

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
"ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені І.Я.ГОРБАЧЕВСЬКОГО"**

ШАТОРНА ВІРА ФЕДОРІВНА

УДК: 611.12:611.013.9:612.22:612.57-092.9

МОРФОГЕНЕТИЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ЕМБРІОНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ СЕРЦЯ

14.03.01 – нормальна анатомія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

Тернопіль – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Дніпропетровській державній медичній академії МОЗ України.

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України Козлов Володимир Олексійович.

Офіційні опоненти:

заслужений працівник освіти України, лауреат Державної премії в галузі науки і техніки, доктор біологічних наук, професор **Піскун Раїса Петрівна**, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, завідувач кафедри медичної біології;

доктор медичних наук, професор **Сікора Віталій Зіновійович**, Сумський державний університет МОН України, завідувач кафедри анатомії людини медичного інституту;

доктор біологічних наук, доцент **Куш Оксана Георгіївна**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

Захист відбудеться 30 жовтня 2009 р. об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 58.601.01 у державному вищому навчальному закладі "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського" МОЗ України (46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці державного вищого навчального закладу "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського" МОЗ України (46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1).

Автореферат розісланий 29 вересня 2009 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
доктор медичних наук, професор

Я.Я. Боднар

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Протягом останніх десятиріч в умовах посилення негативного впливу екологічної обстановки, посилення стресових факторів на організм людини суттєво виріс інтерес спеціалістів практично всіх підрозділів медицини і біології до адаптаційних можливостей серцево-судинної системи та проблем виникнення вад розвитку (Антипов В.Н. и др., 2008; Знаменська О.С. та ін., 2007; Кирьякулов Г.С. и др., 1997; Козлов В.А. и др., 2001). У цьому аспекті набуває значення медична і порівняльна ембріологія та їх методи дослідження (Круцяк В.М. та ін., 1998; Машталір М.А., 2006; Сілкина Ю.В., 2005; Camenich T.D. et al., 2002). Об'єктом інтересу стають зміни довкілля, що виникають під впливом антропогенних факторів та можуть провокувати порушення розвитку органів (Мутафьян О.А., 2002; Ярцев В.Н. и др., 2007; Barry M.A., 1990). Разом з тим, до теперішнього часу відсутня в необхідному обсязі інформація про морфогенетичні закономірності змін, що виникають протягом раннього кардіогенезу в будові серця під впливом тих чи інших факторів.

Зменшення числа набутих вад серця призводить до актуалізації питань щодо вивчення термінів і механізмів формування уроджених вад на етапах кардіогенезу під впливом різних чинників (Жаріков М.Ю., 2006; Машталір М.А., 2002; Michael P., 2002). Серед них досить часто зустрічаються гіпертермія та гіпоксія, але дослідження впливу зазначених факторів стосуються в основному фізіологічних зсувів, різноманітності викликаних порушень і не виявляють механізму утворення аномалії (Kim W.K., 2003; Stock M.K. et al., 1990; Ruckman R.N., 1985).

Безпосереднє спостереження за розвитком вад у людини неможливе, тому за допомогою індукованих експериментальних моделей стає можливим аналіз морфогенетичних змін у серці при формуванні вад розвитку серця, які пов'язані з дією фізичних факторів довкілля: дефектів будови камер та перегородок, вад розвитку вінцевих судин серця, тощо (Машталір М.А., 2006; Wessels A., 2000; Anderson R.N., 2004). При проведенні ембріологічних досліджень збільшується роль моделювання вад розвитку серця на ранніх етапах ембріогенезу, коли сам ембріон являє собою досить нестабільну систему (Козлов В.О. та ін., 2002, 2004; Машталір М.А., 2004, 2005; Піскун Р.П., 2005). Виявлення причин та механізму утворення аномалії розвитку серця в цілому, або його компонентів та крупних судин під впливом високих температур або гіпоксії дозволить розробити модель виникнення вади розвитку серця. Розширення уявлень про механізм і терміни формування вад серця під впливом фізичних чинників є основою для розуміння теоретичних і прикладних аспектів кардіогенезу (Машталір М.А., 2002; 2004; 2005; 2007; Шаторна В.Ф., 2005-2008). В експериментальних моделях, що використовували останнім часом було встановлено тісний зв'язок між строками впливу тератогенів та спектром і тяжкістю вад розвитку серця (Cartwright M.M., Smith S.M., 1995; Kirby M.L. et al., 2003). Такі періоди, для яких характерна підвищена чутливість

до дії ушкоджувальних чинників, називають «критичними періодами ембріогенезу». Вірогідність формування відхилень розвитку в ці періоди є найбільш високою. Окрім критичних, необхідно враховувати термінаційні періоди дії тератогену – тобто граничний термін ембріогенезу, протягом якого несприятливий чинник може індукувати аномалії розвитку. Цей період визначається термінами завершення формування органу і відрізняється для різних органів та тканин. У доступній науковій літературі ми не зустріли визначених термінаційних періодів кардіогенезу для гіпоксії та гіпертермії, а тільки перелік вад серця та крупних судин, що формуються в експериментальних моделях з використанням зазначених чинників (Wikenheiser J. et al., 1998; Upfold J. et al. 1991; Van Gold J., 1997).

Все вищевикладене свідчить про актуальність сучасних досліджень морфогенетичних закономірностей ембріонального розвитку серця в нормі та під впливом фізичних факторів і визначення термінаційних періодів кардіогенезу для гіпоксії та гіпертермії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом наукових розробок кафедри анатомії людини Дніпропетровської державної медичної академії за темою: «Морфогенез серця та судин після експериментальних втручань» (№ державної реєстрації 0106U012193). Дисертант вивчав закономірності формоутворення та розвитку структурних компонентів камер, клапанного апарату та крупних судин серця і є виконавцем складової частини вказаної науково-дослідної роботи стосовно аномального кардіогенезу. Тема дисертації і основні напрямки її виконання обговорені та затверджені Проблемною комісією МОЗ і АМН України «Морфологія людини» (протокол № 66 від 24 травня 2005 р.).

Мета дослідження: з'ясувати етапи морфогенезу в нормі і механізми розвитку вад серця, які обумовлені дією гіпоксії і гіпертермії, та виявити термінаційні періоди кардіогенезу.

Завдання дослідження:

1. Вивчити морфогенетичні зміни, що відбуваються в серці зародків курки і щура на ранніх стадіях кардіогенезу, в період септації у нормі та після впливу гіпоксії, гіпертермії.
2. Виявити термінаційні періоди розвитку серця протягом ембріогенезу та розробити модель управління морфогенетичними перетвореннями в серці.
3. Встановити спектр вад серця у курячих та щурячих зародків після впливу фізичних чинників (гіпоксія, гіпертермія) на стадіях розвитку, що відповідають завершенню септації серця.
4. Визначити механізми нормального та аномального розвитку серця після впливу тератогенів у ембріонів птахів і ссавців.
5. Провести зіставлення механізмів нормального та аномального морфогенезу сердець експериментальних тварин.

Об'єкт дослідження – ембріональний розвиток серця.

Предмет дослідження – анатомія серця ембріонів щура і курки у нормі та після дії гіпоксії та гіпертермії.

Методи дослідження: анатомічні – для макроскопічного дослідження зовнішньої будови серця та зародків з використанням світлової мікроскопії; гістологічні – для аналізу стану розвитку камер та перегородок серця, вад розвитку; імуногістохімічні – для оцінки перебігу в нормі та змін в основних гістогенетичних процесах; морфометричні – для кількісної оцінки окремих структур серця, стереологічні – для визначення питомого об'єму субклітинних структур, біометричні – для визначення об'єму вибірки, статистичні – для аналізу та інтерпретації отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше співставлені етапи розвитку серця птахів і ссавців на ранніх стадіях кардіогенезу та розроблені нормограми паралельності періодів розвитку, запропонована модель управління ремоделюванням серця.

Уперше визначено термінаційні періоди кардіогенезу, протягом яких вплив тератогенних чинників призводить до кардинальних змін у розвитку серця та формування вад розвитку. Визначені морфологічні феномени, що свідчать про вплив на ембріогенез і кардіогенез у моделях тератогенезу з використанням гіпертермії та гіпоксії. За допомогою гістологічних та імуногістохімічних досліджень вивчено та структурно описано морфогенетичні процеси, що призводять до формування вад серця в експериментальних моделях під впливом гіпоксії та гіпертермії. Отримані нові дані про основні структурні зміни в різних відділах серця – передсердях та шлуночках, міжшлуночкової і міжпередсердній перегородках, атріовентрикулярному каналі, конусно-стовбуровому відділі та клапанах серця – в нормі та при формуванні вад розвитку серця в моделях під впливом фізичних факторів. Уперше зіставлені за системою споріднених параметрів механізми нормального та аномального морфогенезу та кардіогенезу в різних моделях. Уточнено дані щодо нормального й аномального морфогенезу критичних ділянок раннього ембріонального серця, відповідальних за формування вад, – конусно-стовбурового відділу, його перегородок, атріовентрикулярних подушок, міжпередсердної і міжшлуночкової перегородок, а також отримані нові дані щодо їхнього внеску до аномального морфогенезу серця.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що отримані результати сприяють розширенню уявлень про основні принципи та конкретні механізми формування вад розвитку серця після впливу фізичних тератогенів (гіпоксія, гіпертермія). Результати дослідження дозволяють прогнозувати появу і тип уроджених вад розвитку серця у людини при дії таких факторів, як гіпоксія та гіпертермія. Отримані дані про аномальні морфологічні зміни в термінаційні періоди кардіогенезу експериментальних тварин при впливі тератогенів дозволяють скласти уявлення про можливі часові відрізки розвитку серця, протягом яких вплив гіпоксії та гіпертермії призводить до формування певних вад, які можна прогнозувати. Дані про механізми

