

**А.А.Горбунов**

Днепропетровская государственная медицинская академия

**Ключевые слова:** миокард, соединительнотканый компонент, реконструкция, серийные срезы, трехмерная модель.

Надійшла: 27.02.2008

Прийнята: 17.03.2008

УДК 611.12:611.018.2:57.086.88

## **ПРОСТРАНСТВЕННАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОГО КОМПОНЕНТА МИОКАРДА КРЫС**

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

**Резюме.** Целью работы явилось построение трехмерной модели фрагмента миокарда, визуализация пространственной организации его мышечного и соединительнотканного компонентов. Материалом исследования послужили сердца зрелых белых крыс. Использовались стандартные гистологические методики, окрашивание срезов для контрастного выявления соединительнотканного компонента выполняли по методу Ван Гизон, фосфорновольфрамовым гематоксилином и железным гематоксилином Гейденгайна. На основании микрофотографий серии последовательных гистологических срезов выполнена пространственная реконструкция фрагмента миокарда. Использовалось специальное программное обеспечение – Amira for microscopy. Полученная трехмерная модель позволяет наглядно оценить соотношение мышечного и соединительнотканного компонентов, а также визуализировать объемные характеристики миокарда, полученные при стереологическом методе. Полученная модель миокарда может быть использована в других исследованиях для демонстрации результатов.

**Морфологія.- 2008.- Т.ІІ, №2.- С.10-14.**

© А.А.Горбунов, 2008

### **Gorbunov A.A. Spatial reconstruction of myocardial connective tissue component in rat.**

**Summary.** The aim of the study was building up a three-dimensional model of myocardium fragment, visualization of spatial organization its muscular and connective tissue components. The hearts of adult white rats served as a material for the study. Standard histological methods have been used. Specimen staining has been done by van Gison method, phospho-wolframic hematoxylin, and iron hematoxylin by Heidenhein. Based on serial consequential cuts microphotos a spatial reconstruction of myocardium fragment has been built up. Special software have been used – Amira for microscopy. The 3D model obtained allowed to evaluate visually the correlation of muscular and connective tissue components, as well as to render volumetric myocardial characteristics that have been obtained by stereological approach. The model of myocardium could be used in other researches for the demonstration of data obtained.

**Key words:** myocardium, connective tissue component, reconstruction, serial cuts, three-dimensional model.

### **Введение**

Воссоздание трехмерной архитектуры биологических объектов является неотъемлемой задачей морфологических исследований, основывающихся на анализе плоскостных гистологических препаратов (Твердохліб І.В., 2007). Современные морфологические исследования требуют высокого качества иллюстративности результатов, чему может способствовать трехмерная реконструкция и моделирование. Сами методы реконструкции биологических объектов имеют 140 летнюю историю и отражают эволюцию доступных морфологу технических средств – от карандаша и прозрачной бумаги (Туркевич Н.Г., 1967) до электронных вычислительных машин с соответствующим программным обеспечением (Fiala J.C., 2005; Li J. et al., 2005). Возможности

вычислительной техники и программных средств позволяют сегодня выполнять не только визуализацию (создание трехмерной модели) всего исследуемого биологического объекта, но и проводить морфометрию его отдельных компонентов. Данные возможности особенно важны при изучении анизотропных объектов, к которым малоприменимы стереологические методы (Автандилов Г.Г. и др., 1981; Твердохліб І.В. и др., 2006).

Современные методологические аспекты изучения сердца также требуют широкого применения методов графической реконструкции. Накопленные экспериментальные и теоретические данные нуждаются в визуализации, использовании трехмерных моделей сердца или его фрагментов (Козлов В.О. та ін., 2004; Сілкіна

Ю.В., Горелова Н.И., 2004; Burton R. et al., 2006).

Морфологические особенности миокарда (многоклеточный состав, чередование слоев с различным направлением волокон кардиомиоцитов) позволяют отнести его к анизотропным объектам. Пространственная организация миокарда ранее была исследована с использованием стереологического принципа реконструкции (Автандилов Г.Г. и др., 1981), однако полученные при этом объемные характеристики являются больше абстрактными, математическими моделями. Объемная реконструкция (создание трехмерной модели) необходима для целостного понимания структуры миокарда как единой функциональной системы различных клеточных популяций и компонентов внеклеточного матрикса.

