

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

На правах рукопису

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

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеню
доктора біологічних наук

Науковий консультант:

Козлов Володимир Олексійович

заслужений діяч науки і техніки України,
доктор медичних наук, професор

Дніпропетровськ – 2009

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень	3
Вступ	4
Розділ I. Огляд літератури	11
1.1. Вплив гіпертермії на хід ембріонального розвитку	16
1.2. Вплив гіпоксії на хід ембріонального розвитку	26
1.3 Використання імуногістохімічних маркерів для визначення впливу тератогенів на хід ембріонального розвитку	40
Розділ 2. Матеріал та методи дослідження	49
2.1. Матеріал дослідження	50
2.2. Методи дослідження	53
2.2.1. Методи моделювання	53
2.2.2. Морфологічні методики	55
2.2.3. Імуногістохімічні методи дослідження	57
Розділ 3. Вплив гіпертермії на морфогенез курячого зародка	64
3.1. Вплив гіпертермії на кількісні показники розвитку	64
3.2. Вплив гіпертермії на морфогенез ембріона	68
3.3. Вплив гіпертермії на кардіогенез курячого зародка	76
Розділ 4. Вплив гіпоксії на морфогенез курячого зародка	109
4.1. Вплив гіпоксії на кількісні показники розвитку	109
4.2. Вплив гіпоксії на морфогенез ембріона	113
4.3. Вплив гіпоксії на кардіогенез курячого зародка	115
Розділ 5. Вплив гіпертермії на морфогенез зародка щура	137
5.1. Вплив гіпертермії на кількісні показники розвитку	137
5.2. Вплив гіпертермії на морфогенез ембріона	138
5.3. Вплив гіпертермії на кардіогенез зародка щура	141
Розділ 6. Вплив гіпоксії на морфогенез зародка щура	165

6.1. Вплив гіпоксії на кількісні показники розвитку	165
6.2. Вплив гіпоксії на морфогенез ембріона	167
6.3. Вплив гіпоксії на кардіогенез зародка щура	170
Розділ 7. Аналіз та узагальнення отриманих результатів	187
7.1. Виявлення термінаційних періодів кардіогенезу у ембріонів курки та щура	187
7.2 Дослідження критичних періодів в кардіогенезі щура за допомогою методів імуногістохімії	203
Висновки та практичні рекомендації	218
Список використаних джерел	222
Додатки	257

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AB	атріовентрикулярний
ABK	атріовентрикулярний канал
БТШ	білок теплового шоку (HSP)
HSP	heath shock protein
ДМШП	дефект міжшлуночкової перегородки
ЕМТ	епітеліально-мезенхімні трансформації
ЕП	ендокардіальні подушки
КСВ	конусно-стовбуровий відділ
ЛП	ліве передсердя
ЛШ	лівий шлуночок
МПП	міжпередсердна перегородка
МШП	міжшлуночкова перегородка
НН	стадія ембріогенезу курки за Hamburger, Hamilton
ПП	праве передсердя
ПШ	правий шлуночок

ВСТУП

Актуальність роботи. Протягом останніх десятиріч в умовах посилення негативного впливу екологічного оточення, посилення стресових факторів на організм людини суттєво виріс інтерес спеціалістів практично всіх підрозділів медицини та біології до адаптаційних можливостей серцево-судинної системи та проблем виникнення вад розвитку у відповідь на негативний вплив [12, 25, 33, 27]. В цьому аспекті набуває значення медична ембріологія і порівняльна ембріологія та їх методи дослідження [52, 67, 97, 295]. Об'єктом інтересу стають зміни в навколишньому середовищі, що виникають під впливом антропогенних факторів та можуть провокувати порушення розвитку [72, 152, 171]. 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.

Зниження числа набутих вад серця призводить до актуалізації термінів і механізмів формування уроджених вад на етапах кардіогенезу під впливом різних чинників [28, 64, 261]. Серед цих факторів досить часто зустрічаються такі як гіпертермія та гіпоксія, але дослідження впливу зазначених факторів стосуються в основному фізіологічних зсувів, різноманітності викликаних порушень і не виявляють механізму утворення аномалії [249, 290, 298].

Безпосереднє спостереження за розвитком вад у людини неможливо, тому за допомогою індукованих експериментальних моделей стає можливим аналіз морфогенетичних змін у серці при формуванні вад розвитку серця, пов'язаних з дією фізичних факторів зовнішнього середовища: дефектів будови камер та перегородок, вад розвитку магістральних судин серця та інших серцевих вад [67, 169, 163]. При проведенні ембріологічних досліджень збільшується роль моделювання вад розвитку серця на ранніх етапах ембріогенезу, коли сам ембріон представляє собою досить нестабільну систему [42, 49, 61, 63, 71]. Виявлення причин та механізму утворення

аномалії розвитку серця в цілому, або його компонентів та великих судин під впливом високих температур або гіпоксії дозволить розробити модель виникнення вади розвитку серця. В експериментальних моделях, що використовували останнім часом був встановлений тісний зв'язок між строками впливу тератогенів та спектром і тяжкістю вад розвитку серця [251, 253, 265]. Такі періоди, для яких характерна підвищена чутливість до дії ушкоджувальних чинників, називають «критичними періодами ембріогенезу». Вірогідність формування відхилень в розвитку в критичні періоди найбільш висока. 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 і тканин. В доступній науковій літературі ми не зустріли визначених термінаційних періодів кардіогенезу для гіпоксії та гіпертермії, а тільки перелік вад серця та великих магістральних судин, що формуються в експериментальних моделях з використанням зазначених чинників [314, 305, 306].

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

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Тема дисертації і основні напрямки її виконання обговорені та затверджені Проблемною комісією МОЗ і АМН України «Морфологія людини» (протокол № 66 від 24 травня 2005р.) і Вченою радою Дніпропетровської державної медичної академії (протокол № 10 від 15 травня 2005 року). 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). Дисертантка вивчала закономірності формоутворення та

розвитку структурних компонентів камер, клапанного апарату та магістральних судин серця і є виконавцем складової частини вказаної науково-дослідної роботи стосовно аномального кардіогенезу.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є з'ясування етапів морфогенезу серця в нормі і механізмів вад розвитку, обумовлених дією гіпоксії і гіпертермії та виявлення термінаційних періодів кардіогенезу.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі **завдання**:

1. Вивчити морфогенетичні зміни, що відбуваються в серці зародків курки, щура на ранніх стадіях кардіогенезу, в період септації у нормі та після впливу гіпоксії і гіпертермії.

2. Встановити спектр вад серця у курячих та щурячих зародків після впливу фізичних чинників (гіпоксія, гіпертермія) на стадіях розвитку, що відповідають закінченню септації серця.

3. Визначити механізми нормального та аномального розвитку серця після впливу тератогенів у ембріонів птахів і ссавців.

4. Провести зіставлення механізмів нормального та аномального морфогенезу серця експериментальних тварин.

5. Виявити термінаційні періоди впливу гіпоксії та гіпертермії на хід розвитку серця протягом ембріогенезу.

Об'єкт дослідження – морфо- та гістогенетичні механізми нормального та аномального розвитку серця.

Предмет дослідження – серце ембріона щура та курки у нормі та після дії гіпоксії та гіпертермії на етапах кардіогенезу.

Методи дослідження: анатомічні – для макроскопічного дослідження серця та дослідження зовнішньої будови серця 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 і інтерпретації отриманих результатів.

Наукова новизна. Вперше співставлені етапи розвитку серця птахів та щурів на ранніх етапах кардіогенезу та розроблені нормограми паралельності етапів розвитку, запропонована модель управління морфогенетичними перетвореннями серця.

Вперше визначено термінаційні періоди кардіогенезу, протягом яких вплив тератогенних чинників призводить до кардинальних змін в розвитку серця та формування вад розвитку. Визначені морфологічні феномени, що свідчать про вплив на хід ембріогенезу і кардіогенезу у моделях аномального тератогенезу з використанням гіпертермії та гіпоксії. За допомогою гістологічних та імуногістохімічних досліджень вивчені та структурно описані 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 (АВК), конусно-стовбуровому відділі (КСВ) 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 областей серця, відповідальних за формування вад: КСВ, його перегородок, атріовентрикулярних (АВ) подушок, міжпередсердної (МПП) і міжшлуночкової (МШП) 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 ми можемо прогнозувати. Дані про механізми формування вад є також важливою умовою для розробки основ профілактичних і коригуючих заходів у акушерсько-гінекологічній практиці у тому випадку, якщо в пренатальному періоді відбувався вплив певного тератогенного фактора (гіпоксії або гіпертермії).

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

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно виконаний патентно-інформаційний пошук, визначені мета та задачі дослідження. Аналіз наукової літератури, забір матеріалу, всі морфологічні дослідження, морфометричний та статистичний аналіз, тривимірне моделювання, розділи дисертаційної роботи, їх обговорення та узагальнення, формулювання висновків та оформлення дисертації виконані автором самостійно. Основною є участь автора в підготуванні статей до опублікування, а також наукових розробок для оформлення деклараційних патентів України (у співавторстві). В

актах впровадження наводяться дані, що особисто отримані автором у процесі виконання роботи. Автором не були використані результати виконаної нею кандидатської дисертації та ідеї співавторів публікацій.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження доповідались на III Національному конгресі анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України (Київ, 2002р.), міжнародній конференції “Саміт нормальних анатомів України та Росії (Тернопіль, 2003р.), науково-практичній конференції морфологів «Роль імунної, ендокринної та нервової систем у процесах морфогенезу та регенерації» (Запоріжжя, 2003р.), Всеукраїнській науковій конференції «Актуальні питання клінічної анатомії та оперативної хірургії» (Чернівці, 2004р.), на засіданнях Дніпропетровського обласного відділення Товариства АГЕТ України (2004р., 2005р., 2006р.), на I, II та III Всеукраїнських наукових морфологічних конференціях “Карповські читання” (Дніпропетровськ, 2005р., 2006р., 2007р.), науково-практичній конференції „Морфологічний стан тканин і органів у нормі та при моделюванні патологічних процесів” (Тернопіль, 2006р.), IV Національному конгресі АГЕТ України (Сімферополь, 2006р.), науково-практичній конференції «Досвід і проблеми застосування сучасних морфологічних методів досліджень органів і тканин у нормі та при діагностиці патологічних процесів» (Тернопіль, 2007р.), VIII міжнародного конгресу патологів України «Сучасні проблеми патологічної анатомії» (Полтава, 2008р.), науково-практичній конференції «Морфологічні основи компенсаторно-приспосувальних процесів і їх структурне забезпечення» (Тернопіль, 2008р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 40 наукових праць. Автору належать два розділи у монографії (у співавторстві), 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 опубліковано у матеріалах наукових конгресів і конференцій. За результатами

дисертаційної роботи отримано 2 деклараційних патенти України на винахід (№60078 А, №59108 А) та авторське свідоцтво на твір (№ 27967).

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Серцево-судинні захворювання складають один з головних розділів патології дитячого віку та призводять до інвалідизації та смертності. Зниження питомої ваги таких хвороб як ревматизм спричинило зниження числа придбаних вад серця, але більш актуальними стають терміни і механізми формування уроджених вад серця, особливо на етапах раннього кардіогенезу [33, 75, 81, 99]. За останні десятиріччя виникли нові якісні зміни в розвитку методів хірургічного лікування раніше неоперабельних дітей, особливо новонароджених та дітей грудного віку, у зв'язку з чим потреби медичної галузі вимагають досконалого розуміння особливостей і закономірностей як нормального розвитку органа так і формування можливих вад [1, 2, 3, 4, 9, 37, 114, 315].

Медична ембріологія як складова частина загальної біології досліджує особливості розвитку різних систем організму, що розвивається в умовах довкілля, що змінюється [89, 102, 103, 123, 124]. При цьому зміни в навколишньому середовищі виникають під впливом антропогенних факторів [141, 160, 161, 162, 172]. 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 [32, 72, 79, 80]. В цьому аспекті набуває значення медична ембріологія і порівняльна ембріологія та їх методи дослідження [92, 97, 98, 107, 108, 295, 302]. Результати порівняльно-анатомічних та порівняльно-ембріологічних досліджень мають теоретичне (вияв шляхів та механізмів еволюції) та практичне (вибір експериментальних тварин для вірної інтерпретації даних та їх екстраполяції на організм людини) значення [41, 52, 53, 54, 60, 82, 140]. Розробка методів експериментальних моделей уроджених вад серця та магістральних судин завжди привертала увагу дослідників [51, 144, 157, 311, 312, 316]. Такі експерименти проводилися з використанням

інструментальних методів на серцях дорослих тварин. Всі ці методи можна об'єднати як методи утворення штучних дефектів перегородок передсердь та шлуночків, стенозу крупних судин, вад клапанного апарату та порушень кровообігу самого серця [111, 113, 150, 153]. Дані експериментальні роботи наглядно демонстрували наявності того чи іншого порушення в роботі серця або судинної системи та не давали ніякої уяви про причину або механізм виникнення тої чи іншої вади серця [16, 32, 85, 86, 109, 158].

В науковій літературі зустрічалися відомості щодо експериментального формування окремих вад розвитку серця [33, 47, 66, 68, 69, 72, 134, 173]. Цікавими в цій галузі виглядають моделі утворення штучних вад серцевих перегородок та клапанів серця і магістральних судин інструментальними методами в роботах Кір'якулова Г.С., але ці роботи проводилися в більшій мірі на серцях дорослих експериментальних тварин [33, 94]. Треба зауважити, що такий важний розділ як моделювання уродженої патології міжшлуночкової перетинки, спільного передсердя та інших складних вад розвитку майже зовсім не отримав відображення в вітчизняній літературі. Незначна кількість сучасних вітчизняних робіт по формуванню уроджених вад серця протягом пренатального онтогенезу під впливом дії ряду речовин, таких як вітаміни, етанол, тощо, зустрічалася нами у незначній кількості [28, 62, 63, 64, 119, 121, 126, 135], але моделей формування уроджених вад серця під впливом фізичних чинників у вітчизняній літературі нами не було знайдено зовсім.

Пошкоджуваність і смертність ембріонів неоднозначні протягом усього періоду розвитку. Існують критичні періоди – нетривалі часові ділянки в розвитку, у які зародок більше сприйнятливий до дії тих або інших агентів. В такі періоди структури, що розвиваються, значно більш чутливі не тільки до внутрішніх сигналів, але й також до дії різного роду зовнішніх факторів, які можуть порушити нормальний морфогенез. Підйом чутливості клітин у ці періоди пов'язаний зі зниженням репаративної здатності. Тобто, критичні періоди розвитку - це періоди детермінації, у плінні яких відбуваються висока пошкоджуваність і знижена регуляторна діяльність. По гіпотезі критичних

періодів розвитку організму П.Г.Светлова існує три групи впливів зовнішнього середовища на ембріон: 1) впливи, що ушкоджують, що призводять до смерті або викликають патологічні зміни; 2) впливи, що модифікують (які визивають відхилення від норми); 3) впливи, що відображають закономірну дію середовища (наявність кисню, температури, харчування й т.д.). Саме ці закономірні впливи становлять найбільший інтерес для ембріології, як ті, що забезпечують норму розвитку [76].

Таким чином, змінюючи фактори закономірної дії можна змінити сам процес розвитку, але в різні періоди онтогенезу тератоген може викликати неоднакові ефекти. Тому зрозуміло, що дане питання має не тільки загальнобіологічне, але й прикладне медичне значення критичних періодів як найбільш небезпечних моментів пренатального розвитку організму. Експерименти з впливом на дорослих самок щурів фізичними факторами (рентген-випромінювання, гіпертермія, гіпоксія та ін..) та різного роду хімічними речовинами довели, що дози ушкоджуючого агента не перешкоджають процесам дозрівання гамет та їх здатності до запліднення, але значно змінюють хід наступного ембріогенезу, збільшуючи смертність [219, 254, 278, 308]. При цьому як у випадках з опроміненням так і у випадках з дією хімічних речовин, ушкодження жіночих гамет впливає на ембріогенез сильніше ніж чоловічих. Результати таких робіт доводять, важливим критичним періодом є прогенез, який випереджує ембріогенез [127, 139, 290, 305].