формування вад є також теоретичною основою для розробки основ профілактичних і коригуючих заходів у гінекологічній практиці у тому випадку, якщо в пренатальному періоді відбувався вплив певного тератогенного фактора.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені у наукову роботу та навчальний процес кафедри нормальної анатомії Запорізького державного медичного університету, Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, Івано-Франківського національного медичного університету, Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, кафедри анатомії та гістології Ужгородського національного університету.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно виконано патентно-інформаційний пошук, визначено мету та завдання дослідження. Аналіз наукової літератури, забір матеріалу, всі морфологічні дослідження, морфометричний та статистичний аналіз, розділи дисертаційної роботи, аналіз та узагальнення одержаних результатів, формулювання висновків та оформлення дисертації виконані автором самостійно. Основною є участь автора в підготовці статей до опублікування, а також наукових розробок для оформлення деклараційних патентів на винахід та авторського свідоцтва (у співавторстві). В актах впровадження наводяться дані, що особисто отримані автором у процесі виконання роботи. Автором не було використано результатів виконаної нею кандидатської дисертації та ідеї співавторів публікацій.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження оприлюднено на міжнародній конференції, присвяченій року Росії в Україні «Саміт нормальних анатомів України та Росії» (Тернопіль, 2003), науково-практичній конференції морфологів «(Запоріжжя, 2003), Всеукраїнській науковій конференції «Актуальні питання клінічної анатомії та оперативної хірургії» (Чернівці, 2004), на засіданнях Дніпропетровського обласного відділення Товариства АГЕТ України (2004-2006), на I, II та III Всеукраїнських наукових морфологічних конференціях «Карповські читання» (Дніпропетровськ, 2005, 2006, 2007), науково-практичній конференції «Морфологічний стан тканин і органів у нормі та при моделюванні патологічних процесів» (Тернопіль, 2006), IV Національному конгресі АГЕТ України (Сімферополь, 2006), науково-практичній конференції «Досвід і проблеми застосування сучасних морфологічних методів досліджень органів і тканин у нормі та при діагностиці патологічних процесів» (Тернопіль, 2007), VIII міжнародного конгресу патологів України «Сучасні проблеми патологічної анатомії» (Полтава, 2008), науково-практичній конференції «Морфологічні основи компенсаторно-приспосувальних процесів і їх структурне забезпечення» (Тернопіль, 2008).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 40 наукових праць, з них один розділ монографії, 20 статей у наукових фахових виданнях, рекомендованих ВАК України для біологічних наук, 6 статей у наукових фахових виданнях, рекомендованих ВАК України для медичних наук (11 статей опубліковано без співавторів), 10 робіт у матеріалах наукових конгресів і конференцій, 2 деклараційних патенти України на винахід та свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 265 сторінках машинописного тексту, з котрих власне тексту 221 сторінка. Робота містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріал та методи досліджень, 4 розділи власних досліджень, розділ аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, рекомендації щодо практичного використання, список використаної літератури, який містить 317 найменувань (152 роботи – кирилицею, 165 – латиницею). Дисертаційна робота проілюстрована 104 рисунками та 23 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом для даного дослідження були серця двох об'єктів: ембріонів курей та щурів. Усього було досліджено 700 об'єктів: 350 ембріонів курки (з них 50 – контрольна група, 150 – після дії гіпоксії, 150 – після дії гіпертермії); 350 ембріонів щурів (з них 50 – контрольна група, 150 – після дії гіпоксії, 150 – після дії гіпертермії). Комісією з біоетики Дніпропетровської державної медичної академії (протокол № 7 від 22.03.05 р.) встановлено, що проведені наукові дослідження зародків експериментальних тварин відповідають етичним вимогам згідно наказу МОЗ України № 231 від 01.11.2000 року. Одержання чітко датованих термінів розвитку зародку курки і щура, можливість стандартизації етапів розвитку, а також простота у впливі тератогенних факторів є перевагою у виборі саме цього матеріалу для дослідження.

Визначивши за даними наукової літератури та експериментально ключові терміни для формування серця ембріона курки та щура, що передують основним етапам кардіогенезу, зазначили їх як можливі термінаційні періоди дії тератогенів на серце. Нами було складено порівняльну таблицю основних етапів кардіогенезу ембріонів курки і щура та для впливу обирались моменти, що передують утворенню делямінаційної пластинки, міжшлуночкової перегородки, міжпередсердної перегородки, розподілу конотрункусу на аорту та легеневий стовбур, утворенню клапанного апарату. Тобто найбільшу увагу ми приділяли термінам раннього кардіогенезу як у дослідженнях з ембріонами курки, так і з ембріонами щура.

Для визначення часу найбільшого впливу гіпоксії та гіпертермії на кардіогенез проводили попереднє дослідження шляхом моделювання гіпоксії та гіпертермії ембріонів у три різні періоди розвитку ембріону. Відповідно до поставлених завдань спочатку формували три експериментальні групи у кожному виді тварин. Перший експеримент із вивчення впливу фізичних чинників проводили на стадії розвитку, що відповідає початку формування серцевої трубки (у ембріонів курки – 1-ша доба інкубації, у ембріонів щура – 8-ма доба ембріогенезу). Другий експеримент проводили в період ембріогенезу, що передує септації серця (у ембріонів курки – 3-тя доба інкубації, у ембріонів щура – 9-та доба ембріогенезу). Третій експеримент проводили в стадії розвитку, яка відповідає закінченню септації серця кожного виду дослідних тварин.

Результати показали, що 1-й вплив (перша експериментальна група) гіпертермією призводив до загальної загибелі ембріонів незалежно від виду тварини, тому що на цей період розвитку ембріон являє собою нестабільну систему і вплив високих температур призводить до незворотних процесів та руйнує організм. У тій же групі дослідних тварин вплив гіпоксією не мав наслідків, оскільки потреба ембріона в кисні на цей період розвитку незначна.

Аналіз результатів другої експериментальної групи показав, що вплив гіпоксії та гіпертермії саме в цей період призводив до часткової загибелі ембріонів та формування численних вад як зовнішнього розвитку цілого ембріону, так і вад серця. Вплив гіпоксії та гіпертермії на загальний розвиток у третій експериментальній групі теж спричинив масову загибель ембріонів. Тому в подальшому нами розглядалися лише результати впливу фізичними факторами на 2-гу групу ембріонів.

У роботі використано 4 основні моделі формування вад розвитку серця. Вплив тератогенними чинниками проводили по-різному у різних видів тварин: в ембріонів курей вплив гіпоксією відбувався під час інкубації протягом 6-10 годин у герметично закритій камері – перша модель. Вплив гіпертермією проводився під час інкубації впродовж 3-х годин підвищенням загальної температури в інкубаторі до 45 градусів Цельсія – друга модель. Інкубацію проводили в лабораторних умовах за загальноприйнятими методиками (Астауров Б.Л., 1975).

Для вивчення порушень у формуванні серця вплив гіпертермією на ембріони щурів проводили опосередковано через материнську гіпертермію. Підвищення температури самки викликали шляхом однократного внутрішньоочеревинного введення пірогеналу в дозі 3,0мг/кг – третя модель експерименту. У всіх тварин контролювали підвищення температури тіла наступного дня за допомогою електротермометра фірми "Microlife" (Швейцарія). Встановлено, що через 24 години після внутрішньоочеревинного введення щурам-самцям пірогеналу температура підвищувалася від $36,6 \pm 0,15$ до $38,9 \pm 0,11$ °C і утримувалася на даному рівні від 18 до 26 годин. У нашому дослідженні всі самки вижили. Вплив гіпоксією на ембріонів щура проводили згідно методики Н.Ф. Іваницької (Иваницкая Н.Ф., 1976) та методичних рекомендацій Міністерства

охорони здоров'я України (2003 р.) підшкірним введенням нітрату натрію (50 мг/кг) одноразово – четверта експериментальна модель. Тобто, в наших дослідженнях ми формували гемічну гіпоксію щура та ембріонів.

Для морфологічної оцінки формування зовнішніх вад ембріогенезу і вад серця у зародків на ранньому ембріональному розвитку після дії тератогенів при макроскопічному дослідженні визначали: 1) кут згинання ембріону; 2) відповідність діагностичних ознак терміну інкубації; 3) ступінь аномальних процесів розвитку та кардіогенезу (кили, ектопія серця).

Кут згинання вимірювався між двома умовними лініями, що проводились на голові та тулубі. Головна лінія проводилась паралельно тім'яній частині голови по верхньому краю ока, тулубова лінія проводилась паралельно спині на рівні бруньок обох кінцівок. Перетин цих ліній і складав кут згинання. У нормі кут згинання ембріону на стадіях розвитку, що відповідають 4-7 добі інкубації у курей та 9-10 добі ембріогенезу у щурів складав менше 50° , голова ембріону при цьому торкалась обов'язково хвостового відділу ембріону. Якщо кут згинання був більше 50° , а голова не торкалась хвоста, це розцінювалось як порушення розвитку.

На більш пізніх етапах ембріогенезу використовувались наступні загальноприйняті діагностичні ознаки відповідності стадії розвитку: розвиток ока та повік, формування пальців на нозі в обох видів експериментальних тварин, формування крила, дзьоба, поява пір'євих сосочків (у ембріонів курей) та формування вібрис та складок шкіри – у ембріонів щура.

Відповідно до мети і завдань дослідження був використаний адекватний комплекс методів гістологічного, імуногістохімічного, морфометричного та біометричного аналізу. Всі методи можна представити як комплекс морфологічних методик.

Анатомічні – препарування, моделювання вад розвитку ембріону та порушень кардіогенезу для макроскопічного дослідження ембріона та дослідження зовнішньої будови самих зародків та їх сердець. Яйця курей породи білий леггорн інкубували при 38° Цельсія та за відносної вологості 80 %. Стандартизацію здійснювали за допомогою стандартних таблиць нормального розвитку за Hamburger et Hamilton (НН). Макроскопічне дослідження проводили для встановлення стадії розвитку, формування можливих зовнішніх вад розвитку на щойно вилучених зародках, після фіксації рідиною Буена або формаліну;

Гістологічні – виготовлення серійних гістотопографічних зрізів для аналізу просторового розміщення структур серця в нормі та для порівняння з порушеннями розвитку, для аналізу стану розвитку камер та перегородок серця, вад розвитку з використанням світлової мікроскопії. Гістотопографічні зрізи проводили через шийно-грудний відділ або грудну клітку цілого ембріона на ранніх зародках як курей, так і щурів. Даний метод дозволяв порівнювати відхилення в топографії структур серця, крупних судин (аорта, легеневий стовбур), клапанного апарату.

Для вивчення тонких структур таких як кардіоміоцити, мезенхімні клітини, ендотелій, епітеліально-мезенхімні трансформації, кардіогель та проведення кількісного морфологічного аналізу використовували напівтонкі зрізи. Для виготовлення таких зрізів об'єкти заливали в епон-аралдіт.