**Целью** нашего исследования явилось построение трехмерной модели фрагмента миокарда, визуализация пространственной организации его мышечного и соединительнотканного компонентов с возможностью их морфометрической оценки.

#### **Материалы и методы**

Фрагменты свободной стенки левого желудочка сердца зрелой крысы фиксировали в смеси этиловый спирт – уксусная кислота – формалин (рН 3,6) по Лилли-Телесницкому (1969), обезвоживали в спиртах, заливали в парапласт. Гистологические срезы изготавливались в плоскости, перпендикулярной длинной оси сердца, толщина срезов составляла 5 мкм. Была выполнена серия последовательных 38 срезов. Окрашивание проводили по методике Ван Гизон (нечетные номера срезов) и железным гематоксилином Гейденгайна (четные номера срезов). Отдельные срезы, не вошедшие в серию, окрашивались фосфорновольфрамовым гематоксилином (Лилли Р., 1969).

Для графической реконструкции был выбран участок в субэпикардальном слое миокарда с преимущественно перпендикулярным к площади среза направлением кардиомиоцитов и сосудов микроциркуляторного русла. Последние служили естественными ориентирами при выполнении фотосъемки и дальнейшего выравнивания изображений.

Методика самой реконструкции, в целом, была описана ранее (Твердохлеб И.В. и др., 2006). Контрастирование, предварительное выравнивание, обрезка изображений выполнялись с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS2. Для дальнейших этапов реконструкции использовался программный комплекс Amiga for microscope версии 4.1.2, позволяющий выполнить окончательное выравнивание, выделение контуров реконструируемых структур (сегментацию изображений), интерполяцию и сглаживание контуров, а также построение трехмерного каркаса (первичной модели). Цветовая раскраска, текстурная обработка и визуализация поверхности трехмерного каркаса

(окончательная модель) проводились в программной среде Autodesk 3ds Max версии 8.0.

#### **Результаты и их обсуждение**

Прослойки эндомизия, покрывающие каждое мышечное волокно, наилучшим образом выявлялись при окрашивании препаратов фосфорновольфрамовым гематоксилином (рис. 1). Между соседними кардиомиоцитами обнаруживалась тонкая прерывистая контрастная граница, толщиной до 2-4 мкм, не содержащая видимых соединительнотканых волокон или клеток. В области прохождения капилляра эндомизиальная прослойка расширялась (до 5-8 мкм), здесь выявлялись мелкие соединительнотканые волокна, а также фибробласты и единичные тучные клетки. При окрашивании железным гематоксилином Гейденгайна эндомизий контрастировался хуже, сливался с поверхностью кардиомиоцитов. Методика окрашивания Ван Гизон давала приемлемые результаты, однако ввиду отсутствия крупных коллагеновых волокон ткань эндомизия выявлялась менее контрастно.

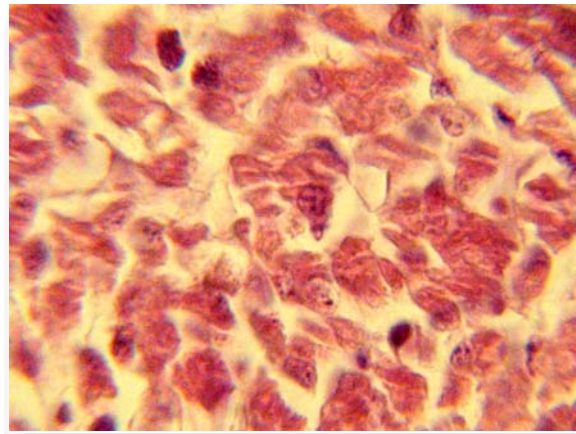


Рис. 1. Участок миокарда левого желудочка зрелой крысы. Окрашивание фосфорновольфрамовым гематоксилином.  $\times 900$ .