Для різних агентів і навіть для різних доз одного й того ж агента термін впливу та час впливу доволі різні, що пов'язано з різними механізмами їх дії. Однак найбільша кількість аномалій виникає в самий ранній період закладки та формування органу. Після цього періоду, тобто в плодовому періоді значні анатомічні дефекти вже не виникають. Вплив тератогенних факторів у пізньому ембріональному періоді може давати наслідки у вигляді незначних анатомічних аномалій: полідактилія, аномалії вушної раковини та ін., а також

у порушенні діяльності окремих органів, які визначаються вже після народження [133, 70, 67, 62, 74, 165, 180].

В розвитку ссавців чітко визначаються два основних піка чутливості до тератогенів, які співпадають з імплантацією та плацентацією. Але ризик ушкодження зародка зберігається і після цих важливих моментів розвитку, бо лишаються надмірно чутливі до впливу різних хімічних та фізичних агентів періоди гістогенезу та диференціювання клітин, етапи утворення органів.

Виявлення критичних періодів для формування серця ембріона дозволить визначити ті етапи кардіогенезу, у які вплив зовнішніх факторів призводить до формування аномалій розвитку серця. Одним з факторів, що впливають на ембріогенез, безумовно, є вміст кисню в середовищі, що оточує ембріон. Цей агент, поряд з температурою, здатний визначати подальший розвиток зародка. У відношенні цих необхідних умов можна говорити про мінімум, максимум і оптимум, значення яких для ембріона в різні періоди розвитку буде різним. Важливе місце тут займають питання вивчення патогенезу аномалій розвитку серця й великих судин, а також вироблення прогнозу розвитку серця на ранніх етапах кардіогенезу як у нормі так і при патології.

Експериментальне моделювання припускає широкий взаємозв'язок з іншими методами, інтеграцію з ними, перехід від моделювання та теоретичного міркування у створенні адекватної моделі до отримання чіткого механізму та терміну формування вади розвитку [73, 74, 93, 113, 139, 155, 177]. Дослідники-анатоми використовують відому класифікацію вроджених вад серця: аномалії положення серця (ектопія, декстракордія); аномалії кровопостачання серця; аномалії провідної системи; аномалії перегородок серця (дефекти міжпередсердної перегородки, дефекти міжшлуночкової перегородки); аномалії клапанів; аномалії відходження аорти, легеневого стовбуру та великих кровоносних судин.

Українськими анатомами-дослідниками проводилося моделювання вад серця за наступними нозологічними одиницями: дефект міжшлуночкової

перегородки, дефект міжпередсердної перегородки, коарктація аорти, застійна недостатність кровообігу [31]. Формування вад здійснювалося методом штучного моделювання інструментальними способами на серцях собак з наступним спостереженням і секцією з метою відтворення вроджених і придбаних вад. Накопичений кардіохірургами досвід вимагає експериментального підтвердження цілого ряду положень, що й спричинило розробку методів експериментального звуження аорти, моделювання дефекту міжшлуночкової і міжпередсердної перегородок і інших [12, 16, 33, 38, 53, 56, 71].

У доступній нам науковій літературі зустрічається велика кількість робіт, присвячених окремо вивченню морфометричних показників серця, динаміці їх змін в онтогенезі, і лише незначна кількість робіт останніх років, що стосуються ембріогенезу серця [27, 40, 44, 47]. При проведенні ембріологічних досліджень збільшується роль моделювання вад розвитку серця на ранніх етапах ембріогенезу [42, 49, 61, 63, 71]. Виявлення причин та механізму утворення аномалії розвитку серця в цілому, або його компонентів та великих магістральних судин під впливом різних чинників 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 [62, 64, 65, 67, 119, 121, 126, 130].

Опанування методами експериментальної ембріології дозволять виявити причини та терміни утворення природжених вад серця.[10, 11, 128, 156, 179] Тому у теперішній час посилюється значення морфологічних досліджень для пренатальної діагностики вад серця у людини [197, 200, 201, 202, 203], але безпосереднє спостереження за розвитком вад у людини неможливо. Проте за допомогою індукованих експериментальних моделей стає можливим аналіз морфогенетичних змін у серці при формуванні його вад розвитку, пов'язаних з дією фізичних факторів зовнішнього середовища: дефекту міжшлуночкової перегородки (ДМШП) [67, 169, 163, 246], декстрапозиції аорти та вад розвитку

великих судин (аорти та легеневого стовбуру) [188, 222, 232] серця та інших серцевих вад [253, 276, 287, 288, 289, 296, 297].

Недостатньо повно у вітчизняній та світовій науковій літературі освітлені дослідження термінів та механізму формування вроджених вад серця під дією фізичних чинників на етапах раннього кардіогенезу. В літературних джерелах не зустріли ми і порівняльних аспектів формоутворюючих процесів ембріонального серця різних видів тварин.

1.1. Вплив гіпертермії на хід ембріонального розвитку

Одним з тератогенних факторів який найчастіше зустрічається в експериментальній ембріології, є гіпертермія - вплив підвищеної температури на організм, що розвивається.

Фундаментальні процеси обміну речовин в живому організмі протікають в складній, динамічній обстановці природного місця існування, знаходяться під постійною дією комплексу її чинників. Підтримка стійкого обміну речовин в умовах зовнішнього середовища, що змінюються, неможлива без спеціальних адаптацій. Адаптації до чинників середовища можуть ґрунтуватися на структурних особливостях організму — морфологічні адаптації — або на специфічних формах функціональної відповіді на зовнішні дії — фізіологічні адаптації. У вищих тварин важливу роль в адаптації грає вища нервова діяльність і серцево-судинна система [12, 96, 98, 107, 108, 152].

Теплота — основа кінетики хімічних реакцій, з яких складається життєдіяльність організму. Тому температурні умови виявляються одним з найважливіших екологічних чинників, що впливають на інтенсивність обмінних процесів. Температура належить до постійних чинників, що діють; кількісний її вираз характеризується широкими географічними, сезонними і добовими відмінностями. Так, температура на поверхні піску в пустелі може досягати порядку 60°C, а мінімальні температури повітря в Східному Сибіру 70°C нижчі за нуль. Взагалі діапазон температур від + 50 до -50°C є

фундаментальною характеристикою температурних умов в біосфері, хоча є і відхилення від цих параметрів. Добре виражена різниця температурних режимів по кліматичних зонах — від полярних пустель Арктики і Антарктики з суворою і тривалою зимою і прохолодним коротким літом до екваторіальної області, що відрізняється високими і відносно стійкими температурами. У горах добре виражений вертикальний градієнт температур, залежність температурного режиму від експозиції схилу [96, 98].

Генеральна закономірність дії температури на живі організми виражається дією її на швидкість обмінних процесів. Підвищення температури веде до пропорційного зростання швидкості реакції. У живому організмі хімічні процеси завжди йдуть за участю складних ферментних систем, активність яких залежить від температури. В результаті ферментативного каталізу зростає швидкість біохімічних реакцій і кількісно міняється її залежність від зовнішньої температури.

Мінливість температури спричиняє відповідні зміни швидкості обмінних реакцій. Оскільки динаміка температури тіла пойкилотермних організмів визначається змінами температури середовища, інтенсивність метаболізму також опиняється в прямій залежності від зовнішньої температури. Швидкість споживання кисню, зокрема, при швидких змінах температури слідує за цими змінами, збільшуючись при підвищенні її і зменшуючись при зниженні. Те ж відноситься і до інших фізіологічних функцій: частота серцебиття, інтенсивність травлення і робота інших систем. Принципова відмінність теплообміну гомойотермних (птахи і ссавці) тварин від пойкилотермних полягає в тому, що пристосування до змінних температурних умов середовища засновані у них на функціонуванні комплексу активних регуляторних механізмів підтримки теплового гомеостазу внутрішнього середовища організму. Завдяки цьому біохімічні і фізіологічні процеси завжди протікають в оптимальних температурних умовах [89, 90, 92].

Гомойотермний тип теплообміну базується на високому рівні метаболізму, властивому птахам і ссавцям. Інтенсивність обміну речовин у цих тварин на один-два порядки вище, ніж у всіх інших живих організмів при оптимальній температурі середовища. Високий рівень метаболізму призводить до того, що у гомойотермних тварин в основі теплового балансу лежить використання власної теплопродукції, а значення зовнішнього обігріву відносно невелике. Тому птахів і ссавців відносять до ендотермних організмів. Ендотермія — важлива властивість, завдяки якій істотно знижується залежність життєдіяльності організму від температури зовнішнього середовища. Гомойотермні тварини не тільки забезпечені теплом за рахунок власної теплопродукції, але і здатні активно регулювати його виробництво і витрачання. Завдяки цьому їм властива висока і достатньо стійка температура тіла. У птахів глибинна температура тіла в нормі складає біля 41°C з коливаннями у різних видів від 38 до $43,50^{\circ}\text{C}$. В умовах повного спокою (основний обмін) ці відмінності дещо згладжуються, складаючи від $39,5$ до $43,0^{\circ}\text{C}$. На рівні окремого організму температура тіла показує високий ступінь стійкості: діапазон її добових змін зазвичай не перевищує $2 - 4^{\circ}\text{C}$, причому ці коливання не пов'язані з температурою повітря, а відображають ритм обміну речовин. Навіть у арктичних і антарктичних видів при температурі середовища до $20 - 25^{\circ}\text{C}$ морозу температура тіла коливається в межах тих же $2 - 4^{\circ}\text{C}$ [76, 89, 90, 92, 178].

У ссавців температура тіла дещо нижче, ніж у птахів, і у багатьох видів схильна до сильніших коливань. У представників різних груп помітні коливання температури тіла у зв'язку із зовнішньою температурою: при зниженні температури повітря від $20 - 25^{\circ}\text{C}$ до $14 - 10^{\circ}\text{C}$ реєструвалося падіння температури тіла на два з гаком градуса, а в окремих випадках — навіть на 5°C [12, 76, 92].

Фізіологічні механізми, що забезпечують тепловий гомеостаз організму, підрозділяються на дві функціональні групи: механізми хімічної і фізичної терморегуляції. Хімічна терморегуляція є регуляцією теплопродукції

організму. Тепло постійно виробляється в організмі в процесі окислювально-відновних реакцій метаболізму. При цьому частина його віддається в зовнішнє середовище тим більше, чим більше різниця температури тіла і середовища. Тому підтримка стійкої температури тіла при зниженні температури середовища вимагає відповідного посилення процесів метаболізму і супроводжуючого їх теплоутворення, що компенсує тепловтрати і приводить до збереження загального теплового балансу організму і підтримки постійності внутрішньої температури. Процес рефлекторного посилення теплопродукції у відповідь на зниження температури навколишнього середовища і носить назву хімічної терморегуляції. Виділення енергії у вигляді тепла супроводжує функціональне навантаження всіх органів і тканин і властиво всім живим організмам. Специфіка гомойотермних тварин полягає в тому, що зміна теплопродукції як реакція на змінну температуру представляє у них спеціальну реакцію організму, що не впливає на рівень функціонування основних фізіологічних систем.

Зміни інтенсивності обміну речовин, викликані впливом температури середовища, на організм гомойотермних тварин закономірні. У певному інтервалі зовнішніх температур теплопродукція, відповідна обміну організму, що покоїться, повністю компенсується його “нормальною” (без активної інтенсифікації) тепловіддачею. Теплообмін організму з середовищем збалансований. Цей температурний інтервал називають термонеутральною зоною. Рівень обміну в цій зоні мінімальний. Нерідко говорять про критичну точку, маючи на увазі конкретне значення температури, при якому досягається тепловий баланс з середовищем. Теоретично це вірно, але експериментально встановити таку точку практично неможливо із-за постійних незакономірних коливань метаболізму і нестабільності теплоізолюючих властивостей покривів.

Підвищення температури середовища за межі термонеутральної зони викликає підвищення рівня обміну речовин, що викликане включенням

механізмів активізації віддачі тепла, що вимагають додаткових витрат енергії на свою роботу. Після досягнення певного порогу механізми посилення тепловіддачі виявляються неефективними, починається перегрів і врешті-решт загибель організму [98, 90, 92].

Видові відмінності хімічної терморегуляції виражаються в різниці рівня основного обміну, положення і ширини термонеutralної зони, інтенсивності хімічної терморегуляції, а також в діапазоні ефективної дії терморегуляції. Всі ці параметри відображають екологічну специфіку окремих видів і адаптивним чином міняються залежно від географічного положення регіону, сезону року, висоти над рівнем моря і ряду інших екологічних чинників.

Фізична терморегуляція об'єднує комплекс морфологічних механізмів, пов'язаних з регуляцією тепловіддачі організму як однієї з складових частин його загального теплового балансу. Головне пристосування, що визначає загальний рівень тепловіддачі організму гомойотермної тварини, — будова теплоізолюючих покривів. Механізм теплоізолюючої дії пір'яного і волосяного покривів полягає в тому, що певним чином розташовані, різні по структурі групи волосся або пір'я утримують навколо тіла шар повітря, яке і виконує роль тепло ізолятора [93].

Регуляторні реакції, направлені на збереження постійної температури тіла при перегріві, представлені різними механізмами посилення тепловіддачі в зовнішнє середовище. Серед них широко поширена і володіє високою ефективністю тепловіддача шляхом інтенсифікації випаровування вологи з поверхні тіла або верхніх дихальних шляхів. При випаровуванні вологи витрачається тепло, що може сприяти збереженню теплового балансу. Реакція включається при ознаках перегріву організму, що починається. Отже, адаптивні зміни теплообміну у гомойотермних тварин можуть бути направлені не тільки на підтримку високого рівня обміну речовин, як у більшості птахів і ссавців, але і на установку низького рівня в умовах енергетичних резервів, що загрожують виснаженням.

Особливе значення теплового режиму отримується в ході розвитку нового організму, в ході ембріогенезу. Якщо мова йде про ембріогенез птахів, то це правила інкубації. Успіх інкубації залежить від ряду чинників: режиму температури та вологості, вентиляції, своєчасного повороту яєць, чистоти устаткування і повітря, біологічної повноцінності інкубаційних яєць, якості проведення біологічного контролю за ходом ембріонального розвитку, режиму температури та вологості на виводі і своєчасної вибірки молодняка з інкубатора. Порушення одного з цих чинників істотно відбивається на вилупленні курчат з яєць, життєздатності і якості отриманого молодняка [13, 26, 29, 30, 91, 93].

Розвиток зародка цілком залежить від стану навколишнього повітряного середовища. Провідним зовнішнім чинником тут є температура. У природних умовах обігрів яєць здійснюється за рахунок контакту його з тілом квочки, що має температуру біля 40-41 °С. Квочка постійно переміщує яйця, перекочуючи їх з боку на бік, від центру до периферії і назад, таким чином, вирівнюючи температуру біля них.

В даний час в птахівництві квочки замінені інкубаторами різних марок і потужностей. У сучасних інкубаторах система регулюючих приладів надійно забезпечує задану температуру і вологість повітря, повітрообмін і поворот яєць. Проте бувають випадки порушення прийнятого режиму, що ведуть до підвищення ембріональної смертності і зниження якості добового молодняка [13, 83, 84]. При цьому найбільшу небезпеку для ембріонів представляють відхилення режиму інкубації у бік високих температур. Залежно від моменту і часу дії підвищеної температури на зародки гіпертермії можна розділити на:

гостру гіпертермію;

тривалу (хронічну) гіпертермію на початку інкубації;

гіпертермію в другій половині інкубації.