Імуногістохімічні – для оцінки перебігу кардіогенезу в нормі та змін основних гістогенетичних процесів (проліферація, клітинна загибель, зростання клітин, васкулогенез) та їх співвідношень. Використання імуногістохімічних маркерів та систем візуалізації у зв'язку з їх високою чутливістю та інформативністю дозволяє на клітинному та тканинному рівнях кількісно оцінювати процеси клітинної проліферації, диференціювання, клітинної загибелі. Ми проводили аналіз даних після впливу як гіпертермією, так і гіпоксією, що дало можливість співставити результати для визначення терміну найбільшого впливу та порушень ходу основних напрямків гістогенетичних процесів. У роботі використовували такі маркери:

- HSP-70 – маркер захисного білкового компоненту у тканинах серця;
- CD34 – цитоспецифічний маркер ендотелію. Використання саме цього маркера дало можливість визначити початок та напрямок перших етапів утворення судин серця;
- α -sma – маркер гладенької м'язової тканини, використання якого дало можливість не тільки визначити основні етапи васкулогенезу, але й дозволило відстежити диференціювання первинних судин серця, що розвивається у процесі кардіогенезу, та зміни, які відбуваються після впливу гіпоксії та гіпертермії;
- bcl-2 – маркер апоптозу (запрограмована загибель клітин у відповідь на зовнішні або внутрішні сигнали). Ми досліджували клітинну загибель ембріонального серця щура на ранніх етапах кардіогенезу та порушення цих процесів після впливу гіпоксії та гіпертермії;
- ядерний маркер Ki67 – маркер проліферації, він дозволяє позначити всі клітини, що знаходяться на різних стадіях мітозу.

Морфометричні – для кількісної оцінки окремих структур серця. При проведенні кількісного морфологічного дослідження керувалися загальними принципами морфометричного та стереологічного аналізу, викладеними Автанділовим Г.Г. (1990), Кірюкуловим Г.С. зі співав. (1990). При дослідженнях розвитку серця проводилася морфометрія на поперечних та повздовжніх серійних гістотопографічних зрізах за допомогою окуляр-мікрометра МОВ 1-16. При вимірюванні товщини м'язової та мезенхімної частин стулок передсердно-шлуночкових клапанів оцінювали максимальне значення цих параметрів напроти передньої та задньої атріовентрикулярних ендокардіальних подушок (ЕП). Товщину міжпередсердної перегородки (МПП) визначали у ділянці верхівки серця (апикальна частина), середній та базальній частинах. Довжину конусно-стовбурового відділу (КСВ), довжину подушок атріовентрикулярного каналу (АВК) та товщину ендокардіального гребеня КСВ встановлювали за кількістю зрізів, що пройшли

через КСВ, помноженою на товщину зрізів. Діаметр аорти та легеневого стовбуру вимірювався у їхніх найбільш широких ділянках. стереологічні – для визначення питомого об'єму субклітинних структур;

Біометричну обробку кількісних даних за кожним вивченим параметром проводили з попереднім визначенням необхідного об'єму вибірки і графічним аналізом статистичного розподілення величин.

Морфометричні дані зазнавали статистичної обробки, для обчислення яких використовували стандартні формули (Лакин Г.Ф., 1990). Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили з урахуванням критерію Стьюдента, або за допомогою непараметричних критеріїв (Ван-дер-Вардена, Уїлкоксона). У ході проведення біометричного аналізу отриманих результатів розрахунки виконували за допомогою IBM PC «Pentium» при використанні відповідних прикладних програм (№ продукту 00045-139-426-974).

Результати дослідження та їх аналіз. Прояв впливу фізичних факторів як тератогенів на хід ембріогенезу визначався в першу чергу на підвищенні смертності ембріонів. Результати дослідження показали, що найбільша ембріональна смертність в експериментальній групі ембріонів курки (вплив тератогенними чинниками на 3-тю добу) після впливу гіпертермією доводилася на 5-6-ту добу і досягала 11,5%, потім процес загибелі стабілізувався і до 15-ї доби вже залишався незначним, а до кінця інкубації знижувався, хоча кількість виживших ембріонів залишалася вже невеликою. А після впливу гіпоксією найвища смертність припадала на 8-12 добу, тобто визначалась часова післядія впливу цього фізичного фактора на розвиток ембріону. В контрольній же групі смертність спочатку інкубації не спостерігалася, а починаючи з 10-ї доби, спостерігалися поодинокі випадки, найбільша частка загиблих курячих ембріонів зустрічалася наприкінці інкубації.

Другим показником впливу тератогену на хід загального розвитку є вагові показники ембріону. Дослідження вологої ваги ембріонів курей та щурів в порівнянні з контрольною групою та в експерименті продемонстрували, що вплив зазначених фізичних факторів призводить до стабільного відставання маси, незалежно від чинника та виду піддослідних тварин (рис.1). Порівняння цілих ембріонів після впливу гіпертермією та гіпоксією з ембріонами контрольної групи обох видів тварин показало виражене відставання в розвитку на 2-3 стадії від норми, причому це відставання більш явне було у віддаленій післядії.

В нормі на ранніх етапах розвитку хвіст ембріону завжди торкається мозкових пухирів, а сам ембріон не тільки зігнутий (флексія ембріону), але й скручений за повздожньою віссю (торсія ембріону). В експерименті ми спостерігали порушення утворення головного або тулубового вигину, а також порушення скручування головного, тулубового й хвостового відділів та явне

відставання в закладці й рості бруньок кінцівок (рис.2). На ранніх стадіях інкубації після впливу фізичними факторами (гіпоксія, гіпертермія) визначалось явне зменшення кута згинання та повна відсутність скручування при інших зовнішніх ідентичних показниках розвитку ембріона в цілому (таких як маса, розмір, рівень розвитку ока та бруньок кінцівок). Такі прояви аномального ембріогенезу зустрічались в наших дослідженнях в обох видах експериментальних тварин незалежно від чинника.

Рис.1. Динаміка зміни вагових показників ембріонів контрольної групи та в експерименті. А – ембріони курки, Б – ембріони щура.

Досліджуючи вплив гіпоксії та гіпертермії ми визначали зміни ходу кардіогенезу в експериментах як на макро- так і на мікрорівні. З вад розвитку серця в дослідженні зовнішніх проявів порушень розвитку, нами спостерігалася ектопія серця, тобто патологічне розташування серця, при якому воно почасти або повністю перебуває поза кістком грудної клітини. Виявити ектопію серця можливо лише на тій стадії, коли сформована передня стінка грудної та частково черевної порожнини і вже відсутня в нормі фізіологічна кила пупкового канатику. З даних, які отримані з джерел наукової літератури відомо, що ектопія часто приєднується до важких аномалій розвитку внутрішньої структури серця й інших органів (тетрада Фалло, вади клапанів, дефекти перегородок).

Рис. 2. Ембріон курки 6-тої доби розвитку.

А - нормальний ембріон інтактної групи;

Б - ембріон після впливу гіпертермією з порушенням згинання в тулубовому і хвостовому відділах.

У контрольних групах ембріонів випадків ектопії серця нами не спостерігалися зовсім. Ектопія серця та утворення кили в експериментальних групах зустрічались на різних стадіях розвитку ембріона (4,2% - після впливу гіпертермією, 3,1% - після впливу гіпоксією – у ембріонів щура, 3,6% - під впливом гіпертермії у ембріонів курки). Не спостерігались випадки формування ектопії серця лише у ембріонів курки після впливу гіпоксією. Найбільш пізнім терміном утворення ектопії серця в позагрудинний простір й при цьому з явним недорозвиненням передньої

стілки грудної та черевної порожнини, нами зустрічався випадок на 10-й та 13-й добі ембріогенезу курки (рис. 3).

Рис. 3. Ектопія серця ембріонів курки різних стадій розвитку. Ембріон курки 4-х діб інкубації після впливу гіпертермією (А) та 13-ї доби інкубації (Б). Стрілкою вказано серце, яке розташоване поза грудною клітиною.

Зовні ембріон не відставав у розвитку від норми, формування його повік, дзьоба, кінцівок, пір'яних сосочків й інших діагностичних ознак зовнішнього розвитку відповідало таблицям нормального розвитку.

У дослідженнях з моделями на щурах доля часткової або повної ектопії серця склала 4,2% після впливу гіпертермією та 5,7% гіпоксією. Але зазначена вада серця, на відміну від курячих ембріонів, зустрічалася лише на ранніх стадіях ембріогенезу - до 13 доби розвитку (рис. 4). У процесі досліджень також визначили, що ембріони, які перенесли вплив гіпоксії або високої температури та дожили до пізніх стадій, не тільки відстають у своєму розвитку, але, при розкритті матки, виглядають ослабленими, малорухомими, з яскраво вираженою гіперемією покривів.

Рис. 4. Ектопія серця ембріона щура
13 доби розвитку після впливу гіпоксією.

Подальші дослідження включали результати впливу гіпоксії або гіпертермії на хід розвитку ембріонального серця. Розглядаючи процеси кардіогенезу ми встановлювали паралельні етапи розвитку серця експериментальних тварин в нормі. Після утворення серцевої петлі (сигмоподібне серце) починається етап септації – утворення перегородок – досить складний просторово та тканиноутворюючий процес. Стадії кардіогенезу, що передують септації серця, багаті подіями,

найяскравішими з яких є утворення ендокардіальних подушок, накопичення кардіального гелю та епітеліально-мезенхімні трансформації, процес делямінації міокарду шлуночків та АВК. Ці події відбуваються протягом раннього ембріогенезу та є основними гарантами закладки та нормального розвитку серця.

Після впливу обох тератогенів відбувалася не тільки затримка розвитку зародків взагалі, але відмічалася затримка у розвитку серця. Наслідком впливу гіпоксією була зміна зовнішньої форми серця ембріона щура, а саме: майже у 87% спостерігалась куляста форма серця. У експерименті з гіпертермією більшість зародків мала відхилення у розвитку серця, що належали до пригнічення формування камер та стінок серця без їхнього розширення, в той час як після впливу гіпоксією спостерігалось розширення камер. Потоншення стінок у моделі з гіпертермією було пов'язано як з пригніченням проліферації, так і збільшенням апоптозів міокарду. В серці ембріонів щура, як і в серці курячих зародків, після впливу тератогенів основні процеси, що характеризують формування ембріонального серця, затримувалися або мали аномальний перебіг.