Соединительнотканые прослойки, разделяющие пучки кардиомиоцитов (перимизий), наиболее четко определялись на препаратах, окрашенных по методу Ван Гизон (рис. 2). Толщина перимизия варьировала от 5 до 15 мкм. Здесь отмечались сравнительно крупные коллагеновые волокна (до 2-3 мкм в диаметре), многочисленные фибробластоподобные клетки. Последние характеризовались неправильной удлинённой формой, более плотным овальным ядром. При окрашивании фосфорновольфрамовым гематоксилином здесь также выявлялись единичные тучные клетки, расположенные периваскулярно.

Окрашивание железным гематоксилином Гейденгайна не имело особых преимуществ над предыдущими методиками, однако давало контрастное окрашивание клеточных границ и сосу-

дистого русла, что было использовано для реконструкции (рис. 3).

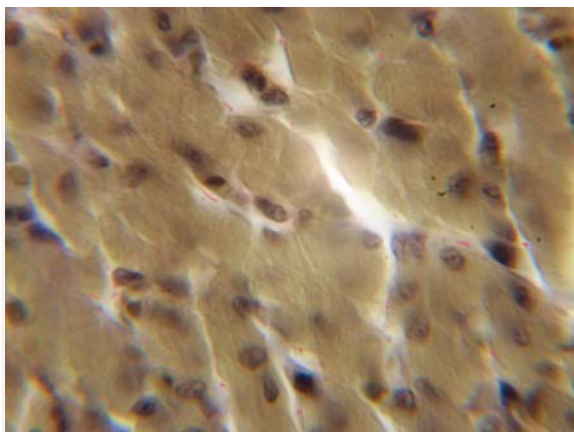


Рис. 2. Участок миокарда левого желудочка зрелой крысы. Окрашивание по Ван Гизон.  $\times 900$ .

Изучение серии последовательных срезов, окрашенных по разным методикам, позволило создать более полное представление о пространственной организации соединительнотканного

компонента миокарда (рис. 4). При сегментировании изображений срезов в ходе реконструкции были проведены измерения площади сечения кардиомиоцитов, внесосудистой соединительной ткани, а также элементов сосудистого русла миокарда (рис. 5).

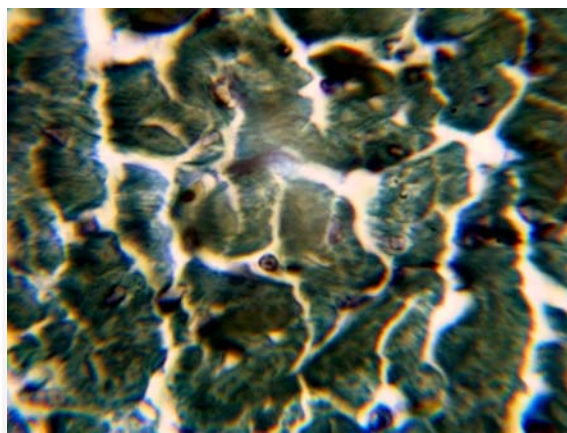


Рис. 3. Участок миокарда левого желудочка зрелой крысы. Окрашивание железным гематоксилином Гейденгайна.  $\times 900$ .