Гостра гіпертермія. У перші години інкубації зародки безболісно переносять температуру 41-43 °С, близьку до температури тіла птаха [13, 30]. Пізніше, з початком закладки осьових органів ембріонів, така температура

для них згубна. Наслідком сильного перегріву в 2-ій половині першої доби і на 2-у добу інкубації є необоротні зміни, при яких ембріон є безформною масою, не здатний до подальшого диференціювання. У ембріона порушується закладка і диференціація парахордальних органів, нервова пластинка не змикається, мезодерма не диференціюється на соміти. Ембріон часто схожий на безформну масу з недиференційованих або слабо диференційованих тканин. На жовтковому мішку спостерігається інтенсивне розростання бластодерми, в якій йде кровотворення, проте цей процес не закінчується повноцінним розвитком кровоносної системи, в даному випадку кровоносних судин. Ембріон гине, він оточений різної величини кров'яними острівцями [83].

Підвищена температура в період перших двох діб інкубації підвищує відсоток потворності. Характерна в основному потворність голови, з якою ембріони можуть прожити до останніх днів інкубації: акранії (недорозвинення черепної коробки з оголенням головного мозку), недорозвинення і деформація очей, мозкові грижі (випинання головного мозку в порожнину незакритої черепної коробки), недорозвинення або викривлення лицьових кісток і дзьоба. Часто ця потворність спостерігається в комплексі. Перегрів яєць після двох діб інкубації такої потворності голови не викликає. При цьому необхідно пам'ятати, що перегрів на 2-й добі інкубації не єдина причина появи вказаної вище потворності, проте вона значно підвищує частоту їх проявів і на генетичному рівні [84].

При гострому перегріві на 3-4 добі інкубації спостерігається прилипання ембріонів до підскорлупних оболонок. Гіпертермія яєць на 3-4-й день інкубації викликає іншу потворність – ектопію (по термінології інших авторів – целосомію). При цьому стінки черевної порожнини ембріона своєчасно не зростаються і внутрішні органи (печінка, шлунок, кишечник, а іноді і серце) змінюють своє положення, звисаючи в жовток. Такі зародки гинуть і в пізніші терміни інкубації. Дуже часто зімкнення стінок черевної порожнини у них все ж таки відбувається, але з великим запізненням, так що зміщені органи

ущемляються і деформуються. Ектопія є наслідком дуже швидкого наростання маси ембріона і занурення його в жовток ще до утворення порожнини тіла. Такі ембріони продовжують жити і розвиватися до кінця інкубації, проте гинуть при виводі. Слід вказати і той факт, що висока температура в перші дні інкубації викликає, окрім описаної вище потворності, гіперемію ембріонів – іноді тільки голови або хвостової частини та ряд патологічних відхилень, внаслідок чого підвищується смертність, особливо в перший критичний період розвитку (у курей - 3-4 день інкубації). І чим сильніше мало місце підвищення температури, тим більше і значніше ці відхилення [83, 84, 230, 243, 250].

У пізніші дні інкубації різке короткочасне підвищення температури веде до крововиливів - 7-15-денний ембріон може залишатися живим при температурі 45-50°C, якщо тривалість дії температурного чинника не більше 1-1,5 години. У нього сильно зростає частота серцебиття і пульсація амніону, відбуваються судорожні рухи голови і кінцівок, прилив крові до судин алантоїсу. У загиблих ембріонів спостерігаються точкові і розлиті крововиливи в шкірі, серці, печінці, головному мозку. Серце найчастіше анемічне, майже біле. Судини алантоїсу при гострих перегрівках зазвичай розширені і переповнені кров'ю. Діагностичною ознакою гострої гіпертермії є одночасна загибель всіх або більшості ембріонів у момент перегріву. У живих зародків, що розвивалися при підвищеній температурі в середні дні інкубації, часто спостерігають кісти на стінках амніону і алантоїсу, розміром з просяне зерно і більше. Вони мають вид бульбашок з прозорим вмістом [83, 84].

При тривалій (хронічній) гіпертермії на початку інкубації, коли температура підвищена до 38-41°C, ембріони гинуть не відразу, але їх розвиток порушується, виникають різні аномалії в розвитку. Ембріональна смертність збільшується головним чином в останній критичний період – перед виводом.

Якщо розглянути дію перегріву в кінці інкубації з фізіологічної точки зору, то слід сказати, що основною причиною загибелі ембріонів в останній

критичний період при тривалій гіпертермії можна вважати їх голодування (кахексію), викликане порушенням обміну речовин і неповним використанням поживних запасів яйця. Не менше значення у ряді випадків має і передчасна атрофія алантоїсу і його кровоносної системи, що вимушує зародки раніше призначеного терміну прокльовувати шкаралупу, коли жовток ще не втягнутий. Організм зародка в основному у цей момент ще не готовий до життя поза яйцем.

Хоча гіпертермія - це фактор впливу, що широко застосовується або зустрічається в природі і відповідна реакція з боку різних органів, що розвиваються, і систем на збільшення температури на стадіях раннього ембріогенезу відома, механізми експериментального відхилення розвитку залишаються малозрозумілими. Застосовувані методики гіпертермії вивчалися з різних позицій, а саме їх близький і віддалений вплив. Закордонні дослідники Buckiova D. та Kubinova L. [235] використали гіпертермію ембріонів курки в пресомітному періоді й на ранніх стадіях розвитку сомітів, що відповідає 4-10-й стадіям розвитку по стандартизованій таблиці нормального розвитку ембріона курки по Гамбургеру й Гамільтону (Hamburger, Hamilton – НН) (НН 4-10). Ембріони піддавалися гіпертермічній інкубації при 45 градусах Цельсія протягом 180 хвилин. Впродовж 6-ти годин післядії автори не спостерігали ніяких морфологічних відхилень у розвитку, але після 12-ти годин наступної нормальної інкубації спостерігалось виражене каліцтво голови, *spina bifida* у грудному й попереково-крижовому відділах, перекручування і петлеутворення серця в 20% цих ембріонів. У ранньому сомітному періоді вплив високої температури на міграцію клітин нервового гребеня індукував загибель клітин гребеня й наступні порушення в розвитку серця, а саме в його петлеутворенні й поділі конотрункусу на аорту й легеневий стовбур.

Даний метод застосовувався й при вивченні ембріонів ссавців. Проводилася, так звана, материнська гіпертермія - нагрівання вагітної самки. Однак, більшість ембріонів не в змозі витримувати перегрів і гинуть на ранніх

стадіях розвитку. В ембріонів морської свинки нагрівання індукує істотні зміни у формі серця, але всі ембріони вмирають у межах 20 днів після нагрівання [305]. Подібний ефект, розглянутий на прикладі ембріогенезу щурів з підвищенням температури від 37 до 42 градусів Цельсія, призводив до зміни гемодинаміки в цілому й підвищенню тиску в пупочній артерії зокрема [178, 212, 303]. Зміни тиску й гемодинаміки кровообігу виявлені при впливі гіпертермії й у птахів [211, 212]. При підвищенні температури на 15% (тобто з 37 градусів Цельсія до 42-44 градусів) тиск крові збільшувався на 11%. При поверненні до базових температур (тобто до 37 градусів) тиск крові завжди вже відрізнявся від первинного або контрольного, що вказує на реальні зміни у геодинаміці кровообігу ембріону. Дослідження впливу гіпертермії на розвиток серцево-судинної системи птахів на 18-й, 21-й та 24-й стадіях розвитку виявило також підйом тиску від $0,96 \pm 0,05$ до $1,04 \pm 0,06$ мм Рт.ст., але після охолодження до базових величин температури тиск відновлювався, що може свідчити про появу компенсаційних механізмів на більш пізніх стадіях розвитку ембріону [212].

Дослідники відстежили також частоту серцевих скорочень під впливом гіпертермії. На стадіях розвитку від 20-ї до 30-ї стадії (НН) норма частоти серцевих скорочень складала у ембріона курки 173 ± 2 , під час впливу високої температури (40 градусів) частота складала 211 ± 3 , а при поверненні до 37 градусів поверталася до норми (170 ± 3) [285]. Таким чином, можна дійти висновку, що вплив підвищеної температури на формування серцево-судинної системи більш виражений та має явні наслідки у ембріонів раннього ембріогенезу у курки, тобто до 20-ї стадії розвитку за Гамбургером та Гамільтоном (до 72-х годин інкубації), а вже після цього часу починають формуватися пристосовні компенсаторні механізми серця та судин [212, 249].

В дослідженій літературі нами майже не зустрічалися відомості про виникнення як наслідок впливу гіпертермії таких вад розвитку як загрудинна ектопія серця, формування уроджених вад серця та великих судин,

порушення будови серцевої стінки на гістологічному рівні. Тому дослідження даних напрямків було визначено нами як доцільне та актуальне.

1.2. Вплив гіпоксії на хід ембріонального розвитку

Гіпоксія визначається як патологічний процес, що розвивається або унаслідок недостатнього постачання тканин киснем, або унаслідок порушення використання кисню тканинами. Унаслідок гіпоксії в життєво важливих органах розвиваються незворотні зміни. Найбільш чутливими до кисневої недостатності є нервова тканина, серцевий м'яз, тканини печінки [220, 236, 238, 239, 245, 272, 274]. Чистий кисень особливо необхідний під час вагітності, для поліпшення умов дозрівання плоду (профілактики плацентарної недостатності), спортсменам і людям під час фізичних навантажень. Гіпоксія плоду — недостатнє постачання киснем тканин і органів плоду або неповне засвоєння ними кисню [25, 74, 94, 134]. Цей термін запропонований Всесвітньою Організацією Охорони здоров'я, але він не єдиний: існують також терміни дистресс плоду (від distress — «страждання») і асфіксія (від а — без, sphyxis — пульс; при цьому мають на увазі задуху, тобто недолік кисню і накопичення вуглекислого газу в організмі). Наслідки кисневої недостатності для плоду в різні періоди вагітності різні [181, 183, 195, 221]. У ранні терміни, коли відбувається формування органів і систем, виражена гіпоксія може супроводжуватися уповільненням зростання ембріона і появою аномалій розвитку [142, 143, 184, 185, 186]. Кисневе голодування в пізніші терміни вагітності може привести до затримки зростання плоду, пошкодження центральної нервової системи плоду і новонародженого, порушенню процесів адаптації дитини після пологів; у окремих випадках воно може стати причиною мертвонародження або загибелі новонародженого.

Залежно від тривалості розрізняють хронічну і гостру гіпоксію плоду. Хронічна гіпоксія розвивається при недостатньому постачанні плоду киснем

протягом тривалого періоду унаслідок захворювань внутрішніх органів, що є у матери, ускладненого перебігу вагітності. Хронічна гіпоксія також може стати наслідком куріння, вживання алкоголю, наркотиків під час вагітності. Гостра гіпоксія, як правило, виникає в пологах (у зв'язку з аномаліями пологової діяльності, обвиванням пуповини, випаданням або притисненням петель пуповини, короткістю пуповини). Рідше гостра гіпоксія спостерігається під час вагітності при загрозливих життю матері станах (передчасне відшарування плаценти). Іноді спостерігається поєднання гострої і хронічної гіпоксії плоду [72, 77, 94, 96, 102, 113, 117, 155].

Існують фізіологічні особливості внутрішньоутробного розвитку, які перешкоджають виникненню цього стану: кров плоду може «вміщати» більше молекул кисню, ніж кров дорослої людини; серце плоду пропускає більше крові в хвилину, ніж серце дорослого; у крові плоду є велика кількість особливого, фетального, гемоглобіну, який легше приєднує до себе кисень і швидше віддає його тканинам і кліткам, що необхідне, враховуючи велику швидкість кровотоку у плоду; захисним чинником від розвитку гіпоксії є також особливості будови серцево-судинної системи плоду. Під впливом дефіциту кисню на початкових стадіях гіпоксії плоду відбувається активація функції надниркових залоз, у зв'язку з цим збільшується вироблення речовин, які сприяють збільшенню частоти серцевих скорочень і підвищенню артеріального тиску плоду. Внаслідок цього відбувається перерозподіл кровотоку, тобто посилюється кровообіг в мозку, серці, надниркових залозах, плаценті і зменшується кровообіг в легенях, нирках, кишківнику, селезінці, шкірі. Такий перерозподіл крові обумовлений тим, що зберігається в необхідному об'ємі кровопостачання і функція органів, найбільш важливих на внутрішньоутробному етапі життя дитини. Проте у міру наростання гіпоксії адаптаційні можливості організму плоду знижуються і відбувається пригнічення функції надниркових залоз, головного мозку і серця, внаслідок чого знижуються частота серцевих скорочень, артеріальний тиск, швидкість кровотоку і ще більш зменшується споживання кисню органами і тканинами

плоду. При прогресуючій або тривалій гіпоксії відбувається ослаблення рухів плоду, аж до їх припинення [24, 285].

На даний період часу існує декілька загальноприйнятих класифікацій гіпоксії [23, 24, 102, 285]:

Гіпоксія анемічна розвивається при анеміях у разі значного зменшення кількості еритроцитів або різкого пониження вмісту в них гемоглобіну.

Гіпоксія гемічна виникає в результаті зменшення кисневої ємності крові; спостерігається при анеміях, гідремії і при порушенні здатності гемоглобіну зв'язувати, транспортувати або віддавати тканинам кисень (напр., при утворенні карбоксигемоглобіну, метгемоглобіну).

Гіпоксія гістотоксична тканинна, така, що виникає при деяких отруєннях унаслідок пригніблення окислювально-відновних процесів в тканинах.

Гіпоксія дифузійна виникає при диханні атмосферним повітрям після наркозу закисом азоту; пояснюється зниженням парціального тиску кисню в альвеолярному повітрі унаслідок швидкої дифузії закису азоту з тканин.

Гіпоксія застійна циркуляторна, така, що розвивається при застої крові, обумовленому розладами серцевої діяльності, збільшенням ємності судинного русла, місцевими утрудненнями відтоку венозної крові і тому подібне

Гіпоксія блискавична форма, що виявляється швидкою втратою свідомості (за декілька десятків секунд) і припиненням життєво важливих функцій організму; спостерігається, наприклад, при повній відсутності кисню у вдихуваному газі, при вдиханні пари синильної кислоти у високих концентраціях і тому подібне.

Гіпоксія гостра форма, що виникає при порушеннях надходження кисню, що швидко розвиваються, в організм, його транспорту до тканин або утилізації; виявляється в першу чергу розладом функцій вищих відділів ц.н.с.

Гіпоксія респіраторна (дихальна) виникає в результаті недостатності газообміну в легенях у зв'язку з альвеолярною гіповентиляцією, порушенням вентиляційно-перфузійних відносин, утрудненням дифузії кисню через альвеолокапілярну мембрану і тому подібне при нормальному вмісті кисню у повітрі, яке вдихається.

Гіпоксія змішана обумовлена поєднанням двох або більше патогенетичних механізмів.

Гіпоксія тканинна виникає при порушеннях здатності тканин утилізувати кисень крові або у зв'язку із зменшенням ефективності біологічного окиснення із-за різкого погіршення зв'язаності окислення і фосфолювання; спостерігається при деяких отруєннях, ендокринопатіях, авітамінозах і так далі.

Гіпоксія хронічна виникає при станах, що супроводжуються хронічною недостатністю кровообігу і (або) дихання, при хворобах крові і інших станах, що приводять до стійкого порушення тканинного дихання; виявляється підвищеною стомлюваністю, порушеннями діяльності ЦНС., задишкою і серцебиттям при невеликому фізичному навантаженні, зниженням імунної реактивності.