Наслідком впливу підвищеної температури на хід кардіогенезу на ранніх етапах розвитку ембріону щура (11-12 діб) було порушення цілісності ендотелію атріовентрикулярних подушок та гребенів атріовентрикулярного каналу і крововиливи у обсяг подушок. Такі процеси можливі при порушенні контактів ендотеліоцитів під впливом тератогену. Пізніше ми не спостерігали клітин крові або остаточних геморагічних проявів у мезенхімних частинах серця, що свідчило про загибель саме тих зародків, які мали крововиливи у атріовентрикулярні подушки.

Враховуючі дані про участь позаклітинного матриксу у септаційних процесах, ми дійшли висновку, що склад кардіогелю, або позаклітинного матриксу подушок, змінюється на найбільш ранніх етапах їх розвитку до початку септації, що згодом провокує аномальний перебіг епітеліально-мезенхімних перетворень. У формуванні атріовентрикулярних (АВ) подушок виділялася стадія, коли максимальна кількість клітин накопичувалася під ендокардом. Можливо, що ця стадія характеризувалася меншою міграційною активністю клітин або особливостями складу матриксу в цій зоні. Лабільність форми АВ подушок у всіх нормальних зародків, на нашу думку, відіграє важливу роль в ефективному закритті просвіту АВК під час скорочення серця. Затримка редукції кардіогелю ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу призводила до високої варіативності форм подушок, бо, як відомо, кардіогель редукується паралельно заселенню обсягу подушки мезенхімою. Зміни у формі інтактних подушок у просторі коливались, але в жодного з зародків при нормальному кардіогенезі не було виростів та заворотів тканини подушок, які часто спостерігалось після дії гіпоксії та гіпертермії (рис. 5).

Навіть якщо форма самої подушки відповідала нормі, то ми спостерігали формування аномальних первинних сухожилкових струн, або порушення їх клітинного вмісту у експериментальних тварин обох видів. Досить значну долю займало порушення ходу епітеліально-

мезенхімних трансформацій ендокардіальних подушок та заповнення обсягу подушки мезенхімними клітинами, затримка формування зон ендокардіальних подушок та процесу їх міокардіолізації. Результати морфометричних досліджень вказують на негативний вплив гіпоксії та гіпертермії на хід формоутворюючих процесів атріовентрикулярного каналу та формування стулок передсердно-шлуночкових клапанів.

Рис.5. Варіанти порушень форми первинних стулок лівого передсердно-шлуночкового отвору серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Напівтонкий зріз передсердно-шлуночкових клапанів.

А – потовщення стулок та нерівномірність ущільнення мезенхімних клітин;

Б – витончення підстави та зменшення обсягу стулки.

Забарвлення: метиленовий синій та ШИК-реакція. Збільшення x 400.

В експерименті ми спостерігали зменшення довжини стулок, хоча і не на всіх етапах кардіогенезу. Гіпоксія призводить до менших змін в клапанному апараті передсердно-шлуночкових клапанів серця ембріона курки, особливо це стосується правого передсердно-шлуночкового клапану. Це пояснюється м'язовим складом цього клапану, тому і вплив на зазначену структуру менш виражений. У ембріонів щура, незалежно від чинника (гіпоксія чи гіпертермія), спостерігалось теж укорочення стулок передсердно-шлуночкових клапанів як у правому, так і в лівому передсердно-шлуночковому отворах. Стулки передсердно-шлуночкових отворів у щурів за будовою такі ж як і у людини, їх склад та етапи формування схожі, що може дозволити робити певні екстраполяції на кардіогенез людини. Зміна клітинного складу стулок клапанів, порушення процесів міокардіолізації наглядно демонструється порушенням питомої площі стулок передсердно-шлуночкових клапанів (рис. 6).

Аналіз змін в довжині та відносної площі стулок передсердно-шлуночкових клапанів доводить, що різні тканини по-різному реагують на вплив гіпоксії та гіпертермії. Більш високо диференційовані тканини, такі як міокард, переживають вплив негативних факторів більш «стійко», тобто реакція менше виражена і наслідки впливу призводять до незначних аномалій. Низькодиференційовані тканини, такі як мезенхіма ембріонального серця, реагує більш виражено і наслідки проявляються в явних аномаліях та дефектах розвитку. Таким чином, результати дослідження продемонстрували вплив фізичних чинників, таких як гіпоксія та гіпертермія, не тільки на форму та довжину стулок передсердно-шлуночкових отворів ембріонів щура та курки, але й на їх клітинний склад та об'єм.

Рис. 6. Динаміка зміни відносної площі стулок правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріонів щура на пізніх стадіях розвитку в нормі та після впливу гіпоксією та гіпертермією.

Атріовентрикулярні подушки приймають участь у формуванні не тільки передсердно-шлуночкових клапанів, але й об'єднанні м'язової та мезенхімної частин МШП. Тому вплив гіпоксії або гіпертермії на становлення та розвиток ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу позначався також досить виразно і на формуванні перегородок серця. Спектр вад розвитку міжшлуночкової перегородки досить широкий, але найзначнішим дефектом, що ми спостерігали, було збереження міжшлуночкового отвору (показники зазначеного дефекту спостерігались в обох експериментальних групах у досить значній кількості випадків: від 33,4% до 43,5%). Даний дефект відбувався як результат порушення злиття мезенхімної та м'язової частин первинної міжшлуночкової перегородки (рис. 7).

Рис. 7. Дефект міжшлуночкової перегородки серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення 100.

- 1 – міжшлуночковий отвір;
- 2 - мезенхімна частина перегородки;
- 3 - м'язова частина перегородки;
- 4 – окремі трабекули перегородки.

Другим порушенням процесів септації було утворення перфорацій у міжшлуночкової перегородці. Такі перегородки нагадували окремі трабекули між якими зберігались отвори – перфорації, які не відокремлювали повністю порожнини шлуночків та мали вигляд розвинутих синусоїдів.

Вплив зазначених тератогенів відзначався на процесах септації також і в тих випадках, коли перегородки були сформовані в необхідний термін та не мали дефекту. Проте результати проведеного морфометричного дослідження вказують на зміни параметрів перегородок (рис. 8). Ми проводили вимір МШП у трьох пунктах: апікальна частина (м'язова за складом), проміжна частина (місце злиття м'язової та мезенхімної частин) та базальна частина (мезенхімна за складом). Такий розгляд товщини МШП був досить логічним, бо дозволяв співставити результати впливу на різні види тканин, що формують саму перегородку на ранніх етапах кардіогенезу. Як видно з діаграми, вплив гіпоксією та високими температурами призводить до різних напрямків порушень у формуванні МШП. Якщо гіпоксія провокує значне потовщення м'язових структур серця і перегородок, то гіпертермія достовірно зменшує їх товщину. Механізм такого порушення у розвитку ембріонального серця було виявлено у наступних наших дослідженнях за допомогою імуногістохімічних маркерів, які вказали на зміну напрямку гістологічних процесів в експериментальних групах після впливу тератогенного чинника.

Рис. 8. Вплив гіпоксії та гіпертермії на товщину проміжної частини міжшлуночкової перегородки курячих ембріонів (мкм).

Розглядаючи порушення формоутворюючих процесів серцевої стінки на прикладі впливу формування стінки передсердь в нормі та після впливу гіпоксії та гіпертермії, ми спостерігали зміни товщини стінки, що мали спільні риси, незалежно від фактору дії. Після впливу тератогенами визначався період, коли товщина стінок достовірно зменшувалась, незалежно від фактору впливу, а наприкінці інкубації товщина перебільшувала норму. Неоднозначність впливу фізичних факторів на формування стінки передсердя та шлуночків ми пояснюємо різним походженням камер серця: передсердя є похідним венозного синусу, а шлуночок відразу формується як камера серця (рис. 9).

Вплив гіпоксії та гіпертермії на формування стінок шлуночків відбувався досить по-різному не лише у різних видів дослідних тварин, але й у різних експериментах. Досліджуючи вплив тератогенних чинників таких як гіпоксія та гіпертермія, на ранніх етапах кардіогенезу ми спостерігали невластиве для нормального розвитку порушення процесу делямінації міокарду шлуночків та атривентрикулярного каналу. Під впливом гіпертермії делямінаційна пластинка не підлягала повній перфорації як то відбувається в нормі, а залишалась часткою внутрішнього шару стінки шлуночків, утворюючи аномальні трабекули, які сполучали між собою значні ділянки

трабекулярного шару шлуночків і утворювали структури, що схожі на додатковий внутрішній шар міокарду.

Рис. 9. Зміна товщини передсердь ембріонального серця курки під впливом гіпоксії та гіпертермії (мкм).

Так як процес делямінації відбувається на самих ранніх етапах кардіогенезу, то і вплив тератогенними чинниками саме в ці швидкоплинні періоди призводить до порушень формування стінок камер серця і похідних всього процесу делямінації: стулок передсердно-шлуночкових клапанів, соскоподібних м'язів та сухожилкових струн. Наші дослідження дозволили визначити, що термін впливу на кардіогенез прямо залежить від часу, а саме: найбільший результат зсувів формування серця припадає на час, коли відбуваються епітеліально-мезенхімні перетворення, ще існує кардіогель, або його залишки та відбувається процес делямінації міокарду атріовентрикулярного каналу та міокарду шлуночків. Таких даних ми не зустрічали в наукових публікаціях, тому порівняння провести не є можливим. Після впливу гіпоксією ми спостерігали в обох групах тварин потовщення делямінаційної пластинки та порушення процесів трабекуляції, чого не спостерігалось в контрольній групі, де механізм делямінації швидко минав і в результаті формувались первинні соскоподібні м'язи та сухожилкові струни. Зсуви процесу делямінації призводять в свою чергу не тільки до порушень формування стінки шлуночку, але і до порушення закладки та утворення соскоподібних м'язів, сухожилкових струн та стулок передсердно-шлуночкових клапанів. Спектр порушень формування серцевої стінки був досить значним, але виділялися такі яскраві феномени, як утворення аномальних трабекул внутрішнього шару міокарду шлуночків внаслідок порушень процесів делямінації, локальне потовщення стінки шлуночку, зміна напрямку пучків кардіоміоцитів трабекулярного шару, що, безсумнівно, впливало на скорочувальну функцію серця. Загальним напрямком порушення кардіогенезу для впливу гіпоксією є збільшення товщини стінки серця та збільшення кількості та діаметру функціонуючих судин міокарду. Тільки після впливу гіпоксією на хід ембріогенезу щурів спостерігалась гіперплазія ендотелію: часткова гіперплазія ендотелію передсердь, повна гіперплазія ендотелію передсердь, повна гіперплазія ендотелію шлуночків та повна гіперплазія ендотелію усього серця (тобто передсердь та шлуночків). В експериментах з ембріонами курки зазначена аномалія не спостерігалась.