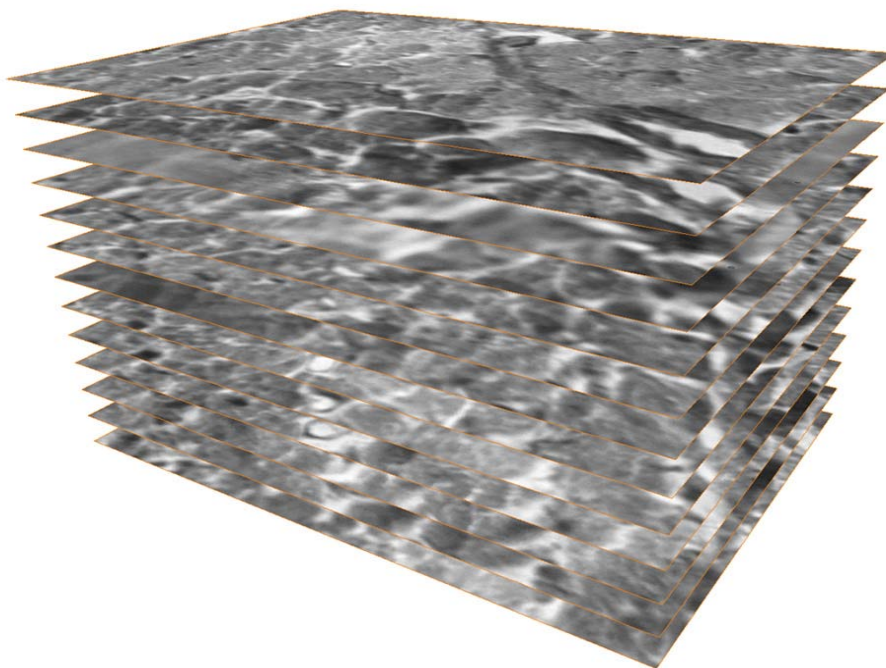


Рис. 4. Этап реконструкции – контрастирование, выравнивание и обрезка.

Удельная площадь мышечного компонента составила 54,7%, внесосудистой стромы – 29,9%, сосудистого русла – 15,4%. Изменения данных показателей в серии срезов были не значительны, коэффициенты вариации составили: для кардиомиоцитов – 2,4%, для внесосудистой соединительной ткани – 1,6%, для сосудов – 1,3%.

Была выполнена пространственная реконст-

рукция участка миокарда, позволяющая визуально оценить архитектуру миокарда и соотношение мышечного и соединительнотканного компонентов.

В результате графической реконструкции получена пространственная модель участка миокарда, отражающая его гистоархитектуру (рис. 6). Размеры модели –  $80 \times 80 \times 160$  мкм, объем мы-

шечного компонента –  $560,0 \times 10^3 \text{ мкм}^3$ , внесосудистой стромы –  $306,1 \times 10^3 \text{ мкм}^3$ , сосудистого русла –  $157,9 \times 10^3 \text{ мкм}^3$ .

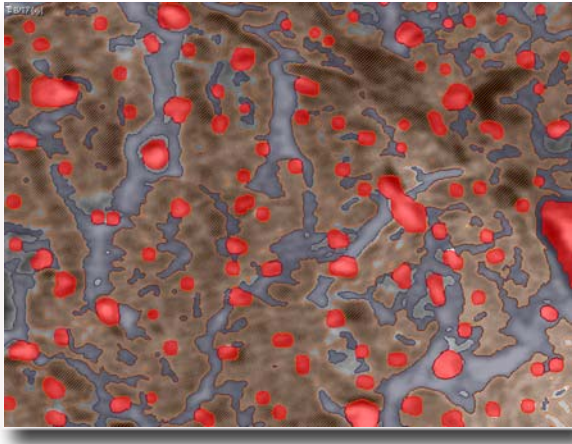


Рис. 5. Этап реконструкции – выделение рабочих контуров, морфометрия.

### Выводы

Трехмерная модель фрагмента миокарда позволяет наглядно оценить соотношение мышечного и соединительнотканного компонентов, а также визуализировать объемные характеристики, полученные при стереологическом подходе.

Оптимальными методами окрашивания срезов для контрастного выявления соединительнотканного компонента миокарда являются ме-

тодика Ван Гизон, окрашивание фосфорновольфрамным гематоксилином и железным гематоксилином Гейденгайна.

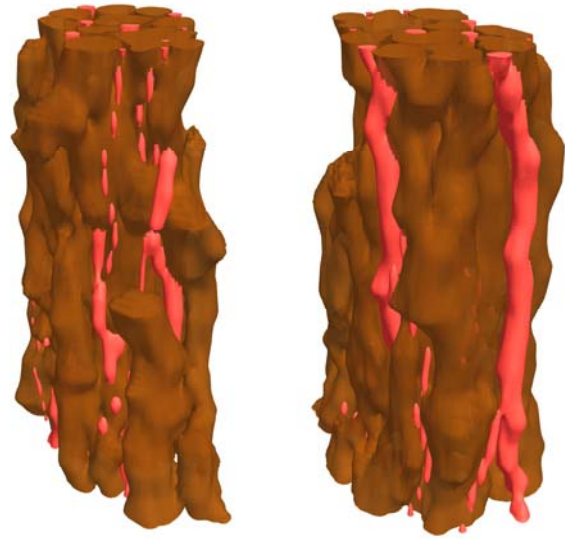


Рис. 6. Этап реконструкции – окончательная трехмерная модель.