Гіпоксія циркуляторна виникає при порушеннях кровообігу, тканин, що приводять до недостатнього кровопостачання.

Гіпоксія екзогенна виникає при зниженому парціальному тиску кисню у повітрі, що вдихається.

Крім того, розрізняють загальний і місцевий стани гіпоксій. По темпу розвитку гіпоксії розрізняють блискавичну форму, що розвивається протягом декількох десятків секунд, гостру форму – декілька хвилин або десятків хвилин, підгостру форму – декілька годин або десятків годин, хронічну форму – тижнями, місяцями і навіть роками. Точних тимчасових інтервалів для кожної форми автори не виділяють. Екзогенний тип гіпоксії спостерігається при смерті в замкнутому просторі. Розвивається блискавична, гостра, підгостра і хронічна гіпоксемія, яка нерідко супроводжується більшою чи

меншою мірою вираженою гіперкапнією. Основним патогенетичним чинником є несприятливе для газообміну зрушення градієнта тиску кисню між капілярною кров'ю і тканинним середовищем. Гіпоксемія і гіперкапнія приводять до погіршення кровопостачання мозку і серця, алкалозу, порушення балансу електролітів, підвищеної потреби тканин в кисні [107, 108]. Серцево-судинна гіпоксія розвивається при порушенні кровопостачання органів і тканин (гіповолемія, тобто зменшення об'єму крові; при крововтраті, обезводненні (опіках, холері), пошкодженнях м'язів серця – інфаркт, кардіосклероз: порушення електролітного балансу; а також при різних механічних чинниках: тампонада порожнини перикардіальної оболонки, облітерація порожнини перикарду і при інших причинах. Кров'яна гіпоксія виникає при зменшенні кисневої ємкості крові – анемії, і порушенні здатності гемоглобіну зв'язувати, транспортувати і віддавати тканинам кисень. Анемічні стани спостерігаються при виснаженні кістковомозкового кровотворення на ґрунті хронічних кровотеч (туберкульоз, виразкова хвороба і ін.); при гемолізі крові (отруєння, важких опіках, малярії), при пригнобленні еритропоезу різними зовнішніми чинниками (отруєння свинцем, іонізуюча радіація), при аплазії кісткового мозку, а також при дефіциті компонентів, необхідних для нормального еритропоезу і синтезу гемоглобіну (недолік заліза, вітамінів та ін.). Кров'яна гіпоксія наголошується також при деяких генетично обумовлених аномаліях гемоглобіну. Тканинна гіпоксія (не цілком точна назва – гістотоксична) є порушенням здатності тканин поглинати кисень з крові або у зв'язку із зменшенням ефективності біологічного окиснення із-за різкого зменшення сполучення окиснення і фосфорилювання. Інгібування дихальних ферментів відбувається при отруєнні ціаністими з'єднаннями. Ціан-іони (CN-) з'єднуються з тривалентним залізом, блокуючи цитохромоксидазу. Дією, що інгібує дихальні ферменти володіють також сульфид-іони, антимицин А і інші з'єднання. Дихальні ферменти можуть блокуватися за типом конкурентного гальмування, наприклад, антиметаболітами. Тканинна гіпоксія розвивається при блокуванні

функціональних груп білка або коферменту в результаті дії солей важких металів, арсенідів (з'єднань миш'яку), а також при придушенні різних ланок біологічного окиснення при передозуванні барбітуратів, деяких антибіотиків, надлишку водневих іонів, отруєнні люїзитом і деякими речовинами біологічного походження. Тканинна гіпоксія може бути пов'язана з порушенням синтезу дихальних ферментів (нестача вітамінів – тіаміну, рибофлавіну, пантотенової кислоти і ін.), або виникати при пошкодженні мембран мітохондрій і інших клітинних елементів в результаті променевого впливу, перегріванні, інтоксикаціях, важких інфекціях, уремії, кахексії і тому подібне. Змішана гіпоксія представляє поєднання два і більше видів гіпоксії. Наприклад, барбітурати пригнічують окислювальні процеси в тканинах і одночасно пригніблюють дихальний центр. При масивній крововтраті порушується гемодинаміка, розвивається гідремія в результаті притоки рідини з тканин і підвищеної реабсорбції води в ниркових канальцях, що приводить до зменшення кисневої ємності крові, і на певному етапі до циркуляторної гіпоксії приєднується гемічна [273, 274, 284, 308].

Морфологічні ознаки гіпоксії нечисленні і не є специфічні. При мікроскопічному дослідженні виявляються застійні явища в шкірі і слизових оболонках, венозне повнокров'я і набряк внутрішніх органів, особливо головного мозку, легенів, органів черевної порожнини, точкові крововиливи в серозних і слизових оболонках. Найбільш універсальною ознакою стану гіпоксії кліток і тканин і, можливо, патогенетичним елементом гіпоксії є підвищення пасивної проникності біологічних мембран (базальних мембран судин, клітинних оболонок, мембран мітохондрій і ін.). Ранньою ознакою гіпоксії є порушення мікроциркуляторного русла у вигляді стазів, плазматичного просочення і некробіотичних змін судинних стінок з порушенням їх проникності, виходу плазми в перикапілярні простори.

Вчені з Інституту фізіології ім. Павлова РАН, Інституту еволюційної фізіології і біохімії ім. Сеченова РАН і НДІ експериментальної медицини РАМН досліджували, як впливає гіпоксія, перенесена внутрішньоутробно, на

здібність до навчання. У ролі піддослідних були обрані щури, на яких гіпоксія вплинула по-різному, залежно від терміну дії і статі тварини [107, 108].

Брак кисню може порушити нормальне зростання і розвиток ембріона, зокрема викликати значне ураження головного мозку і змінити функціональний стан нервових клітин. Нерідко наслідки змін такого роду можна відмітити лише після народження. Петербурзькі фізіологи встановили, що ступінь дії гіпоксії на головний мозок залежить від термінів дії: ефект найбільш виражений, якщо гіпоксія припадає на певну стадію розвитку плоду. Продовжуючи роботу, учені досліджували вплив гіпоксії, перенесеної щурами в різні терміни вагітності, на здатність їх потомства виробляти умовні рефлекси. Виявилось, що внутрішньоутробна гіпоксія значно погіршує здібність самок щурів до вироблення умовно-рефлекторного навчання. Але ефект сильно залежав від термінів: гіпоксія, перенесена на 19-у добу, приводить до повної нездатності до навчання, а перенесена на 16-у добу - навпаки благотворно позначилася на цих здібностях. В той же час, на поведінку самців щурів пренатальна гіпоксія практично не впливала [108].

Гіпоксія, перенесена ембріоном в період закладки органів, незворотно впливає на діяльність серця і регуляцію його роботи. До такого висновку прийшли фахівці Московського державного університету ім. М.В.Ломоносова і Медико-генетического наукового центру РАМН, досліджуючи вплив ранньої гіпоксії на постнатальний розвиток. Учені працювали з потомством білих щурів, які перенесли гостру гіпоксію на 9-10-у добу, коли у ембріонів починають формуватися внутрішні органи. Вагітних щурів поміщали в барокамеру і за хвилину знижували в ній тиск до 145 мм рт.ст. Такий тиск відповідає висоті 11, 5 км. Коли щури переставали дихати, їх "спускали" з набраної висоти. В середньому тварини знаходилися в умовах кисневого голодування близько 2,5 хвилин [108].

На першому етапі роботи учені досліджували культуру клітин кардіоміоцитів, отриману з передсердя двох- і триденних щурят, що народилися у піддослідних і контрольних щурів. Клітини серцевого м'яза в

культури скорочуються. Кардіоміоцити здорових щурят скорочуються приблизно 35 разів на хвилину, а у щурят, що пережили гіпоксію, частота скорочень достовірно зростає. На скоротливу активність кардіоміоцитів впливає норадреналін, причому клітини піддослідних щурят реагують на нього слабкіше, ніж клітини контрольних [145, 146, 151, 205, 208, 209, 210].

На другому етапі вивчали роботу не окремих клітин, а цілого серця. На цій стадії в експерименті брали участь двомісячні щурята, яким знімали електрокардіограму. Тварини під час цієї процедури вільно переміщалися по камері. Виявилось, що у щурят піддослідної групи серце б'ється швидше і не так рівномірно, як у контрольних щурят аналогічного віку. Крім того, кора великих півкуль щурят, що перенесли гіпоксію, містила норадреналіну на 38% більше, ніж в контролі [224].

Таким чином, гостра гіпоксія, випробувана ембріоном в період закладки органів, робить незворотний вплив на роботу серця. І не тільки серця. Вчені з'ясували, що щурята, що народилися від самок, які перенесли гостру гіпоксію, набагато частіше вмирають, не досягнувши 20-денного віку, чим дитинчата з контрольної групи [102]. Що залишилися в живих малюки явно відстають у фізичному розвитку: пізніше розплющують очі і повільніше набирають вагу. В період статевого дозрівання у піддослідних щурят обох статей з'явилися зміни - рухової активності, знизилася емоційна напруженість і з'явилася велика схильність до ризикованої поведінки. Такі різноманітні наслідки гострої пренатальної гіпоксії дозволяють зробити, принаймні, один серйозний висновок: жінкам потрібно берегти майбутню дитину з самого початку вагітності і виключити зі свого життя ситуації, при яких плід може випробувати брак кисню.

Впродовж останніх років асфіксія займає одне з провідних місць в структурі перинатальної захворюваності і залишається одною з головних причин перинатальних пошкоджень центральної нервової системи плоду і новонародженого, смертності і інвалідизації і має величезний вплив на подальший розвиток дитини, якість її життя. Протягом останніх років

показники захворюваності асфіксією в Україні залишаються стабільно високими і склали в 2003 році 91,11 %, у 2004 р. 73,98 %, у 2005 р. — 72,4 %. [25]. Як показали дослідження українських вчених, у щурят, які в ембріональному періоді пережили помірну гіпоксію, відбувається збільшення максимального діаметру мітохондрій в середньому на 70 %. У щурят, що перенесли в ембріональному періоді важку гіпоксію більш ніж в 2 рази. Такі зміни, які прийнято вважати незворотним набряком, тісно пов'язані із загибеллю мітохондрій, тим більше що відбувалося різке збільшення діаметру паралельно з вакуолізацією і деструкцією. Потрібно звернути увагу на той факт, що в нейрочитах щурят, які випробували дію важкої гіпоксії, зменшення загальної кількості мітохондрій досягає 1,8 разу, а зменшення суми їх поверхонь відбувається лише на 18 %, тобто можна припустити, що окрім загальної зміни кількості органел, переважна більшість останніх знаходилася саме в стані незворотного набряку і не здатна була виконувати свої енергозабезпечуючі функції. У тварин же з помірною гіпоксією співвідношення кількості мітохондрій, їх діаметру і суми поверхонь мають більш оптимальний характер, а саме помірне зростання діаметрів при практично стабільній кількості. Крім того, у щурят після важкої гіпоксії відмічена достовірно більша кількість мітохондрій у стадії руйнування в порівнянні з тваринами після помірної гіпоксії і інтактною підгруп. При цьому в пошкоджених мітохондріях тварин після важкої гіпоксії перевищує норму деструкція і дисконкомплексація крист, руйнування внутрішньої або зовнішньої мітохондріальних мембран, часто в органелі збережена тільки оболонка завдяки гідролізу залишків мітохондрій або подекуди має місце їх інкапсуляція. Таким чином, проведені дослідження показали, що у щурят, які витримали дію помірної гіпоксії до народження, при практично незмінній загальній кількості мітохондрій спостерігається різке можливе зростання відсотка пошкодженої органели на тлі достовірного збільшення їх діаметру і суми поверхні мітохондрій в одиниці об'єму. Інтерполюючи отримані експериментальні дані на грудних дітей, учені припускають, що описані зміни

мітохондрій клінічно можуть не виявлятися, але при дії стресових чинників, які потребують додаткових енерговитрат, може розвинутися мітохондріальний дистресс і зірвати компенсації у функціонуванні нервової системи. У разі дії важкої асфіксії зміни енергетичного апарату нейроцитів носять незворотний характер, який дуже небезпечний для подальшого розвитку дитини. Клініко-експериментальне дослідження також виявило, що у щурят, які випробували дію помірної гіпоксії до народження, спостерігається достовірне збільшення діаметру і суми поверхні мітохондрій в одиниці об'єму нейроцитів щодо даного показника у інтактних тварин. У тварин, які випробували дію важкої гіпоксії, констатована наявність структурного дистреса мітохондрій на тлі практичної відсутності юних форм мітохондрій [275, 276, 277].

Одним з факторів, що впливають на ембріогенез, безумовно, є вміст кисню в навколишнім середовищі й, отже, у крові. Цей агент, поряд з температурою, здатний визначати подальший розвиток зародка. Дослідження закордонних ембріологів продемонстрували вплив гіпоксії на процес розвитку ембріона курчати [155]. Піддаючи гострому впливу гіпоксією (10 % кисню у повітрі, що вдихається) ембріони протягом 2-х, 4-х, і 6-ти годин на етапах раннього розвитку (2-го, 3-го, і 4-го дня інкубації) дослідники вивчали наслідки впливу гіпоксії на ембріональний ріст, кардіогенез до кінця ембріонального періоду. Після гіпоксичного впливу, ембріонам продовжували інкубацію у стандартних умовах до 9-ї доби, реєструючи масу ембріона, серцеву масу і норму споживання кисню. Чотириденні ембріони піддавалися 6-ти годинам гіпоксії, що призвело до збільшення летальності (38,9 % проти 18 % для контрольних груп), указуючи безпосередній вплив гіпоксії на життєздатність. В експериментальній групі виявлялися також більш часті відхилення, що розвиваються (30 %). Ніякі значні відхилення в ембріогенезі не були знайдені в тих ембріонах, які піддавалися гіпоксії на ранніх етапах розвитку. Ці результати показують, що гострий гіпоксичний вплив на початку ембріогенезу не впливає на розвиток ембріона в цілому й серця зокрема, у

зв'язку з незначною потребою в кисні в цей період, а можливо й з наявністю запасу кисню в повітряній камері яйця.

Вплив кисню на розвиток ембріону у цілому й на окремі органи, а також на вагові показники досліджувалися вченими [273]. Ембріони курчати і їхні окремі органи зважувалися, щоб зрівняти відставання у зростанні із прискореним ростом. Ріст був прискорений, при культивуванні яєць в 60 % O₂ і 40 % N₂ (гіпероксія) і вповільнений у яєць, культивованих у повітрі (нормоксія), контрольна група була культивована в повітрі без впливу. Після 18 і 20 днів інкубації, тобто наприкінці інкубації, яйця були відкриті й ембріони розсічені й зважені. Дані показують, що наявність кисню в навколишній середовищі змінює норму ембріонального росту, і викликає помітне збільшення росту серед окремих органів. Головний мозок і печінка майже не змінювали своєї маси в порівнянні з контрольною групою, у той час як маса серця вірогідно збільшувалася. Інші дослідники показали, що гіпоксія зменшила розміри й вагу ембріона в цілому, а також вагу серця, мозку й печінки, тоді як гіпероксія збільшила ембріон, серце, легені й печінку (волога вага) у порівнянні з потмохіс контрольної групи. Особливо цікавим виглядає той факт, що волога вага хоріоалантоїсної мембрани була збільшена при гіпоксії й зменшена гіпероксією [284].

