These general hemodynamic abnormalities are accompanied by a notable embryonic growth inhibition. Thus, the structural compensation of the gas transport systems in the experiment becomes exhausted and cannot provide for increasing metabolic demands of the growing embryo.

*Key words:* chorioallantois, heart, blood, hypoxia, chick embryo.