### Перспективы дальнейших исследований

Планируется выполнение пространственной реконструкции фрагмента миокарда на границе двух слоев кардиомиоцитов, а также реконструкция миокарда на разных стадиях онтогенеза.

### Литературные источники

Автандилов Г.Г., Яблчанский Н.И., Губенко В.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса.- М.: Медицина, 1981.- 192 с.

Твердохліб І.В. Просторова реконструкція біологічних об'єктів за допомогою комп'ютерного моделювання // Морфологія.- 2007.- Т.1, №1.- С.135-139.

Туркевич Н.Г. Реконструкция микроскопических объектов по гистологическим срезам.- М.: Медицина, 1967.- 175 с.

Пространственная реконструкция биологических объектов с помощью компьютерного моделирования / И.В. Твердохлеб, И.С. Хрипков, Л.А. Романенко и др. // Мат-ли III науч. конф. «Карповські читання».- Дніпропетровськ, 2006.- С.57-59.

Лилли Р. Патогистологическая техника / Пер. с англ. под ред. В.В.Португалова.- М.: Мир, 1969.- 645 с.

Морфогенез зовнішньої форми та внутрішньої будови серця протягом філо- та онтогенезу // В.О.Козлов, С.Б.Крамар, В.Ф.Шаторна та ін. // Мат-ли I наук. конф. «Карповські читання».-

Дніпропетровськ: Пороги, 2004.- С.21-23.

Сілкіна Ю.В., Горелова Н.І. Використання методу тривимірної реконструкції в морфології // Мат-ли I наук. конф. «Карповські читання».- Дніпропетровськ: Пороги, 2004.- С.43-44.

A novel technique of three-dimensional reconstruction segmentation and analysis for sliced images of biological tissues / J. Li, H. Zhao, X. Ruan et al. // J. Zhejiang univ. sci.- 2005.- Vol.6, №12.- P.1210-1212.

Fiala J.C. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy // J. microsc.- 2005.- Vol.218.- P.52-61.

Three-dimensional models of individual cardiac histoanatomy: tools and challenges / R. Burton, G. Plank, J. Schneider et al. // Interact. integr. cardiol.- 2006.- Vol.1080.- P.301-319.

Программное обеспечение:

Adobe Photoshop:

<http://www.adobe.com/ru/products/photoshop/>

Amira for microscopy:

[http://www.amira.com](http://www.amira.com;); <http://www.mc.com/tgs/>

Autodesk 3ds Max:  
<http://usa.autodesk.com>;  
<http://www.autodesk.ru/>

**Горбунов А.О. Просторова реконструкція сполучнотканинного компоненту міокарда щурів.**

**Резюме.** Метою роботи явилася побудова тривимірної моделі фрагменту міокарда, візуалізація просторової організації його м'язового та сполучнотканинного компонентів. Матеріалом дослідження послуговували серця зрілих білих щурів. Використовувались стандартні гістологічні методики, фарбування зрізів для контрастного виявлення сполучнотканинного компоненту міокарда виконували за методом Ван Гізона, фосфорновольфрамовим гематоксилином та залізним гематоксилином Гейденгайна. На основі мікрофотографій серії послідовних гістологічних зрізів побудована просторова реконструкція фрагменту міокарда. Застосовувалось спеціальне програмне забезпечення – Amira for microscope. Тривимірна модель що отримана дозволяє наочно оцінити співвідношення м'язового та сполучнотканинного компонентів, а також візуалізувати об'ємні характеристики міокарда, що отримані за стереологічним методом. Тривимірна модель міокарда може використиметься в інших дослідженнях для демонстрації результатів.

**Ключові слова:** міокард, сполучнотканинний компонент, реконструкція, серійні зрізи, тривимірна модель.