Аналогічні дослідження інших вчених також продемонстрували зворотну залежність росту й маси серця при впливі гіпоксією на ембріон, що розвивається, [290]. Шлуночки серця ембріонів курки, культивованих в 60 % O₂ (гіпероксія) з 16-ї по 18-ту добу інкубації були на 21 % важче ніж в ембріонів контролю, які інкубувалися в 21 % O₂ (потмохія). Серцеві шлуночки ембріонів, культивованих в 15 % O₂ (гіпоксія) були на 8 % легше ніж в контрольній групі. Зміни в шлуночковій вазі супроводжувалися пропорційними змінами в білковому вмісті (21 % більше в гіпероксічних шлуночках; 8 % менше в гіпоксічних шлуночках). Відносини білка/ДНК тканини були значно вищі при гіпероксії й нижчі при гіпоксії.

У відповідь на такі зовнішні впливи як гіпоксія й асфіксія плід розвиває серцево-судинну адаптацію, щоб захистити життєво важливі органи. Адаптація включає брадикардію, збільшення системного кров'яного тиску і перерозподіл функціонального стану серця. Ціль ряду робіт ембріологів полягала в тому, щоб вивчити розподіл функціонального стану серця ембріонів курчати у відповідь на гіпоксію, що є незалежними від організму матері. Яйця інкубували в камері, де змінювалася й фіксувалася концентрація кисню [176, 284, 298]. У яєць були розкриті повітряні камери й хоріоалантоїсна вена була катетеризована. Розподіл функціонального стану серця було обчислено протягом нормоксії, гіпоксії й наступної реоксигенації. Гіпоксія викликала перерозподіл функціонального стану серця на користь серця (+17 до +160 % початкових) і мозку (+21 до +57 % початкових) за рахунок печінки (-3 до -65 % початкових), жовточного мішка (-46 до -77 % початкових) і корпусу (-6 до -33 % початкових). Величина змін у розподілі функціонального стану серця до серця, мозку, печінки й корпусу у відповідь на гіпоксію збільшилася із просуванням інкубаційного часу. Дані демонструють розвиток захисного перерозподілу функціонального стану серця у відповідь на гіпоксію в ембріоні курчати з 10-го дня інкубації [176]. Спостерігався також вплив гіпоксії на зміни роботи серцево-судинної системи в цілому таких як брадикардія, системна артеріальна гіпертензія, і зміни в частоті скорочування серця [284].

Вплив гіпоксії на організм, що розвивається, його серце й гемодинаміку може мати й більш віддалені наслідки, тобто в пізньому ембріональному періоді [237]. Ембріони курчати культивувалися при нормоксії (21 % O₂) і гіпоксії (15 % O₂) і результати цього впливу оцінювалися на 19-ту добу інкубації за допомогою гістологічних методів, вивчення ізольованого серця, і *in vivo* виміром артеріального тону й системної гемодинаміки. Хронічна гіпоксія викликала на 33% збільшення летальності й на 11% скорочення ваги тіла в ембріонів, що виживають. Порожнина висхідної аорти в гіпоксичних ембріонах була на 23 % менше. Лівий шлуночковий систолічний тиск був на

22 % нижче, і відношення серцевої ваги до ваги тіла було на 14 % більше. Ці дослідження вказують, що помірна гіпоксія протягом ембріонального розвитку викликає зрушення в кардіальній і судинній функції й структурі й зачіпає гемодинамічну регуляцію.

Вплив кисню зі споживаного повітря позначається на частоті серцевих скорочень (ЧСС). Вченими виявлялася ЧСС на гіпоксію й гіпероксію протягом раннього серцевого розвитку в ембріона курчати [225]. ЧСС вимірялася з 3-го по 9-й день інкубації курчати при 38 градусах Цельсія. Ембріони інкубувались у стандартних умовах (контроль) і піддавалися гіпоксичному (10 % O₂) або гіпероксичному (100 % O₂) впливу, протягом якого ЧСС безупинно моніторувалась. Контрольна група показала приблизно 150 ударів у хвилину в 3-й день інкубації й 240 ударів у хвилину в дні з 7-го по 9-й. ЧСС у дуже ранніх ембріонах показала наявність помірних реакцій на гіпоксію, а на більше пізніх строках інкубації гіпоксична експозиція викликала глибоку брадикардію, що часто закінчувалася смертю зародка. Тобто, ріст ембріона підвищує вимоги до одержання кисню й зростання гіпоксичної чутливості. Дані ряду інших дослідників також підтверджують вплив гіпероксії на збільшення ембріонального росту, а гіпоксія сповільнює ріст і зменшує вагові показники окремих органів і всього ембріону в цілому [273]

Ефекти гіпоксії на різні параметри й функції мембрани клітин серця вивчалися на 7-у та 19-у добу ембріогенезу курчати [206]. Основні зміни спостерігалися в деполяризації мембран клітин і зменшенні тривалості потенціалу дії, а також у зменшенні концентрації іонів калію й збільшенні іонів натрію. Ці зрушення були більше явними в серцях ембріонів 19-тої доби розвитку ніж в 7-ми добових серцях. Дослідники прийшли до висновків, що кардіогенез більш чутливий до впливу гіпоксії на більш пізніх строках розвитку. Розходження може бути пояснене тим, що ранні серця є здатними споживати більше глікогену протягом гіпоксії.

Ці гіпотези підтверджуються електрономікроскопічними дослідженнями раннього міокарда видатними вченими: Хлопоніним П.А. [115], Гореловою Н.М. [17, 18, 22], та закордонними дослідниками [251, 252, 304, 317]. Передфункціональний період кардіогенезу характеризується самими інтенсивними процесами диференціювання кардіальних міоцитів і нагромадженням енергійного матеріалу. Зі зростаючою функціональною активністю трубчастого серця кількість і розмір крапель ліпиду в цитоплазмі кардіоміоцитів зменшується, що говорить про використання ліпідів як основного джерела енергії. У період формування серця трабекулярний міокард шлуночків і міокарда передсердь, що виконує основне функціональне навантаження, характеризується значним змістом гранул глікогену [115]. Гостре зменшення вмісту глікогену наприкінці ембріонального періоду, імовірно, викликає гіпоксію, появу легеневого подиху й переходу до іншого типу енергетичного обміну.

Цікавими на наш погляд здаються також роботи по дослідженню процесів формування та порушень формування магістральних судин серця таких як аорта та легеневий стовбур, що є похідними конотрункусу ембріонального серця [202, 293]. Досліджуючи формоутворюючі процеси виникнення шляхів відтоку у птахів та ссавців, виявлені були унікальні властивості міоцитів тієї частини серцевої трубки, що становить у майбутньому аорту та легеневий стовбур на відміну від кардіоміоцитів передсердь та шлуночків. Кардіоміоцити шляхів відтоку зникають протягом раннього кардіогенезу завдяки запрограмованій смерті (апоптозу), що призводить до перемодельовання єдиного конотрункусу на аорту та легеневий стовбур та обертання цих судин навколо довгої вісі серця. Використовуючи індикатори гіпоксії тканини, вчені дійшли висновку, що міокардіальна гіпоксія може стати пусковим механізмом для перемодельовання крупних судин та порушення місця їх відходження. Наступні дослідження у цьому напрямку тієї ж авторської групи [240] дозволили запропонувати модель, в

якій міокардіальна гіпоксія викликає залежне від апоптозу перемодельовання шляхів відтоку пташиного серця.

Хоча хронічну пренатальну гіпоксію вважають основною причиною постійної легеневої артеріальної гіпертензії немовляти, експериментального дослідження після хронічної внутрішньоматкової гіпоксії не було проведено. Дослідники [271] висунули гіпотезу, що хронічна пренатальна гіпоксія викликає зміни в легеневій судинній мережі ембріона курчати. Вони аналізували легеневу артеріальну реактивність і серцеву морфологію ембріонів курчати, витриманих з 16-го по 19-й день інкубаційного періоду під нормоксією (21 % кисню) або гіпоксією (15 % кисню). Гіпоксія збільшила летальність (0,46 проти 0,14; $P < 0,01$) і знижувала масу тіла 19-денних ембріонів, що пережили ($22,4 \pm 0,5$ г. проти $26,6 \pm 0,7$ г.; $P < 0,01$). Гіпоксичні серця показали збільшення товщини правої й лівої шлуночкової стінки. Дослідники припустили, що у ембріонів курчати хронічна помірна гіпоксія протягом інкубації швидкоплинно зменшила легеневу артеріальну реактивність й викликала бівентрикулярну кардіальну гіпертрофію.

1.3 Використання імуногістохімічних маркерів для визначення впливу тератогенів на кардіогенез

Центральною проблемою серцево-судинної галузі досліджень є питання про те, як клітини реагують на стрес. 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, який викликає різким підвищенням температури. Гіпертермія призводить до втрати молекулою білка його специфічної форми та здібності до виконання своїх функцій у клітині. БТШ (HSP - heat shock protein), які циркулюють у

міжклітинній рідині, оточують клітину ззовні і 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 [256, 258, 260, 263, 266, 247]. 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 [214, 226, 227]. Ідентифікація та характеристика факторів транскрипції, які регулюють експресію генів цими формами стресів (гіпоксія, гіпертермія) повинні значно сприяти подальшому розумінню механізму стрес-реакції. Вибіркове виділення HSP білків відіграє важливу роль у механізмах кардіозахисту, бо вони приймають участь у адаптаційних реакціях [169, 171, 196, 207].

Апоптоз - запрограмована загибель клітин у відповідь на зовнішні або внутрішні сигнали [88, 90, 264, 277, 291]. Апоптоз відбувається під час нормального розвитку, але може бути результатом раку, вірусного імунного дефіциту, відповідною реакцією на зовнішній вплив [15, 18, 90, 95, 301]. Існують два основних шляхи апоптозу в клітині: мітохондріальний шлях і шлях через рецептори апоптозу (смерті) [275, 277, 279, 280]:

1. Рецептори апоптозу – родини (сімейства) білків CD95 і TNF-R (фактор пухлинного некрозу).

2. Мітохондріальний шлях. Мітохондрії виконують центральну роль в апоптозі, при цьому спостерігається збільшення проникності мітохондріальної мембрани. Баланс між про- і анти-апоптозних членів родини Bcl-2 регулює вихід про-апоптозних речовин з мітохондрій, що ведуть до запуску апоптозу, таких як АІ, ендонуклеаза G і цитохром С. Витік

цитохрома-С із мітохондрії приводить до утворення апоптосоми в цитоплазмі, що активує каспазу-9 і запускає клітинну смерть.

Обидва шляхи приводять до активації каспаз і запуску каскаду реакцій, що призводять до загибелі клітини. Каспази (caspase) – білки-ферменти, що розщеплюють, по залишкам аспартата. Вони містять цистеїнові залишки на своїх активних центрах. Ізоформи каспаз ведуть до апоптозу. Вони можуть бути активовані двома шляхами: через рецептори апоптозу й мітохондрії.

Перша відкрита каспаза - Ced-3 (Cell Death-3), виявлена у нематоди *C. elegans*. Мутація Ced-3 запобігала загибель 131 клітини в процесі нормального розвитку нематоди. Гомолог Ced-3 у ссавців - інтерлейкин-1альфа-перетворюючий фермент (ICE) і був пізніше названий інгібітором каспази [248].

Відомо 14 каспаз, які підрозділяються на ініціатори, ефектори й стимулятори. Ініціатори (каспаза-8 і -9) розщеплюють і активують каспази ефектори (каспаза-3). Ефектори розщеплюють різні білки, що веде до загибелі клітини. Активація каспаз веде до запуску протеолітичного каскаду реакцій, що веде до загибелі клітини. При цьому одні каспази активують інші - ампліфікація сигналу.

Каспази - сімейство цистеїнових протеїназ, головні ефектори апоптозу, існують у клітині як неактивні проформи, які розщеплюються на активні форми ферментів, активуючи апоптоз. Руйнування клітинних структур при апоптозі проявляється наступними процесами [171, 174, 215, 275]:

1. Фрагментація хромосомної ДНК - розщеплюється каспазою-3 вивільняючи CAD - фактор фрагментації ДНК, котрий розірве зв'язки ДНК між нуклеосомами;
2. Інактивація ферментів залучених у репарацію ДНК;
3. Інактивація білків залучених у реплікацію. Каспази можуть інактивувати ДНК, сприяючи руйнуванню ДНК;
4. Руйнування структурних ядерних білків. Каспаза-6 руйнує ядро, що призводить до конденсації хромосом;

5. Чутливість клітин до стимулів змінюється залежно від експресії про- і анти-апоптозних білків (Bcl-2 - білок інгібітору), серйозності стимулів і стадії клітинного циклу;

6. Розпад клітин на везикули, перехід фосфатидилсерина із внутрішнього монослою цитоплазматичної мембрани в зовнішній монослой, зменшення обсягу клітини, зморщування цитоплазматичної мембрани, конденсація ядра (апоптозні тільця), фагоцитоз макрофагами й клітинами-сусідами.

Ініціаторами апоптозу можуть бути:

1. Зовнішні сигнали (зв'язування ліганду, що індукує смерть рецептором на клітинній поверхні).

2. Гранзим В може доставлятися в клітини цитотоксичними Т лімфоцитами, коли вони розпізнали інфіковану клітину, активує каспази-3, 7, 8 і 10.

3. Клітинний стрес - радіація, хімікалії, вірусна інфекція, недостатність фактора росту, кисневий стрес. Якщо мітохондрії не справляються з видаленням активних форм O_2 , останні ініціюють відкриття пор у зовнішній мембрані й вихід у цитозоль білка, відповідального за каскад реакцій, які ведуть до синтезу протеаз, нуклеаз.

4. Мітохондрія може бути ключовим регулятором каспазного каскаду й апоптозу - рятування від цитохрома С у мітохондрії може вести до активації каспази 9 і потім каспази 3. Цей ефект досягається через утворення апоптосоми - мультипротеїнового комплексу що включає цитохром С, прокаспазу 9 і АТФ [275].

Апоптосома утворюється після вивільнення з мітохондрії цитохрому С. Цитохром С звільняється з мітохондрій, зв'язуючись із цитозольним білком Араф-1. Ця взаємодія змінює конформацію Араф-1 яка стабілізується зв'язуванням АТР дозволяючи молекулам Араф-1 асоціювати один з одним у колесоподібний комплекс складається з 7 молекул. Араф-1, цитохром С і АТР - апоптосома, що приєднує 7 молекул прокаспаз-9 [215].

bcl-2 - сімейство білків регулятори апоптозу (bc-2, bcl-XL – противоапоптозні), (Bad, Bax - проапоптозні). Чутливість клітин до апоптозних стимулів може залежати від балансу противо- і проапоптозних bc-2 білків. При стресі проапоптозні bc-2 білки переміщуються на поверхню мітохондрій, інактивуючи антиапоптозні білки, що призводить до утворення пор у мітохондріях і випуску цитохрому C та інших про-апоптозних молекул, що в свою чергу приводить до формування апоптосоми [88, 279, 291, 296].

Таким чином, апоптоз викликається різними сигналами: зв'язуванням з рецепторами специфічних кілерних лігандів, недостатчею факторів росту, ушкодженнями ДНК і руйнуваннями цитоскелету, гіпоксією, гіпертермією й іншими несприятливими умовами [36]. У регуляції апоптозу виділяють два основних етапи: фазу індукції і фазу екзекуції. Остання здійснюється шляхом активації каспаз - сімейства цистеїнових протеїназ, що розщеплюють свої субстрати за залишками аспарагінової кислоти. Каспази присутні в цитоплазмі у вигляді проензимів і активуються до повністю функціональних протеаз шляхом розщеплення проензиму на більшу й меншу субодиниці. Розщеплення прокаспаз можуть здійснювати різні протеази, у тому числі й інші каспази. Механізм розщеплення каспаз 3, 6, 7 здійснюється каспазою 9, активація якої ініціюється виходом з мітохондрій протеази AIF (Apoptosis Inducing Factor) і/або цитохрома C. Проникність мітохондріальної мембрани для AIF і цитохрома C регулюється білками сімейства Bcl2. Це сімейство структурно подібних білків включає більше двох десятків членів, у тому числі продукти протоонкогенів bcl2 і bcl-x, що володіють здатністю блокувати апоптоз, і пухлинний супресор Bax, навпаки, індукуючий апоптоз [276, 277, 279, 296, 301]. Передбачається, що антиапоптогенні молекули Bcl2 і Bcl-x, локалізуючись у мембранах мітохондрій, закривають канали, скрізь які здійснюється викид цитохрома C і/або AIF. Bax, що перебуває в нормі в певних компартментах цитоплазми, при апоптогенних сигналах переміщується в мітохондріальні мембрани, де він, взаємодіючи з інтегральним білком зовнішньої мітохондріальної мембрани, стимулює

відкриття каналу, через який секретується цитохром С. Крім того, Вах утворює гетеромірні комплекси з білками Bcl2 та Bcl-x, що, можливо, відкриває закриті до цього канали [215, 223, 231, 244, 266, 275].