Аналізуючи вплив обох факторів на хід розвитку крупних судин серця, ми визначали етапи: відокремлення конотрункусу від трубчатого серця, розподіл загального конотрункусу на аорту та легеневий стовбур та утворення клапанів аорти та легеневого стовбуру. Результати дослідження показали, що на 7-8-й добі розвитку ембріону щура та 3-4-й добі ембріона курки від стінки шлуночку починає відокремлюватися артеріальний стовбур (конотрункус). Вигин серцевої трубки і ротація шлуночкових сегментів призводить до того, що конотрункус займає переднє положення щодо випускного відділу і передсердя. Тобто у процесах відокремлення приймають участь зовнішня трансформація самого серця та ендокардіальні подушки. Майбутні шлуночки плавно переходять в конотрункус, стінки якого є продовженням стінок первинних шлуночків. Ранні процеси трабекуляції міокарду шлуночку відсутні в стінках конотрункусу, що дозволяє цій ділянці серця диференціюватися як судині. Ендокардіальні гребені, які формуються та розвиваються в конотрункусі, мають таку ж саму форму та клітинний склад, теж саме джерело походження, як і ендокардіальні подушки передсердно-шлуночкового отвору і приймають активну участь у відокремленні конотрункусу та в розподілі його на аорту та легеневий стовбур.

Досліджуючи вплив тератогенних чинників, таких як гіпоксія та гіпертермія, ми спостерігали невласливе для нормального кардіогенезу порушення процесу формування великих судин серця, таких як аорта та легеневий стовбур. У ранніх ембріонів (11-12 доба розвитку ембріона щура та 5-6 доба ембріона курки), які пережили вплив фізичних факторів спостерігали локальне пригнічення проліферації та порушення процесів апоптозу. В наших дослідженнях виявлено, що перед закінченням септації довжина конотрункусу зменшувалась у зародків контрольної групи обох видів тварин, в той час як в експериментальних групах збільшувались і довжина і діаметр, що також свідчить про порушення апоптозу під впливом гіпоксії та гіпертермії. Наслідком таких порушень було збільшення діаметру конусно-стовбурового відділу серця у ембріонів курки і щура незалежно від чинника (до 62,3%) та на другому місці - вади розвитку стулок півмісяцевих заслінок аорти та легеневого стовбуру (21,8%).

При класифікації вад розвитку аорти та легеневого стовбуру та їх клапанного апарату, ми визначили основні напрямки аномалій розвитку, які безумовно, призводили до порушення гемодинаміки серця (рис. 10). Спектр аномалій визначався нами в обох експериментальних групах тварин як після впливу гіпертермією, так і після впливу гіпоксією і їх числові показники майже не відрізнялись. Слід зазначити, що такі вади як збільшення діаметру та довжини судини часто сполучалися з аномальними формами стулок, або порушенням їх клітинного вмісту, що ускладнювало класифікацію вад розвитку крупних судин.

Рис. 10. Співвідношення відсотків вад розвитку крупних судин серця ембріонів щура (А) та курки (Б) в експерименті під впливом гіпоксії (%).

Дослідження ранніх етапів формування стулочок напівмісячних заслінок аорти та легеневого стовбуру в нормі та після впливу гіпоксії і гіпертермії показало, що поряд з порушенням формоутворюючих процесів аорти та легеневого стовбуру в період ембріогенезу (збільшення діаметру та довжини) відбувається також зсув співвідношення апоптоз-проліферація, що призводить до формування аномальних за формою стулочок заслінок судин. Досліджуючи клапанний апарат аорти, легеневого стовбуру та передсердно-шлуночкових отворів ми визначили, що мезенхіма ембріонального серця, реагує більш виразно на вплив гіпоксії і наслідки проявляються в явних аномаліях та дефектах розвитку.

Підсумовуючи всі дані, що отримані нами по вадам серця ембріона курки після впливу гіпоксією та гіпертермією в різні періоди ембріогенезу, ми дійшли висновку, що найуразливішою ланкою кардіогенезу є процес септації та формування судин і клапанного апарату серця. Вплив зазначеними чинниками у період, що передує септації, призводить до формування широкого спектру вад розвитку серця і може вважатися термінаційним періодом кардіогенезу. Цей період відповідає 68-72 годині інкубації (19 стадія за стандартною системою HH).

Аби виявити ступінь впливу гіпоксії і гіпертермії на клітинному та тканинному рівні ми використовували імуногістохімічні маркери для визначення співвідношень проліферації та апоптозу в нормі, а також в моделях експерименту. На ембріонах щура були проведені більш детальні дослідження гістогенетичних процесів з використанням імуногістохімічних маркерів – моноклональних антитіл. Нами реалізувалася задача проведення порівняльного аналізу експресії антиапоптотичного білка bcl-2 та маркеру проліферації клітин Ki-67, що надало змогу вірно трактувати напрямок основних гістогенетичних процесів, які відбуваються в ембріональному серці. У ранніх ембріонів (11-12 доба розвитку), які пережили вплив гіпоксії або гіпертермії спостерігали зміну товщини стінок серцевих камер, особливо помітно зі сторони шлуночків. Це було пов'язано як з зсувом проліферації, так із загальним розширенням камер серця.

Дослідження гістогенетичних процесів показало, що кількість апоптотичних клітин після злиття атріоventрикулярних подушок за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж в експерименті. Апоптотичні клітини були добре помітні при використанні маркеру апоптозу bcl-2, система візуалізації якого забарвлювала апоптотичні клітини у коричневий колір. Істотне зменшення інтенсивності апоптотичних процесів в різних відділах раннього ембріонального серця безумовно має значення у формоутворенні вад серця після використаних тератогенів, але в нашому дослідженні постійно зустрічалися ділянки (наприклад, в стінках крупних судин серця, міжшлуночкової перегородці), де виразність апоптозів, навпроти, посилювалася або мала

нетипове положення. Це дозволяє припустити, що вплив тератогенів на ініціацію апоптотичної активності не є однозначним.

Поряд зі змінами кількості апоптозів в експериментальних групах, ми спостерігали неоднозначне розміщення проліферативних центрів. Використання ядерного маркера Кі67, що мітить клітини на всіх стадіях мітозу показав, що мітотичний індекс міокарду був підвищений після гіпоксії, в той час як після впливу високими температурами загалом зменшувався, проте локалізація клітин, що поділяються суттєво відрізнялась навіть в рамках одного експерименту та стадії розвитку. Для визначення напрямку основних гістогенетичних процесів у плані порівняння ми розглядали проліферативно-апоптотичний індекс, тобто співвідношення кількості клітин, що розмножуються до апоптотичних клітин по кожному відділку серця кожної групи експериментальних тварин. Результати показали, що проліферативно-апоптотичний індекс після впливу гіпоксії має тенденцію до збільшення як в передсердях так і в шлуночках, а після впливу підвищеною температурою – значно знижений у порівнянні з нормою.

Для дослідження ангиогенезу та васкулогенезу міокарду, що формується, соскоподібних м'язів, сухожилкових струн серця використовували цитоспецифічний маркер CD-34, внутрішнім контролем реакції було накопичення маркера в ендокарді ембріонального серця. Маркер гладенької м'язової мускулатури α -sma дозволив скласти уявлення про ступінь та термін диференціювання стінки первинних судин, що є важливим при трактуванні механізму створення сухожилкових струн і формування компактного міокарду та зміни, які відбуваються після впливу гіпоксії та гіпертермії. Ми спостерігали виражено нерівномірне накопичення маркеру у різних відділах раннього ембріонального серця і його судин в нормі та після впливу тератогенних чинників. В нормі найбільша експресія маркеру α -sma спостерігалась звісно у стінках великих судин серця - аорті та в легеневому стовбурі (+++). Цікавим є той факт, що накопичення цього маркеру також продемонструвало, що напівмісячні заслінки на 17,5 добі розвитку вже мають гладенькі м'язові волокна (++) . Дослідження зрізів у двох взаємно перпендикулярних площинах показало, що заселення ендокардіальних гребенів та напівмісяцевих заслінок великих судин серця гладенькими м'язовими волокнами відбувається не хаотично, а таким чином, що утворюється немовби контрактурні тяжі в основі заслінки. Гістологічне диференціювання напівмісячних заслінок великих судин у часі випереджає формування стулок передсердно-шлуночкових клапанів, де не спостерігалось накопичення маркеру.

Стінка первинного передсердя посідає друге місце у накопиченні цього маркеру так як саме передсердя є за своїм ембріональним походженням розширенням венозного синусу раннього трубчастого серця, тобто передсердя є похідною судини, що і підтверджено імуногістохімічними дослідженнями. У стінці шлуночків даний маркер спостерігався лише в судинах міокарду. Більш

або менш інтенсивне накопичення маркеру лише говорить про ступінь диференціювання стінки даної судини.

Як і слід було очікувати, найбільшого ступеню диференціювання сягають судини компактного міокарду, який на відміну від трабекулярного шару вже не може отримувати кровопостачання з порожнини серця. Експресія маркеру α -sma показала, що гіпоксія не тільки підвищує кількість діючих кровоносних судин, але й призводить до раннього диференціювання стінок судин. В міокарді сердець, які перенесли гіпертермію, кількість судин та їх ступінь диференціювання істотно не відрізнявся від норми. Ці ж самі висновки підтверджує і накопичення маркеру CD34, що є цитоспецифічним маркером ендотелію. В нормі найбільш стрімке збільшення показника відносного об'єму ендотелію в ділянках серця ембріона щура, що оцінювався за накопиченням маркеру CD34, спостерігалось від 16-ї до 19-ї доби пренатального розвитку у компактному та інтратрабекулярному міокарді, цей показник збільшувався у середньому в 3 рази.