Таким чином використання імуногістохімічних маркерів дозволяє на більш тонкому рівні відстежувати основні гістогенетичні процеси, які протікають в органі, що формується. Співставлення таких процесів як проліферація та апоптоз дасть уяву про напрямки розвитку та диференціювання як окремого органу так і ембріона загалом. В межах пошуку даних наукової літератури українського наукового товариства ми зустріли лише поодинокі свідчення про використання гістохімічних методів дослідження у ембріонів тварин [70] та імуногістохімічних маркерів у ембріонів та плодів людини [20, 21, 23, 96, 122] в дослідженні питань кардіогенезу. Використання маркерів ендотелію - CD 34 дозволяє відстежити початкові етапи ангіогенезу та формування ендокарду на етапах раннього кардіогенезу. За результатами імуногістохімічних досліджень, на 5 тижні ембріогенезу людини в інтратрабекулярному міокарді та в право-, лівошлуночковому відділах міжшлуночкової перегородки було відсутнє накопичення мітки CD 34-маркеру ендотелію. У субепікардіальних відділах обох шлуночків і в проміжному відділі міжшлуночкової перегородки (МШП) спостерігалися поодинокі сформовані примітивні гемокапіляри, в просвіті яких знаходились формені елементи крові. У даний період розвитку в цих зонах переважали мічені CD 34 клітини, які ще не утворювали просвіту судин. Вони пронизували міокард у вигляді міжклітинних тяжів. Такі спостереження про особливості первинного ангіогенезу, отримані при ультраструктурному аналізі сердець ембріонів людини протягом 4-7 тижнів внутрішньоутробного розвитку, свідчать, що утворення первинних мікросудин типу протокапілярів відбувається внаслідок каналізації міжклітинних щілин у зонах агрегації веретеноподібних клітин мезенхіми. Найбільш стрімке збільшення показника відносного об'єму ендотелію в ділянках серця людини, що оцінювався за накопиченням маркеру CD34,

спостерігалось на стику ембріонального і плодового періодів. У серці 10-тижневих плодів людини у компактному та інтраатрабекулярному міокарді цей показник збільшувався у середньому в 3 рази, у проміжному відділі міжшлуночкової перегородки - в 2,7 рази у порівнянні з 8 тижнем ембріонального розвитку [19, 22, 95]. Дані про використання цих маркерів при дослідженнях кардіогенезу у лабораторних тварин відсутні.

Дослідження експресії віментину, спрямоване на вивчення процесів міграції та диференціювання клітин мезенхімного походження, показали суттєве зростання відносного об'єму віментин-позитивної тканини у міокарді з 6 тижня ембріогенезу людини [190, 191, 193, 267]. До кінця ембріонального кардіогенезу цей показник збільшився в 2,6 рази у вільній стінці обох шлуночків і в 2,8 рази – у проміжній зоні міжшлуночкової перегородки (МШП). При вивченні проліферативної активності за допомогою маркера Ki-67 на 5 тижні ембріогенезу людини максимальні значення показника спостерігались у міокарді МШП. З 6 тижня ембріогенезу відбувалася редукція накопичення ядерної мітки до маркера Ki-67 у всіх вивчених ділянках. Максимальні показники Ki-67-позитивних клітин спостерігались у базальному відділі МШП, які розташовувались у вигляді скупчень. В інших зонах МШП та в компактному міокарді шлуночків зустрічались окремо розташовані Ki-67-позитивні клітини. Але ці дослідження з використанням імуногістохімічних методів стосувались в основному перегородок серця людини в нормі і можуть служити відправною точкою для порівнянь впливу тератогенів на гістогенетичні процеси кардіогенезу при їх порушенні в експериментальних роботах [17, 22, 118].

Виявлення в зарубіжних наукових джерелах відомостей щодо використання методів імуногістохімії в ембріології показали, що останні використовувались для уточнення таких показників як індекс проліферації [194, 189], напрямку апоптозу [174, 192, 215, 217, 223, 231], ступінь диференціювання судин [182, 244, 265, 268], вияву адаптаційних реакцій, тощо [187, 228, 233]. Не зустріли ми спроб виявити критичні періоди у

розвитку того чи іншого органу, або термінаційних періодів впливу таких тератогенів як гіпоксія та гіпертермія на хід раннього кардіогенезу та формування аномалій та вад розвитку серця.

Незважаючи на велику кількість робіт, присвячених вивченню проблем розвитку серця, є одиничні дослідження які встановлюють етапи кардіогенезу в ембріогенезі різних видів тварин [35, 39, 43, 46, 110, 309, 310]. Проте, дані, які зустрічаються в літературі, у ряді випадків важко або неможливо співставити. Це можна пояснити тим, що в дослідженнях автори недостатньо приділяли увагу раннім стадіям розвитку цього важливого органа. Однак основною причиною слід визнати відсутність чітко встановлених термінів та критичних періодів кардіогенезу. Особливо це сьогодні стає актуальним у зв'язку з відсутністю даних про вплив різних фізичних факторів в різні періоди ембріогенезу на розвиток окремих органів та формування природжених вад розвитку. При спробі зіставити одержані в морфологічних дослідженнях дані з результатами, які отримані на різних тваринах, виникають певні труднощі у зв'язку з відсутністю паралельності етапів розвитку [35, 110, 125, 149, 198, 199, 282]. Враховуючи це, першочерговим є стандартизація параметрів розвитку серця різних тварин.

Успіхи світової медицини у діагностиці та хірургічній корекції уроджених вад серця та магістральних судин досить значні [32, 53, 79, 114, 234]. Однак висока питома вага смертності хворих з цією патологією доводить необхідність продовження досліджень у галузі виявлення причин виникнення та механізмів формування, в тому числі і шляхом експериментального моделювання уроджених вад серця [75, 131, 132, 176]. Наявність моделі захворювання дозволить не тільки покращити техніку хірургічного втручання, простежити ряд функціонально-морфологічних показників, але й визначити оптимальні терміни виникнення та патогенезу аномалій розвитку серця.

Тому задача виявити основні критичні періоди розвитку серця протягом раннього кардіогенезу та термінаційні періоди впливу на

кардіогенез гіпоксії та гіпертермії за допомогою імуногістохімічних маркерів на сьогоднішній день виглядає актуальною.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом для даного дослідження були серця двох об'єктів: ембріонів курей породи білий леггорн та ембріонів білих лабораторних щурів. Комісією з біоетики Дніпропетровської державної медичної академії (протокол № 7 від 27.04.06р.) встановлено, що проведені наукові дослідження зародків експериментальних тварин відповідають етичним вимогам згідно наказу МОЗ України № 231 від 01.11.2005 року. Дослідження виконувались у відповідності до принципів Хельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000р.), Конвенції Ради Європи у правах людини та біомедицини (1997р.), відповідних положень ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983р.), «Загальним етичним принципам експериментів над тваринами», що затверджені I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001р.) згідно з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших навчальних цілях» (Страсбург, 18.03.1986р.). Перед початком експерименту на щурах всі тварини були оглянуті, зважені, враховувався їхній вік, рухова активність та стан шкіри. Після зовнішнього огляду та вибраковки починали експеримент одночасно з контрольною групою. До та під час експерименту щури знаходились в віварії ДДМА при температурі 20-25°C, вологості не менш 50%, у провітрюваних приміщеннях та світловому режимі день/ніч в стандартних пластикових клітках не більш 5 осіб в кожній, на стандартному раціоні харчування. Всі тварини, що приймали участь в експерименті, мали здоровий вигляд і були активні.

Яйця курей породи білий леггорн уважно оглядали, вибраковували яйця з напливами шкаралупи та деформовані, потім інкубували при 38°C та відносній вологості 80%. Стандартизація термінів розвитку ембріонів здійснювалася за допомогою стандартних таблиць нормального розвитку за

Hamburger і Hamilton (НН) [76]. Макроскопічне дослідження проводилося для встановлення стадії розвитку, дослідження зовнішньої форми зародків для встановлення вад розвитку кінцівок, головної та тулубової частин зародків. Дослідження зовнішньої форми серця щойно вилучених зародків, після фіксації рідиною Буену та після тотального забарвлення гематоксиліном цілого ембріону, проводили при світлі, що падає, та при світлі, що проходить.

Для більш детальної оцінки формування зовнішніх вад та 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, формування крила, дзьоба, поява пір'євих сосочків [76, 83, 84].

2.1. Матеріал дослідження

Усього було досліджено 700 об'єктів ембріонів курей та щурів. З них 350 ембріонів курки від 4 діб інкубації до 20-21 доби інкубаційного розвитку (50 – контрольна група, 150 – після впливу гіпоксії, 150 – після впливу гіпертермії); 350 ембріонів щура від 9 до 21 доби ембріогенезу (з них 50 – контрольна

група, 150 – після впливу гіпоксії, 150 – після впливу гіпертермії). Вибрані нами об'єкти характеризуються цілим рядом переваг та є класичними об'єктами ембріологічних досліджень.

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. Одним з немало важливих факторів є також те, що зародок курки доволі великий, добре помітний навіть неозброєним оком. Доступність зародка при вилученні з яйця або з матки та швидкість періоду ембріогенезу (21 доба) також є перевагою. Матеріалом для дослідження впливу гіпертермії та гіпоксії послужили 300 ембріонів курей. Інкубація проводилася в лабораторних умовах за загальноприйнятими методиками [76]. Розподіл матеріалу різних об'єктів за стадіями розвитку та термінами інкубації представлено у таблицях (табл. 2.1. та 2.2).

Розподіл матеріалу експериментальної групи ембріону курки за термінами забору та співвідношення терміну інкубації до стадії розвитку за НН представлено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1.

Кількісний розподіл матеріалу експериментальної групи за строками ембріонального розвитку курки

Термін інкубації (доба)	Стадія розвитку за НН	Кількість об'єктів
4 -8	24-34	200
9-20	35-46	100
Усього		300

Ідентифікація вад розвитку після впливу гіпоксією або гіпертермією проводилася при порівнянні з контрольною групою (50 ембріонів), що дозволило виявити як зовнішні вади розвитку, так і внутрішні. Наявність

контрольної групи дозволила порівняти також відставання в етапах розвитку після гіпертермії та гіпоксії, а також формування виражених каліцтв.

Терміни впливу тератогенами були обрано не випадково. За результатами даних наукової літератури та попередніх власних досліджень 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. Ці моменти диференціювання та септації серця ембріона були обрані як можливі умовні критичні періоди кардіогенезу. Тобто найбільшу увагу ми приділяли термінам раннього кардіогенезу як у дослідженнях з ембріонами курки так, і з ембріонами щура. Розподіл ембріонального матеріалу щура представлено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2.

Кількісний розподіл матеріалу експериментальної групи за строками ембріонального розвитку щура

Термін розвитку (доба)	Стадія розвитку	Кількість об'єктів
11-14	12-17	190
14, 5 - 20	17-20	110
Усього		300

Такий розподіл термінів впливу на хід нормального загального розвитку та кардіогенезу дозволив визначити періоди, в які дія фізичних факторів була найбільша і призводила до формування значних відхилень в ембріогенезі піддослідних тварин.

2.2. Методи дослідження

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

2.2.3. Методи моделювання:

Інкубація. Метою інкубації було отримання курячих ембріонів з фіксованими термінами розвитку. Інкубацію проводили в лабораторних умовах за загальноприйнятими методиками [29, 30, 76]. Вибірка і стандартизація термінів розвитку ембріонів здійснювалися за допомогою стандартних таблиць нормального розвитку Гамбургера і Гамільтона (Hamburger et Hamilton (НН)) [76, 204]. Під час інкубації проводили вплив гіпертермією (150 ембріонів) та гіпоксією (150 ембріонів).

Моделювання гіпоксії та гіпертермії. Моделювання гіпоксії у ембріонів курей відбувалося на 150 ембріонах, розділених за часом впливу гіпоксією на 3 групи: 1 група - вплив на 2-гій добі інкубації (30 ембріонів); 2 група - вплив на 3-тій добі інкубації (80 ембріонів); 3 група - вплив на 5-тій добі інкубації (40 ембріонів) протягом 6-10 годин у герметично закритій камері – за загальноприйнятими моделями формування гіпоксичного стану ембріонів курки [241, 270, 290, 292, 306].

Матеріалом для моделювання впливу гіпертермією стали 150 ембріонів курки. Вплив гіпертермією проводився в ті ж самі часові терміни інкубації впродовж 3-х годин підвищенням загальної температури в інкубаторі до 45 градусів Цельсія за визнаними моделями гіпертермії ембріонів курки [242, 235, 262, 263, 270, 290]. Після тригодинного впливу підвищеної температури нами на рівних проміжках часу проводилися забори ембріонального матеріалу для зовнішнього й наступного більш детального внутрішнього та гістологічного вивчення. Значна частина матеріалу гинула на різних стадіях інкубації

(дані по смертності ембріонального матеріалу представлено у розділі власних досліджень).

Терміни впливу в різні проміжки розвитку ембріону показали, що результат є неоднозначний. Найбільша кількість вад розвитку самого ембріона та серця припадала на ту групу, де термін впливу - 3-тя доба інкубації. До цього періоду ембріон являє собою нестабільну систему, перегрів якої приводить до загибелі 94% усього матеріалу, тому дані строки впливу були нами виключені з досліджень.

У період інкубації після 55 годин уже сформована 26 пара сомітів і відбуваються активні морфологічні зміни в ембріональному серці. У цей час починається заселення мезенхімними клітинами ендокардіальних подушок, їхній активний ріст і наближення одна до одної, що надалі приводить до поділу загального дотепер атріовентрикулярного каналу на правий і лівий, тобто починаються процеси септації серця. Наступним важливим етапом морфогенезу серця служить закладка міжпередсердної перегородки; після 4-ї доби інкубації в нормі починає формуватися аорто-легенева перегородка з наступною закладкою клапанів великих судин. Ці часові моменти були позначені нами як можливі критичні періоди розвитку серця й перевірка порушення розвитку після впливу тератогеном підтверджує або спростовує значення того або іншого строку в кардіогенезі.

Перший вплив гіпоксією та гіпертермією на організм самиці-щура проводився на 8-9-й добі, а другий на 12-й добі вагітності. Контрольна група склала 50 щурів-самиць, які не підлягали під час вагітності впливу зазначених тератогенних факторів. Цей час відповідає стадіям кардіогенезу, що передують септації та подальшому диференціюванню структур серця, тобто цей період розвитку аналогічний відповідним стадіям розвитку ембріона курки.