Центральною проблемою серцево-судинної біології є питання про те, як клітини реагують на стрес. Імуногістохімічні дослідження проводились також з використанням маркеру HSP, який виявляє здатність клітин до експресії захисних білків. Використання маркеру HSP дозволило відстежити накопичення захисного білкового компоненту у тканинах серця. Підвищення температури призводить до змін експресії генів, що індукуює синтез нових білків з характерними рисами – білків теплового шоку (БТШ), призначення яких – захистити клітинні білки від теплового шоку, що викликаний різким підвищенням температури. Гіпертермія призводить до втрати молекулою білка його специфічної форми та здібності до виконання своїх функцій у клітині. БТШ (HSP), які циркулюють у міжклітинній рідині оточують клітину ззовні, приймають тепловий удар на себе та попереджують руйнування клітинних білків.

Дослідження останніх років показали, що БТШ- HSP здатні захищати клітинні білки і від інших негативних впливів, таких як гіпоксія, хімічні ушкодження та ін. Більш того, занурюючись у клітину, вони захищають її білки навіть у відсутність стресу. До цього часу невідомо стрес-реакція чи індукція генів для деяких членів HSP-сімейства має значення в збереженні міокардіальних клітин під час гіпоксії, ішемії, гіпертермії та ін. Наявність деяких з них (HSP-70) в нормальному безстресовому міокарді ембріону дає підставу вважати, що ці білки приймають активну участь в багатьох основних важливих біохімічних та метаболічних процесах. Вибіркове виділення HSP білків відіграє важливу роль у механізмах кардіозахисту, бо вони приймають участь у адаптаційних реакціях.

Інтенсивність накопичення маркеру HSP в тканинах ембріонального серця щура продемонструвала, що на стадії раннього диференціювання клітин експресія білка майже не відрізняється в експериментах з гіпоксією та гіпертермією. Ми спостерігали досить рівномірне

накопичення цього маркера у всіх структурах ембріонального серця, за винятком ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу та ендокардіальних гребенів КСВ. Відсутність маркера в зазначених ділянках довела, що кардіогель не містить цього білка. На цьому етапі розвитку реакція серцевих тканин на зовнішній вплив відбувається однаково, тому, що активно протікає диференціювання клітин і експресія білка регулюється у вигляді загальної відповіді органу.

На більш пізніх етапах розвитку серця накопичення маркера відрізнялось в експериментах впливу гіпоксією та гіпертермією. Використання маркера HSP в серцях ембріонів 17,5 днів розвитку продемонструвало, що після впливу гіпоксією найбільша кількість шокового білка спостерігається в трабекулярному шарі стінок передсердь та шлуночків, в той час як після впливу гіпертермією інтенсивне накопичення спостерігалось саме в компактному шарі міокарду. В обох випадках стулки передсердно-шлуночкових клапанів, які містять мезенхімні клітини слабо накопичують маркер.

Використовуючи імуногістохімічні маркери ми дослідили перебіг основних гістогенетичних процесів серця ембріона щура в нормі та після впливу фізичними факторами у різні фази розвитку виявили наявність термінаційного періоду кардіогенезу, коли вплив гіпоксією або гіпертермією призводив до порушень балансу апоптоз-проліферація, зсувів у процесах васкулогенезу, що в свою чергу було підставою формування вад розвитку серця. Таким періодом для кардіогенезу щура є 10-11 стадія нормального розвитку. Вплив фізичними факторами саме в цей період неодмінно призводив до формування вад МШП, порушень розвитку МПП та порушень формування стінки серця, судин міокарду і викликав вади розвитку великих судин серця та їх клапанів.

Таким чином, за допомогою імуногістохімічних методів дослідження нами був виявлений момент ембріогенезу, протягом якого вплив гіпоксії чи гіпертермії призводить до порушень основних гістогенетичних механізмів кардіогенезу.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової проблеми, яка полягає у визначенні морфогенетичних механізмів розвитку серця у нормі і при формуванні вад серця, що викликані дією гіпоксії та гіпертермії, визначені термінаційні періоди кардіогенезу, хронологія основних подій в органогенезі серця ембріона курки та щура. Отримані дані є основою для наступних експериментальних і кардіоембріологічних досліджень у галузі морфології та ембріології.

1. У ранньому періоді морфогенезу серця щура і курки виділено такі паралельні етапи формування: закладка міокарду трубчастого серця, утворення ендокардіальних подушок та

епітеліально-мезенхімні трансформації, делямінація міокарду шлуночків і атріовентрикулярного каналу та наступна септації, консолідація базальних частин трабекул та утворення компактного і трабекулярного шарів міокарду шлуночків, що сполучається в часі з розвитком судин серця, формування багат шарової спіральної системи міокарду шлуночків, етап ремоделювання трабекул і утворення соскоподібних м'язів та зростання об'єму компактного міокарду. Після дії гіпоксії і гіпертермії виявлялись порушення процесів делямінації міокарду, внаслідок чого змінювався розвиток структур, що є похідними делямінаційної пластинки: внутрішнього рельєфу шлуночків, клапанного апарату серця.

2. Порушення загального ходу ембріогенезу курки та щура під впливом гіпоксії та гіпертермії виявлялося в першу чергу в затримці ходу ембріогенезу, порушенні згинання ембріону (у курки: 33,6% - після впливу гіпоксією, 31,5% - після впливу гіпертермією; у щура: 47,3% - після впливу гіпоксією, 28,9% - після впливу гіпертермією), а також вадах ембріогенезу: ектопії серця (3,6% - після впливу гіпертермією у ембріона курки; у щура - 3,1% - після впливу гіпоксією, 4,2% - після впливу гіпертермією), килах (2,3% - після впливу гіпоксією, 4,7% - після впливу гіпертермією у ембріона курки; у щура: 5,7% - після впливу гіпоксією, 3,5% - після впливу гіпертермією). Було встановлено достовірне зменшення маси ембріонів при дії фізичних чинників від 12,3% до 16,1% в обох групах тварин. Незважаючи на загальне зниження маси тіла, кардіофетальний індекс при дії гіпоксії був достовірно вищий за норму ($p < 0,05$), але при дії гіпертермії цей індекс мав незначну різницю з нормою.

3. На строк моніторингу вад серця, що відповідає терміну закінчення септації (курки – 7 доба інкубації, у щура - 16 доба ембріогенезу) виникали дефекти перегородок серця у ембріона курки: 73,9% дефект МШП після впливу гіпертермією, 43,5% після впливу гіпоксією; у ембріона щура: 33,4% ДМШП після впливу гіпоксією, та 39,4% після впливу гіпертермією; витончення МШП у ембріонів курки після впливу гіпертермією – 34,5%, у ембріонів щура – 31,5%; потовщення МШП у ембріонів щура під дією гіпоксії – 38,3%. Після впливу гіпоксією спостерігалось збільшення обсягу і кількості функціонуючих судин у ембріонів курки - 27,2% та у ембріонів щура – 32,3%. Після впливу гіпоксією тільки у щура спостерігалась така вада кардіогенезу, як гіперплазія ендотелію (10,4%).

4. Всі структури ембріонального серця, що на ранніх етапах кардіогенезу утримують залишки кардіогелю, в наступних стадіях розвитку підлягають виразним морфогенетичним змінам: приймають участь у формуванні клапанного апарату, трабекулярного шару міокарду, перегородок камер серця. Гіпертермія викликала пригнічення проліферації клітин, порушення формування перегородок та трабекул, а також порушення розподілу кардіального гелю в атріовентрикулярному каналі, шлуночках і конусностовбуровому відділі ембріонального серця. Одним з механізмів тератогенної дії фізичних факторів є ушкодження міжклітинних контактів

ендотелію, що призводить до крововиливів у мезенхімні структури серця та в субепікардіальний простір та порушує ЕМТ, які є підставою для формування клапанного апарату. Затримка процесу делямінації міокарду АВК та шлуночків спричиняє формування вад розвитку трабекул і соскоподібних м'язів шлуночків. Вплив гіпоксією на тканини ембріонального серця стимулює проліферативні процеси, що призводить до збільшення кількості діючих судин, потовщення стінок камер серця та гіперплазії ендокарду.

5. Дослідження гістогенетичних процесів за допомогою імуногістохімічних маркерів на ембріонах щурів дозволило на клітинному рівні визначити механізм та термін формування порушень кардіогенезу. Індекс проліферації (використання маркеру Ki67) та накопичення маркеру апоптозу bcl-2, а також співвідношення цих показників свідчать про найвищу активність морфогенетичних перетворень в стінках серця на 9-9,5 добі ембріогенезу (10-11 стадія нормального розвитку щура). Ми визначили загальний напрямок змін гістогенетичних процесів: вплив гіпертермією посилював апоптотичні процеси, а після впливу гіпоксії збільшувалась інтенсивність проліферативних процесів.

6. Вплив гіпоксією та гіпертермією в різні проміжки часу розвитку ембріону визначив наявність термінаційних періодів кардіогенезу, коли спостерігається пряма залежність процесів септації від впливу фізичних факторів. Для серця курячого зародка цей період становить 68-72 годин інкубації, (19 стадія за НН), а для ембріона щура цей термін відповідає 13 стадії ембріогенезу, що відбувається на 11 добі ембріогенезу.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ:

1. Виконане дослідження доповнює існуючі уявлення про нормальний та аномальний морфогенез серця досліджуваних об'єктів, з нових позицій висвітлює механізми кардіогенезу після впливу фізичних тератогенних чинників. Отримані результати можуть бути використані у навчальному процесі на кафедрах нормальної анатомії, гістології та ембріології, а також при подальших анатомічних, ембріологічних і гістологічних дослідженнях.

2. Результати дослідження є підґрунтям для подальшого аналізу клітинних, тканинних та анатомічних перебудов у складі відділів серця, а також при вивченні аномальних процесів розвитку серця. Крім того, отримані дані доповнюють інформаційний блок-еталон нормального розвитку камер, перегородок та клапанів серця, що може бути використаний для вивчення патології формування їх анатомічної структури та гістоархітектури.

3. Одержані дані допоможуть удосконалити ембріологічні методичні підходи до вивчення кардіогенезу як в нормі, так і в експерименті.

4. Результати дослідження дозволяють прогнозувати появу і тип уроджених вад розвитку серця у людини при дії таких факторів, як гіпоксія та гіпертермія, а також інших фізичних факторів, що обумовлюють ушкодження ембріогенезу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Особенности строения клапанного аппарата сердца / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторная, О. С. Зозуля, Г. О. Козловская // Вісник морфології. — 2003. — Т. 9, № 2. — С. 163—165. (Здобувачеві належить ідея дослідження, самостійне проведення дослідження, реферування та аналіз використаних джерел).

2. Козлов В. А. Особенности развития отдельных структур сердца в пренатальном онтогенезе / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. — 2003. — № 3. — С. 82—84. (Здобувачеві належить ідея дослідження, проведення мікродослідження, морфометрія, аналіз та співставлення результатів, підготовка статті до друку).

3. Клінічна анатомія сухожилкових струн серця / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна, В. Г. Дзяк, О. О. Шевченко // Вісник морфології. — 2004 — № 10 (1). — С. 80—83. (Здобувачеві належить ідея дослідження, самостійне проведення дослідження, підготовка статті до друку).

4. Козлов В. О. Формування сухожилкових струн серця людини на ранніх етапах кардіогенезу / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна, О. О. Шевченко // Вісник морфології. — 2004. — № 10 (2). — С. 282—284. (Здобувачеві належить реферування та аналіз використаних джерел, самостійне проведення дослідження, аналіз отриманих результатів).

5. Козлов В. О. Папілярно-трабекулярний апарат серця ембріона людини / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. — 2004. — Вип. 4. — С. 89—91. (Здобувачеві належить ідея дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, проведення дослідження, підготовка статті до друку).

6. Шаторна В. Ф. Гетероморфність будови серцевої стінки на етапах раннього кардіогенезу в філогенезі / В. Ф. Шаторна, С. В. Козлов // Вісник проблем біології і медицини. — 2005. — Вип. 2. — С. 130—136. (Здобувачеві належить аналіз використаних джерел, проведення дослідження, підготовка статті до друку).

7. Шаторная В. Ф. Влияние гипертермии на морфогенез куриных эмбрионов / В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. — 2005. — Вип. 3. — С. 135—140.

8. Шаторна В. Ф. Морфогенетичні закономірності формування передсердно-шлуночкового каналу та перегородок серця на ранніх етапах ембріогенезу / В. Ф. Шаторна, С. В. Козлов // Вісник морфології. — 2005. — № 11 (2). — С. 226—229. (Здобувачеві належить ідея

дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, проведення дослідження, формулювання висновків).

9. Шаторная В. Ф. Влияние гипоксии и гипертермии на морфогенез куриного эмбриона / В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. — 2005. — Вип 4. — С. 156—161.

10. Шаторна В. Ф. Вплив гіпоксії на кардіогенез курячого зародка / В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. — 2006. — Вип 1. — С. 136—142.

11. Клинико-морфологические параллели в развитии сердца в пренатальном онтогенезе / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторная, Л. В. Абдул-Оглы, Е. А. Савенкова // Таврический медико-биологический вестник. — 2006. — Т. 9, № 3, ч. III. — С. 87—90. (Здобувачеві належить ідея дослідження, проведення дослідження, підготовка статті до друку).

12. Шаторна В. Ф. Формоутворення структурних компонентів серця протягом раннього кардіогенезу у ембріонів щурів / В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини — 2007. — Вип. 3. — С. 113—117.

13. Шаторна В. Ф. Ранні етапи розвитку міокарду серця ембріона щура в нормі / В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. — 2007. — Вип. 4. — С. 237—240.

14. Шаторная В. Ф. Влияние гипертермии на морфогенез эмбриона крысы / В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. — 2008. — Вип. 1. — С. 179—181.

15. Шаторна В. Ф. Вплив гіпоксії та гіпертермії на розвиток передсердно-шлуночкових клапанів / В. Ф. Шаторна // Загальна патологія та паталогічна фізіологія. — 2008. — Т. 3, № 1. — С. 39—45.

16. Шаторная В. Ф. Влияние гипертермии на развитие эмбриона и формирование сердца крыс / В. Ф. Шаторная, В. М. Коваль // Вісник проблем біології і медицини. — 2008. — Вип. 2. — С. 160—163. (Здобувачеві належить ідея дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, проведення дослідження, підготовка статті до друку).

17. Шаторна В. Ф. Вплив тератогенних чинників на хід раннього кардіогенезу зародка щура / В. Ф. Шаторна // Таврический медико-биологический вестник. — 2008. — Т. 11, № 3, ч. II. — С. 96—98.

18. Шаторна В. Ф. Використання імуногістохімічних маркерів при дослідженні кардіогенезу щура / В. Ф. Шаторна, І. С. Шпонька // Вісник проблем біології і медицини. — 2008. — Вип. 3. — С. 138—143. (Здобувачеві належить ідея дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, аналіз результатів та підготовка статті до друку).

19. Шаторна В. Ф. Результати впливу гіпоксії та гіпертермії на кардіогенез птахів та ссавців / В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. — 2008. — Вип. 4. — С. 160—164.

20. Шаторна В. Ф. Вияв термінаційних періодів кардіогенезу за допомогою використання імуногістохімічних методів дослідження / В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. — 2009. — Вип. 1. — С. 165—168.

21. Козлов В. О. Формування папілярно-трабекулярного апарату серця в ембріогенезі курей / В. О. Козлов, М. А. Машталір, В. Ф. Шаторна // Український морфологічний альманах. — 2003. — Т. 1, № 2. — С. 39—41. (Здобувачеві належить ідея дослідження, аналіз та співставлення результатів).

22. Машталір М. А. Формування епікарда курячого зародка в нормі і при порушенні кардіогенезу дією етанолу / М. А. Машталір, І. В. Твердохліб, В. Ф. Шаторна // Медичні перспективи. — 2003. — Т. VIII, № 1. — С. 43—46. (Здобувачеві належить ідея дослідження, проведення мікродослідження, морфометрія, фотодокументування).

23. Козлов В. О. Формування клапанного апарату серця в ембріогенезі / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 21—24. (Здобувачеві належить ідея дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, проведення дослідження, підготовка статті до друку).

24. Формоутворення структурних компонентів серця в нормі та при моделюванні вад розвитку / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна, О. О. Савенкова, С. В. Козлов, Г. О. Козловська // Вісник наукових досліджень. — 2006. — № 3 (44). — С. 106—108. (Здобувачеві належить ідея дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, проведення дослідження, підготовка статті до друку).

25. Козлов В. О. Нормальний кардіогенез та вплив деяких тератогенних факторів на розвиток серця / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна, М. А. Машталір // Морфологія : електронний науковий журнал Всеукраїнської громадської організації «Наукове товариство анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України». — 2007. — Т. I, № 1. — С. 7—15. (Здобувачеві належить ідея дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, формулювання висновків).

26. Шаторна В. Ф. Критичні періоди кардіогенезу щура / В. Ф. Шаторна, В. В. Кошарний // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. — 2008. — № 2. — С. 101—104. (Здобувачеві належить ідея дослідження, проведення дослідження, підготовка статті до друку).

27. Патогенетичні аспекти виникнення аномально розташованих сухожилкових струн / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна, М. А. Машталір, С. В. Козлов // Сухожилкові струни серця. — Дніпропетровськ : ПП "Ліра ЛТД", 2006. — С. 44—60. (Здобувачеві належить співавторство розділу монографії).

28. Деклараційний патент на винахід 59108 Україна, МПК А 61 В 5/02. Спосіб визначення перфузійної здатності капілярів міокарда / Твердохліб І. В., Машталір М. А., Сілкiна

Ю. В., Хріпков І. С., Романенко Л. А., Терещенко Н. М., Горелова Н. І., Морозова С. Б., Крамар С. Б., Шаторна В. Ф., Максименко С. В. – № 2003010604 ; заявл. 23.01.2003 ; опубл. 15.08.2003, Бюл. № 8. (Здобувач приймала участь в проведенні аналізу літератури, оформленні заявки, здійснила практичну апробацію).

29. Деклараційний патент на винахід 60078 Україна, МПК А 61 В 5/02. Спосіб визначення енергетичного метаболізму міокарда / Твердохліб І. В., Машталір М. А., Сілкина Ю. В., Хріпков І. С., Романенко Л. А., Терещенко Н. М., Горелова Н. І., Морозова С. Б., Маср Г. О., Крамар С. Б., Шаторна В. Ф. – № 2003010603 ; заявл. 23.01.2003 ; опубл. 15.09.2003, Бюл. № 9. (Здобувач приймала участь в проведенні аналізу літератури, оформленні заявки, здійснила практичну апробацію).

30. Свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 27967. Морфогенетичні закономірності формування передсердно-шлуночкового каналу та перегородок серця на ранніх етапах ембріогенезу / В. Ф. Шаторна, С. В. Козлов. – Заявл. 26.12.2008 р. ; Опубл. 11.03.2009 р.

31. Козлов В. А. Развитие сердца в пренатальном онтогенезе / В. А. Козлов, Т. В. Кулемзина, В. Ф. Шаторная // Актуальные проблемы медицины : сб. науч. трудов ; под ред. проф. Н. Г. Дубовской. — Днепропетровск : Наука и образование, 2002. — С. 8—9. (Здобувачу належить ідея дослідження, самостійне проведення макромікродослідження, підготовка статті до друку).

32. Козлов В. О. Морфогенез клапанного апарату серця / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики : наук.-практ. конф. морфологів, 19–20 вересня 2003 р. : зб. наук. статей. — Запоріжжя : В-во ЗДМУ, 2003. — Вип. ІХ. — С. 251—256. (Здобувачеві належить ідея та проведення дослідження, аналіз та співставлення результатів, підготовка статті до друку).

33. Морфогенез зовнішньої та внутрішньої будови серця протягом філо- та онтогенезу / В. О. Козлов, С. Б. Крамар, В. Ф. Шаторна, Л. В. Абдул-Огли, Д. І. Назарова, О. О. Шевченко, Т. Стріжельчик // Карповські читання : І наукова конференція, 18–21 травня 2004 р. : тези доп. — Дніпропетровськ, 2004. — С. 26—30. (Здобувачеві належить ідея дослідження, проведення дослідження, реферування та аналіз використаних джерел).

34. Козлов В. А. Развитие отдельных структур сердца в раннем пренатальном онтогенезе / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторная, Е. А. Шевченко // Актуальні питання клінічної анатомії та оперативної хірургії : Всеукраїнська наукова конференція, 11–13 жовтня 2004 р. : тези доп. — Чернівці, 2004. — С. 69. (Здобувачеві належить ідея дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, проведення дослідження, підготовка статті до друку).