Підвищення температури самки викликали шляхом однократного внутрішньоочеревинного введення пірогеналу в дозі 3,0 мг/кг. У всіх тварин контролювали підвищення температури тіла наступного дня за допомогою електротермометра фірми "Microlife" (Швейцарія). Встановлено, що через 24

години після внутрішньоочеревинного введення щурам-самицям пірогеналу температура підвищувалася від $36,6 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$ до $38,9 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ і втримувалася на даному рівні від 18 до 26 годин. У нашому дослідженні усі самки вижили. Забір матеріалу проводився, починаючи з 10,5 доби вагітності й до кінця пренатального розвитку (21 доба), але акцент у терміні забору матеріалу надавався важливим етапам кардіогенезу, тобто до 18 доби. На цей час вже або сформувалась вада розвитку серця, або вона не сформується.

Вплив гіпоксією на ембріонів щура проводився згідно методики Н.Ф. Іваницької [31] та методичних рекомендацій Міністерства охорони здоров'я України (2003р.) підшкірним введенням нітрату натрію (50 мг/кг) одноразово. Тобто формували гемічну гіпоксію щура та ембріонів. Ідентифікація вад розвитку проводилася при порівнянні з контрольною групою та відповідно таблицям нормального розвитку [76], що дозволило зрівняти як зовнішні ознаки порушення розвитку ембріона в цілому, так і внутрішні зміни в ході кардіогенезу. Наявність контрольної групи дозволяла виявити відставання в етапах розвитку після впливу тератогенами [261].

2.2.2 Морфологічні методики:

Препарування. Метою цієї методики було одержання цілих ембріонів на ранніх стадіях розвитку й ізольованих сердець ембріонів курки та щура на більш пізніх термінах розвитку. Ембріони з раннім терміном розвитку фіксувалися цілком, а значні за розміром підлягали препаруванню, тобто серця ембріонів вилучалися і фіксувалися окремо. Проводилось також вимірювання та зняття вагових показників як цілих ембріонів, так і відокремлених сердець, що дало можливість вирахувати кардіофетальний індекс.

Гістологічні методики:

Виготовлення гісто-топографічних зрізів, світлова мікроскопія (забарвлення оглядовими методами та на виявлення окремих елементів). Метою даної методики стало уточнення просторової орієнтації і співвідношення структур камер серця, що формується з іншими органами

грудної клітини та порушення нормального розташування органу в порівнянні з контрольною групою. Дана методика дозволяла співставити порушення просторової організації елементів ембріонального серця після впливу гіпоксією та гіпертермією і застосовувалася нами тільки на ранніх стадіях розвитку ембріона, доки дозволяв його розмір. Вилучені ембріони фіксували рідиною Буена та заливали у парафін за загальноприйнятими методиками. Гісто-топографічні зрізи робилися завтовшки 7-10 мкм на ротаційному мікротомі. Для вивчення гістологічної будови структур серця використовували серійні гістологічні і напівтонкі зрізи, що фарбувалися гематоксиліном-еозином, залізним гематоксиліном за Гейденгайном, альціановим синім, за Ван-Гізоном, за Маллорі-Слінченком, метиленовим синім - азуром II - основним фуксином.

Виготовлення серійних гістологічних зрізів, світлова мікроскопія при використанні оглядових видів забарвлення (залізним гематоксиліном Гейденгайна, Маллорі-Слінченко забарвлення на виявлення сполучно-тканинних елементів). Метою даної методики було виявлення на ранніх стадіях розвитку порушень на гістологічному рівні структур серця, що формуються після впливу гіпоксією та гіпертермією. Підготовка препаратів для морфометричного аналізу включала забарвлення отриманих гістологічних (товщиною 5-7 мкм) зрізів з використанням залізного гематоксиліну Гейденгайна за загальноприйнятими методиками. На пізніших стадіях розвитку використовували забарвлення за Маллорі-Слінченко, для виявлення сполучної тканини, а саме елементів колагенових та еластичних волокон, а також вад розвитку похідних мезенхіми, ендокарду та епікарду.

Виготовлення напівтонких зрізів, світлова мікроскопія (забарвлення метиленовим синім). Метою даної методики було виявлення аномалій розвитку після впливу гіпоксією та гіпертермією на тканинному та клітинному рівнях у порівнянні з нормою. Для вивчення тонких структур (ендокардіальної вистилки, епітеліально-мезенхімних перетворень, клітинний склад перегородок та стінок серця та ін.) готували напівтонкі зрізи завтовшки 1-2

мкм (епон-аралдіт; ловікрил) і використовували для стереологічного аналізу. Для виготовлення напівтонких зрізів фрагментів серця шматочки тканини об'ємом близько 1 мм^3 фіксували в 2,5 % розчині глютаральдегіда, виготовленому на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) протягом 2 годин при кімнатній температурі. Дофіксацію проводили 1% розчином чотирьохокису осмію на буфері протягом 2-х годин. Після зневоднення шматочки тканини заключали у суміш епону й аралдіту відповідно до рекомендацій [169, 170].

Морфометрія, статистичний аналіз

У рамках морфології системне дослідження характеризується двома основними вимогами: кількісним описом властивостей структурно-функціональних елементів об'єкта і визначенням тісноти зв'язку між ними [5, 6, 55, 58, 59]. При цьому першу частину системного дослідження виконують за допомогою методів кількісної морфології. При проведенні морфологічного дослідження серця, що розвивається, керувалися загальними принципами стереометричного аналізу, викладеними Г.Г. Автанділовим [5, 6, 7], Г.С. Кір'якуловим з співавт. [34]. Враховуючи специфіку поставлених задач, в даному дослідженні була проведена кількісна оцінка наступних показників на етапах кардіогенезу:

- товщина серцевої стінки (передсердя та шлуночка) на стадіях ембріогенезу в нормі та при дії гіпоксії і гіпертермії (мкм), $M \pm m$;
- товщина перегородок серця (міжшлуночкової та міжпередсердної) на стадіях ембріогенезу в нормі та при дії гіпоксії і гіпертермії (мкм), $M \pm m$;
- питома площа судин міокарду шлуночків в нормі та при дії гіпоксії і гіпертермії –(%), $M \pm m$;
- діаметр конотрункусу та аорти і легеневого стовбуру в нормі та при дії гіпоксії і гіпертермії (мкм), $M \pm m$;
- вагові показники ембріона в цілому (волога вага) в нормі та при дії гіпоксії і гіпертермії (мг), $M \pm m$;
- вагові показники ізольованого серця ембріона (волога вага) в нормі

- та при дії гіпоксії і гіпертермії (мг), $M \pm m$;
- кардіофетальний індекс (%), $M \pm m$;
 - індекс апоптозу, проліферації у ділянках серцевої стінки ембріона щура (%), $M \pm m$;
 - питома площа зон стулок передсердно-шлуночкових клапанів на стадіях ембріогенезу в нормі та при дії гіпоксії і гіпертермії (мкм), $M \pm m$;

Площу зон стулок стінок та клапану серця, клітин сполучної тканини, стінки конотрункусу визначали методом крапкового рахунку [7, 57, 58, 87, 104] при використанні окулярних вставок на серійних гістологічних та гістотопорафічних зрізах. Використовуючи метод крапкового рахунку (метод тест-систем) обчислювали питому площу та питому кількість зазначених структур ембріонального серця. Питома площа обчислювалася як співвідношення кількості крапок, що припадають на структуру, що досліджувалась до загальної кількості крапок, що припадають на весь зріз. Питома кількість мезенхімних клітин вираховувалася як співвідношення кількості клітин до площі, що вони займають.

Відносні об'єми ендотелію, судин та м'язової долі стінки серця визначали методом крапкового рахунку [6, 101, 106] при використанні окулярних вставок за формулою:

$$V_v = \frac{P_i}{P_t}, \quad (2.1)$$

де V_v - відносний об'єм структури;

P_i - кількість точок перетину ліній тест-системи, які припадають на структуру;

P_t – загальна кількість точок перетину ліній тест-системи.

На думку Г.Г.Автанділова [5, 6, 7], морфолого-математичний аналіз виявлених структурно-функціональних зсувів є складовою частиною комплексного морфологічного дослідження. Цей аналіз складається з

декількох етапів, кожний з яких вирішує специфічні задачі. Для визначення необхідного об'єму вибірки заздалегідь визначали наближене значення середньої арифметичної і середнього квадратичного відхилення [6, 7]:

$$x = \frac{x_{\max} + x_{\min}}{2} ; \quad (2.2)$$

$$s_x = \frac{x_{\max} + x_{\min}}{K} , \quad (2.3)$$

де x – середня арифметична;

x_{\min} і x_{\max} – ліміти значень параметра;

s_x – середнє квадратичне відхилення;

K – коефіцієнт, що встановлюється в залежності від об'єму вибірки.

Визначення необхідного об'єму вибірки встановлювали за формулою:

$$n = \frac{t^2 s_x^2}{\Delta^2} , \quad (2.4)$$

де n – чисельність вибірки;

t – нормоване відхилення, з яким пов'язаний той чи інший рівень значущості;

s_x – вибіркова дисперсія;

Δ - величина, що визначає межі довірчого інтервалу.

У тому випадку, якщо отримане в роботі статистичне розподілення відповідало нормальному розподіленню Гауса, стереологічні дані зазнавали статистичної обробки, що включала визначення наступних характеристик: x - середня арифметична; s_x^2 - дисперсія; s_x - середнє квадратичне відхилення; C_v - коефіцієнт варіації; s_s - помилка середнього квадратичного відхилення. Для обчислення вказаних характеристик використовували стандартні формули [57, 58, 59]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i ; \quad (2.5)$$

$$s_x^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n} ; \quad (2.6)$$

$$s_x = \sqrt{s_x^2} ; \quad (2.7)$$

$$C_v = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 ; \quad (2.8)$$

$$s_s = \frac{s_x}{\sqrt{2n}} , \quad (2.9)$$

де n – об'єм вибірки;

x_i – варіанти вибірки.

Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили з урахуванням критерію t Стьюдента, що розраховувався за формулою [58, 59]:

$$t = \frac{\bar{M}_1 - \bar{M}_2}{\sqrt{\frac{i_{s1}^2}{n_1} + \frac{i_{s2}^2}{n_2}}} , \quad (2.10)$$

де M_1 та M_2 - середні арифметичні вибірок, що порівнюються;

m_{s1} та m_{s2} – помилки відповідних квадратичних відхилень.

Нульова гіпотеза відкидалася за умови, що критерій t Стьюдента перевищував табличні значення для відповідних ступенів свободи і 5%-го рівня значущості.

У тому випадку, якщо отримане в дослідженні емпіричне розподілення не відповідало нормальному закону, оцінку відмінностей між вибірками проводили за допомогою непараметричних критеріїв: X -критерію Ван-дер-Вардена і U -критерію Уїлкоксона (Манна-Уїтні) за технікою, викладеною у монографії [57].

У ході проведення математичного аналізу отриманих результатів розрахунки виконували за допомогою IBM PC «Pentium» при використанні відповідних прикладних програм.

2.2.3. Імуногістохімічні методи дослідження:

Використання імуногістохімічних маркерів дозволило дослідити основні гістогенетичні процеси, які відбуваються в тканинах серця, що розвивається. Ці методи використовувалися лише на серцях ембріона щура для визначення таких важливих гістогенетичних механізмів у тканинах ембріонального серця як апоптоз (генетично запрограмована загибель клітин), проліферація, ангиогенез, васкулогенез, диференціювання тканин а також їх зміни в нормі та після впливу тератогенних факторів на формування клітин та судин серця, що розвивається.

Для вивчення процесів васкулогенезу використовували цитоспецифічний маркер CD34, який накопичується і фарбує в коричневий колір судинний ендотелій [182, 307, 197, 207]. Внутрішнім контролем даної постановочної реакції є накопичення маркеру CD34 в ендокарді серця.

Проліферативну активність тканин ембріонального серця вивчали за допомогою моноклональних антитіл Ki-67 (MIB-1), які ідентифікують ядерний антиген, що присутній у більшості проліферативних клітин. Антиген Ki-67, що виявляється відповідними моноклональними антитілами, короткоживучий протеїн, який руйнується протягом 1-1,5 години. У наслідок цього Ki-67 виявляє тільки клітини, що поділяються, тому, що не встигає накопичуватись і не залишається в «спокійних» клітинах [179, 260, 238, 247].

Дослідження базового гістогенетичного процесу - запрограмованої загибелі клітин – апоптозу – проводили з використанням bcl-2 - маркеру апоптозу. Апоптоз є відповідь клітини на зовнішні або внутрішні сигнали і вплив гіпоксією та гіпертермією безумовно призводив до змін апоптотичних процесів, що і фіксували завдяки використанню маркеру bcl-2 [240, 244, 248, 264, 266, 291].

В наших дослідженнях для порівняння впливу гіпоксії і гіпертермії на хід нормального кардіогенезу ми використовували проліферативно-апоптотичний індекс, тобто співвідношення кількості клітин, що знаходяться на будь-якій стадії мітозу до кількості апоптотичних клітин $\times 100$. Даний індекс дозволяв визначити загальний напрямок розвитку ділянки серця, тобто виявити який з двох процесів превалює.

Використання маркеру HSP дозволило відстежити накопичення захисного білкового компоненту у тканинах серця [187, 227, 228, 251]. Підвищення температури призводить до змін експресії генів, що індукує синтез нових білків з характерними рисами – білків теплового шоку (БТШ), призначення яких – захистити клітинні білки від теплового шоку, що визваний 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. [233, 235, 256, 267]. 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 [233, 235, 239].

Використання імуногістохімічного маркеру α -sma, що є маркером гладенької м'язової тканини і накопичується в середньому прошарку судин дало можливість не тільки визначити основні етапи васкулогенезу, але й

дозволило відстежити диференціювання первинних судин серця, що розвивається у процесі кардіогенезу [281, 292, 306, 307].

Всі імуногістохімічні реакції проводили на парафінових зрізах сердець щура з використанням відповідних первинних антитіл (DACO) і системи візуалізації LSAB (Laballed Streptavidin-Biotin). Імуногістохімічні дослідження проводилися в діагностичному центрі ДДМА у відділку імуноморфології пухлин.

Таким чином, представлені в даному розділі матеріал і методи дослідження є послідовними етапами вирішення поставлених задач, що дозволяють здійснити системний підхід до вивчення впливу таких факторів як гіпертермія та гіпоксія на кардіогенез на етапах ембріонального розвитку.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ ГІПЕРТЕРМІЇ НА МОРФОГЕНЕЗ КУРЯЧОГО ЗАРОДКА

3.1. Вплив гіпертермії на кількісні показники розвитку

Досліджуючи пік впливу підвищеної температури на організм, що розвивається ми проводили вплив гіпертермією у різні етапи ембріогенезу. Провівши попереднє дослідження і виявивши, що найбільший розвиток аномалій при збереженні життєздатності визначався в групі, що підлягала впливу підвищеної температури на 3-й добі інкубації, саме її ми і обрали за експериментальну групу. В даному розділі представлено результати впливу на ембріогенез та кардіогенез тільки цих ембріонів. Значна частина матеріалу в наших дослідженнях гинула на різних стадіях інкубації. Розподіл матеріалу за часом загибелі представлено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Показники смертності ембріонів курей в контрольній групі та після впливу гіпертермією (% від загального числа ембріонів)

Строк інкубації	Експеримент	Контроль
4 доби	1,2%	-
5 діб	9%	-
6 діб	11,5%	-
7 діб	7,7%	-
8 діб	5,1%	-
10 діб	2,6%	2,3%
12 діб	1,3%	-
14 діб	2,6%	2,3%
16 діб	2,6%	-
18 діб		7%
20 діб	1,3%	7%
Усього	44,9%	18,6%

Напрямок збільшення смертності в контрольній і експериментальній групах був різним. Пік ембріональної смертності в експериментальній групі доводиться на 5-ту, 6-ту і 7-му добу інкубації після впливу гіпертермією на 3-ій добі, а до кінця інкубації ембріони, що вижили, гинули в незначній кількості (рис.3.1). У той же час у контрольній групі серед інтактних ембріонів пік смертності спостерігався нами на останніх стадіях розвитку, перед вилупленням. Суттєво відрізнялися і загальні показники смертності протягом усього періоду інкубації: якщо в експериментальній групі смертність сягала майже 45% від загальної кількості ембріонів, то в контрольній групі вона складала лише 18,6%.