35. Шаторна В. Ф. Формування папілярно-трабекулярного апарату серця в ранньому ембріогенезі людини / В. Ф. Шаторна // Карповські читання : II Всеукраїнська морфологічна наук. конф., 12–15 квітня 2005 р. : тези доп. — Дніпропетровськ : "Пороги", 2005. — С. 75—77.

36. Шаторна В. Ф. Гіпоксія як тератогенний фактор кардіогенезу курки / В. Ф. Шаторна // Карповські читання : III Всеукраїнська морфологічна наук. конф., 11–14 квітня 2006 р. : зб. наук. робіт. — Дніпропетровськ : "Пороги", 2006. — С. 74—75.

37. Шаторна В. Ф. Вплив гіпоксії на кардіогенез курячого зародка на ранніх етапах ембріогенезу / В. Ф. Шаторна, Л. В. Абдул-Огли // Всеукраїнський медичний журнал молодих вчених «Хист». — 2006. Вип. 8. — С. 239. (Здобувачеві належить ідея дослідження, реферування та аналіз використаних джерел, проведення дослідження, формулювання висновків).

38. Шаторна В. Ф. Морфогенетичні зміни протягом раннього кардіогенезу в серцях ембріонів щурів / В. Ф. Шаторна // Досвід і проблеми застосування сучасних морфологічних методів досліджень органів і тканин у нормі та при діагностиці патологічних процесів : наук.-практ. конф., 24–25 травня 2007 р. : зб. матеріалів конф. — Тернопіль : Укрмедкнига, 2007. — С. 89—91.

39. Шаторная В. Ф. Влияние гипертермии на ход эмбриогенеза крысы / В. Ф. Шаторная // Сучасні проблеми патологічної анатомії : VIII міжнародний конгрес патологів України 21-23 травня 2008 р.: тези доп. — Полтава, 2008. — С. 47.

40. Шаторна В. Ф. Вплив гіпоксії та гіпертермії на розвиток камер зародків щура / В. Ф. Шаторна // Морфологічні основи компенсаторно-приспосувальних процесів і їх структурне забезпечення: наук.-практ. конф., 10-11 жовтня 2008 р. : матеріали конф. — Тернопіль : Укрмедкнига, 2008. — С. 64—65.

АНОТАЦІЯ

Шаторна В.Ф. Морфогенетичні закономірності ембріонального розвитку серця. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 14.03.01 – нормальна анатомія. – Державний вищий навчальний заклад "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського" МОЗ України, Тернопіль, 2009.

Дисертація присвячена з'ясуванню механізмів морфогенезу вад розвитку серця, обумовлених дією гіпоксії та гіпертермії. Вивчені терміни формування вад серця під впливом гіпоксії або гіпертермії, та морфологічні перебудови, що призводять до формування вад розвитку серця в експериментальних моделях. Кількісно оцінені структурні зміни в різних відділах ембріонального серця: передсердях, шлуночках, атріовентрикулярному каналі, передсердно-шлуночкових клапанах, міжпередсердній та міжшлуночкової перегородках, конусностовбуровому відділі та клапанах великих судин серця (аорта та легеневий стовбур). Для виявлення змін в ході базових гістогенетичних процесів використано імуногістохімічні маркери. Накопичення маркерів

проліферації Ki-67 та апоптозу bcl-2 дало можливість співставити процеси проліферація-апоптоз в нормі та виявити зміни в моделях експериментів. Накопичення маркера стресового білка HSP дозволило відстежити продукцію захисного білкового компоненту у тканинах серця після впливу гіпоксією та гіпертермією. Виявлення CD 34-маркеру ендотелію та маркеру - α -sma, що є маркером гладенької м'язової тканини, дало можливість не тільки визначити основні терміни та етапи васкулогенезу, але й дозволило відстежити диференціювання первинних судин серця, що розвивається у процесі кардіогенезу. Вплив тератогенами в різні проміжки часу визначив наявність термінаційних періодів кардіогенезу, коли спостерігається пряма залежність процесів септації від впливу фізичних факторів. Для серця курячого зародка цей період становить 68-72 годин інкубації, (19 стадія за НН), а для ембріона щура цей термін становить 11 добу розвитку, що відповідає 13 стадії ембріогенезу.

Ключові слова: серце, кардіогенез, серцеві вади, гіпоксія, гіпертермія.

АННОТАЦІЯ

Шаторная В.Ф. Морфогенетические закономерности эмбрионального развития сердца. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.01 – нормальная анатомия. – Государственное высшее учебное заведение "Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского" МЗ Украины, Тернополь, 2009.

Диссертация посвящена выяснению механизмов морфогенеза пороков развития сердца, обусловленных действием гипоксии и гипертермии. Проведены исследования на экспериментальных моделях эмбрионов крыс и птиц после воздействия высокими температурами или гипоксией. Исследуя морфогенетические закономерности раннего эмбрионального сердца крысы и курицы мы выделили параллельные этапы формирования сердечной стенки: закладка миокарда трубчатого сердца, образование эндокардиальных подушек и эпителиально-мезенхимные трансформации, деляминация миокарда желудочков и атриовентрикулярного канала, последующая септация и трабекуляция, консолидация базальных частей трабекул, образование компактного и трабекулярного слоев, что совпадает во времени с развитием сосудов сердца, формирование многослойной спиральной системы миокарда желудочков, этап ремоделирования трабекул и формирования сосцевидных мышц, увеличение объема компактного миокарда.

Среди пороков сердца наблюдались дефекты перегородок сердца у эмбриона курицы: 73,9% дефект межжелудочковой перегородки после воздействия гипертермией, 43,5% после

воздействия гипоксией; у эмбриона крысы: 33,4% дефект межжелудочковой перегородки после воздействия гипоксией и 39,4% после воздействия гипертермией; истончение МЖП после воздействия гипертермией 34,5% у эмбрионов крысы, утолщение МЖП под влиянием гипоксии – 38,3%. После воздействия гипоксией только у крысы наблюдалась гиперплазия эндотелия (10,4%).

Гипертермия вызывала угнетение пролиферации клеток, нарушение формирования перегородок и трабекул, а также распределения кардиального геля в атриовентрикулярном канале, желудочках и конусостоловом отделе эмбрионального сердца. Одним из механизмов тератогенного влияния физических факторов есть нарушение межклеточных контактов эндотелия, что приводит к кровоизлияниям в мезенхимные структуры сердца и в субэпикардальное пространство, а также задержка процесса деляминации миокарда. После воздействия гипоксией наблюдается стимуляция пролиферативных процессов, что приводит к утолщению стенок камер сердца и гиперплазии эндокарда.

Изучены сроки формирования пороков сердца после воздействия гипоксии или гипертермии и морфологические перестройки, которые приводят к формированию пороков развития сердца в экспериментальных моделях. Количественно оценены структурные изменения в разных отделах эмбрионального сердца: предсердиях, желудочках, атриовентрикулярном канале, предсердно-желудочковых клапанах, межпредсердной и межжелудочковой перегородках, конусостоловом отделе и клапанах больших сосудов сердца (аорта и легочной ствол). Для выявления нарушений в ходе базовых гистогенетических процессов использовали иммуногистохимические маркеры. Накопление маркеров пролиферации Ki-67 и апоптоза bcl-2 дало возможность сопоставить процессы пролиферация-апоптоз в норме и выявить изменения в моделях экспериментов. Накопление маркера стрессового белка HSP позволило отследить формирование защитной реакции белкового компонента в тканях сердца после воздействия гипоксией или гипертермией. Выявление процессов васкулогенеза или его нарушения стало возможным благодаря CD 34-маркеру эндотелия и маркера - α -sma, который является маркером гладкой мышечной ткани. Использование именно этих маркеров дало возможность не только определить основные этапы васкулогенеза в раннем эмбриональном сердце, но и позволило отследить дифференциацию первичных сосудов развивающегося сердца на протяжении кардиогенеза. Влияние тератогенами в разные промежутки времени определило наличие терминационных периодов кардиогенеза, когда существует прямая зависимость процессов септации сердца от воздействия физических факторов. Для сердца куриного эмбриона этот период составляет 68-72 часов инкубации, (19 стадия по НН), а для эмбриона крысы этот период составляет 11 сутки развития, что соответствует 13 стадии эмбриогенеза.

Ключевые слова: сердце, кардиогенез, пороки сердца, гипоксия, гипертермия.

ANNOTATION

Shatorna V.F. The morphogenetic laws of the embryogenesis heart development. – Manuscript.

Dissertation on competition of a scientific degree of Doctor of Biological Sciences on a speciality 14.03.01 – normal anatomy. – The State Higher Educational Establishment „Ternopil State Medical University named by I.Ya. Horbachevsky” of Ukraine’s MPH, Ternopil, 2009.

The dissertation is devoted to the problem of morphogenesis mechanisms of the developmental anomalies of heart caused by hypoxia and hyperthermia action finding-out. The terms of formation of heart diseases under the influence of hypoxia or hyperthermia and morphological reorganizations which lead to formation of developmental anomalies of heart were studied in experimental models. Structural changes in different heart part during the embryogenesis are quantitatively estimated: auricles, ventricles, atrio-ventricularis the channel, atrio-ventricularis valves, interatrial and interventricular partitions, conotruncal department and valves of the big vessels of heart (an aorta and a pulmonary trunk). For revealing of infringements during base hystohgenesis processes were used imunohystochemical markers. The accumulation of proliferation markers Ki-67 and apoptosis bcl-2 gave the chance to compare proliferation-apoptosis processes in norm and to reveal changes in models of experiments. The accumulation of a marker of stressful fiber HSP allowed to trace the formation of protective reaction of an albuminous component in fabrics of heart after it was influenced by hypoxia or hyperthermia. Revealing of terms and process stages vasculogenesis or its infringements became possible thanks to CD to a 34-marker endothelia and a marker – α -sma which is a marker of a smooth muscular fabric. The teratogen influence in different embryogenesis intervals has defined the terminal period’s presence in cardiogenesis when direct dependence of septachion processes from influence of physical factors is observed. For the chicken embryo's heart this period takes 68-72 incubation hours, (19 stage on HH), and for an embryo of a rat this period makes 11 days of development that there correspond 13th embryogenesis stage.

Keywords: heart, cardiogenesis, heart defects, hypoxia, hyperthermia.