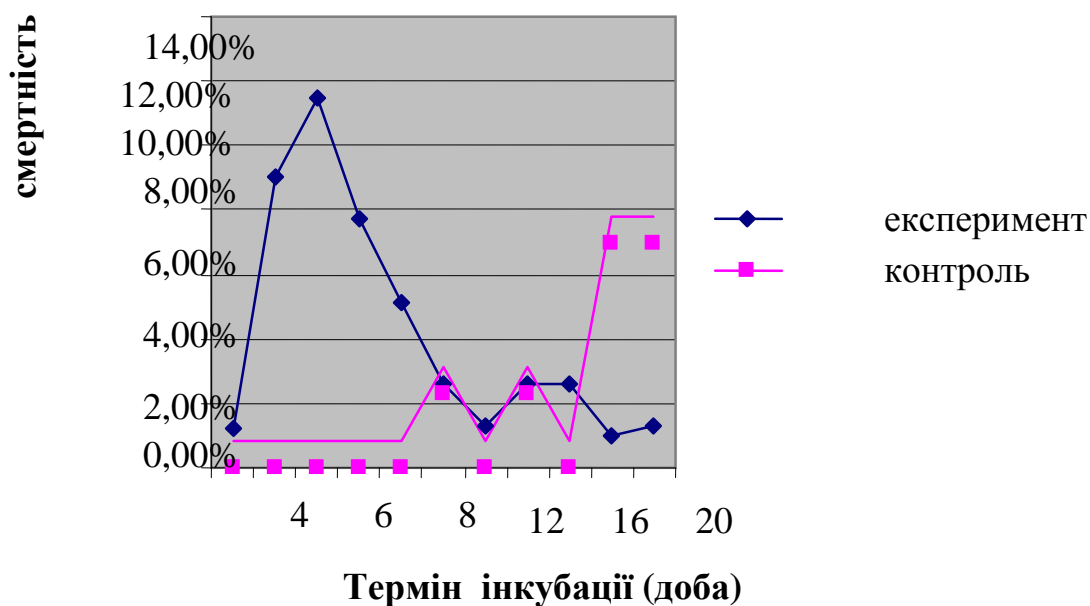


Рис. 3.1. Динаміка смертності курячих ембріонів протягом інкубації в контрольній групі та після впливу гіпертермії на 3-тю добу інкубації в експерименті.

Найвища смертність ембріонів після впливу високою температурою доводилася на 5-7-му добу інкубації, потім процес загибелі стабілізувався й до

15-ї доби вже залишався постійним, а до кінця інкубації знижувався, хоча кількість ембріонів, що вижили, залишалася вже невеликою. У контрольній же групі смертність спочатку інкубації не спостерігалася, а, починаючи з 10-ї доби, зустрічалися поодинокі випадки, найбільший відсоток загиблих курячих ембріонів зустрічався в самому кінці інкубації, що підтверджується також і даними наукової літератури.

Нами також фіксувалася волога вага ембріонів курки після 8-ї доби розвитку. Результати дослідження впливу високих температур на хід загального ембріогенезу експериментальної групи представлені у таблиці 3.2. для порівняння з ваговими показниками ембріонів контрольної групи.

Таблиця 3.1

Показники зміни маси ембріонів курей контрольної групи та в експерименті протягом ембріогенезу

Строк інкубації	Маса ембріонів (г)		Відсоткова втрата ваги в експерименті
	експеримент	контроль	
8 діб	6,4±0,3	7,3±0,5	12,3±0,2%
10 діб	8,4±0,4	9,1±0,6	7,7±0,3%
12 діб	9,3±0,7	10,3±0,6	9,7±0,6%
14 діб	14,2±0,5	16,2±0,9	12,5±0,9%
16 діб	20,3±0,8	24,2±1,3	16,1±0,8%
18 діб	24,3±1,7	26,6±1,5	8,6±0,7%
20 діб	27,6±2,6	30,5±2,9	9,5±0,6%

Як видно з результатів дослідження, вагові показники цілого ембріона теж відображають вплив гіпертермії на загальний розвиток ембріона. Вже з самого початку 8-ї доби спостерігається відставання у масі ембріона, а з 14-ї доби інкубації відставання складає вже більш 12% ваги контрольної групи та

сягає $16,1 \pm 0,8\%$ на 16 добі інкубації. Надалі втрата ваги ембріоном стабілізується та наприкінці ембріогенезу сягає 8-9,5%. Таким чином, вплив гіпертермії на хід нормального ембріогенезу проявлявся у зменшенні маси ембріонів при дії гіпертермії в порівнянні з контрольною групою.

Досліджуючи вплив високих температур на хід кардіогенезу, на більш пізніх термінах розвитку ми проводили морфометрію сердець ембріонів, та порівнювали з нормою. Під час препарування ембріонів, на терміні інкубації 10 діб та більше нами видалялися серця та окремо зважувалися, що дозволило обчислити кардіофетальний індекс, тобто співвідношення маси серця до маси цілого ембріона. Результати обрахування індексу представлені у таблиці 3.3. Загалом маса цілого ембріона та маса серця у експериментальній групі були зменшені у порівнянні з контролем, але співвідношення мас залишилося майже таким як і в нормі. Тобто на співвідношення вагових показників серця вплив гіпертермії не проявився.

Таблиця 3.2

Динаміка кардіофетального індексу ембріонів курей після впливу гіпертермією та в нормі протягом другої половини ембріогенезу

Строк інкубації (доба)	Експеримент	Контрольна група
10	$0,382 \pm 0,021$	$0,386 \pm 0,023$
12	$0,440 \pm 0,022$	$0,432 \pm 0,035$
14	$0,545 \pm 0,034$	$0,550 \pm 0,038$
16	$0,579 \pm 0,041$	$0,582 \pm 0,042$
18	$0,612 \pm 0,026$	$0,620 \pm 0,045$
20	$0,630 \pm 0,029$	$0,634 \pm 0,036$

Результати порівнянь вказують на незначне зменшення кардіофетального індексу ембріонів курки у нормі та експерименті протягом ембріогенезу.

3.2. Вплив гіпертермії на зовнішній розвиток ембріона

Порівняння цілих ембріонів після впливу гіпертермією з ембріонами контрольної групи показало, що в 31,5% випадків після впливу високою температурою спостерігається виражене відставання в розвитку на 2-3 стадії за Гамбургером й Гамільтоном (НН). Причому це відставання було більш вираженим після 10-ї доби інкубації, тобто у віддаленій післядії. Загальновизнаним критерієм для діагностики стадій розвитку до 22-ї стадії є диференціювання бруньок кінцівок. Ми спостерігали явне відставання в закладці й рості бруньок нижньої кінцівки (ноги), навіть після 3-х діб інкубації продовжувало зберігатися характерне для 21-ї стадії однакове диференціювання бруньок ноги та крила. У нормі в цей період брунька ноги вже істотно випереджає в рості бруньку крила, що і є зовнішньою ознакою нормального розвитку ембріона, тому що короткі тимчасові проміжки між стадіями не підкреслюють різницю в розмірах, масі, зовнішньому вигляді ембріона.

Із зовнішніх вад розвитку на ранніх етапах виділялися такі як порушення утворення головного вигину (у ембріонів, що підлягали дії високою температурою він був менш виражений), а також зміна згинання головного, тулубового й хвостового відділів (рис.3.2). Загальновідомо, що порушення вигину ембріону призводить до порушення органогенезу. Штучне порушення згинання ембріонів курки навіть використовувалось як методика формування вад розвитку окремих органів, в тому числі і серця. 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). Нами спостерігалось на ранніх стадіях інкубації явне зменшення кута згинання та повна відсутність скручування під впливом гіпертермії при зовнішніх ідентичних показниках розвитку ембріона в цілому (таких як маса, розмір, рівень розвитку ока та бруньок кінцівок). Для визначення порушення згинання ембріону нами проводилися дві умовні лінії – головна та тулубова. Головна лінія проходила по краніальному відділу

ембріона через край ока та була паралельна дорзальній частині голови. Тулубова лінія проходила через бруньку нижньої та верхньої кінцівки і була паралельна дорзальній частині тулуба, зверталась також увага на те, що в нормі хвіст ембріона повинен торкатися голови.

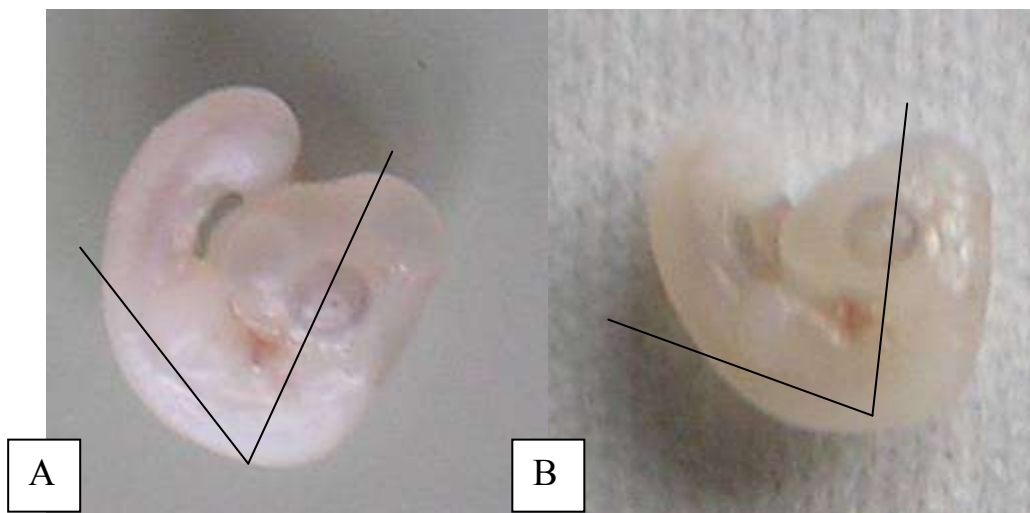


Рис. 3.2. Ембріон курки 4-ї доби інкубації.

А - нормальний ембріон контрольної групи;

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

Ці ж самі ознаки підтверджували відставання розвитку і на середніх стадіях інкубації (4-7 доба). До них додавалися інші прикмети впливу гіпертермії на хід ембріогенезу. Ембріони, які підлягали впливу високою температурою, навіть ззовні вже більш помітно відрізнялись від ембріонів контрольної групи: вони були менші за розміром та масою, кут згинання тулуба, голови та хвоста відрізняється досить виразно, спостерігалось відставання формування бруньок кінцівок (рис. 3.3). Новим характерним для цього періоду ембріогенезу показником відставання в розвитку ембріона є зменшення мозкових пухирів та недорозвинуте око. Особливо помітним було відставання у формуванні переднього мозкового пухиря, що призводило до

зміни форми голови. Кут згинання в нормі та в експерименті відрізняється ще більше ніж на ранніх стадіях ембріогенезу курки. В експериментальній групі явно кут перевищує вже 90° , тобто стає ще більшим і хвіст ембріону ще більше віддаляється від головного відділу. І знову ми спостерігали відсутність скручування самого ембріону за повздовжньою віссю (відсутність торсії). Бруньки кінцівок у ряді випадків були розвинуті типово для даної стадії розвитку, а в ряді випадків відставали на 2-3 стадії за Гамбургером та Гамільтоном (НН). Визначались також зміни з боку розвитку дзьоба.

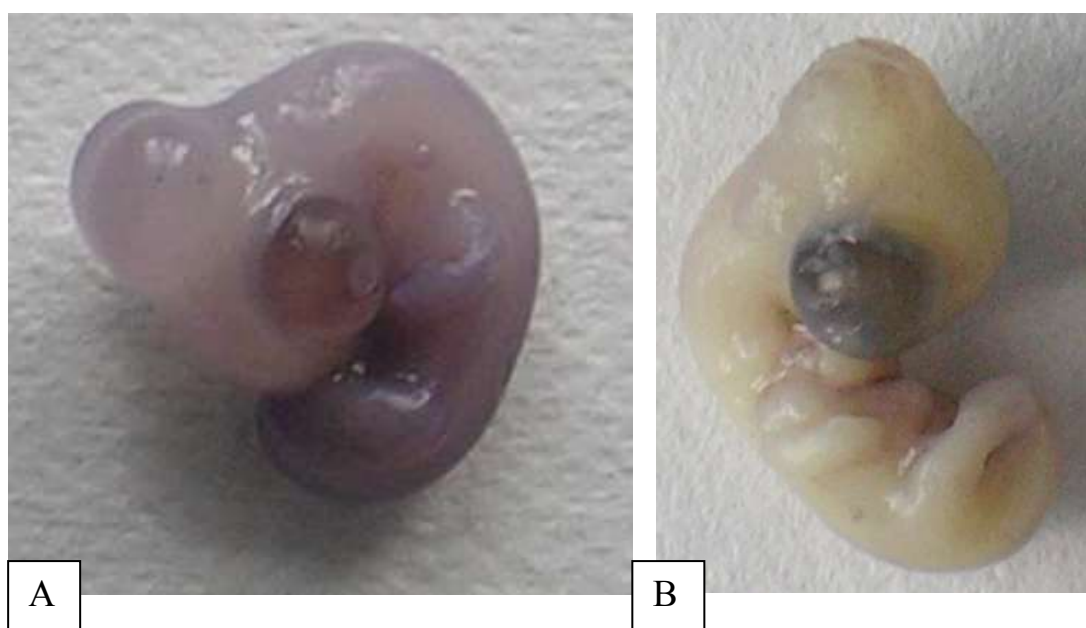


Рис. 3.3. Збільшення кута згинання ембріону курки 6-тої доби розвитку.

А - нормальний ембріон інтактної групи;

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

Зовнішньою діагностичною ознакою стадій розвитку на наступних строках служить закладка пір'я й будова повік ока (з 8-ї по 13-ту добу інкубації), а до кінця інкубації - довжина дзьоба й середнього пальця ноги. Зовнішні вади розвитку на пізніх стадіях інкубації були не так явно виражені. А можливо ті ембріони, які доживали до цих стадій розвитку, просто не мали яскраво виражених зовнішніх вад Швидше за все поява великої вади розвитку,

несумісної з життям, приводила до ранньої загибелі ембріона. На подальших стадіях розвитку серед ембріонів експериментальної групи нами відзначалося також відставання у формуванні деяких інших діагностичних ознак нормального розвитку ембріона, а саме: відсутність пір'яних сосочків, характерних для 31-ї стадії розвитку, відставання в диференціюванні пальців кінцівки (вони залишалися на рівні розвитку 29-й стадії) (рис. 3.4.).



Рис. 3.4. Уповільнене диференціювання бруньок кінцівок ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпертермією (відсутній поділ пальців ноги, характерний для даної стадії розвитку). Порушення кута згинання ембріона.

Такі показники відставання в ембріогенезі завжди супроводжувалися вже описаними ознаками, а саме: порушенням згинання та скручування ембріону, недостатнім розвитком мозкових пухирів, порушенням формування дзьоба та ока. На цьому етапі розвитку ембріону прояв вищезазначених ознак порушення розвитку зустрічався досить часто, але пізніше ці вади значно зменшувалися можливо за рахунок загибелі нежиттєздатних ембріонів. Загалом за час ембріогенезу цифра порушень розвитку таких як відставання за всіма діагностичними ознаками склала 31,5%. Самою явною ознакою як і раніше виступали порушення згинання ембріону. Серця таких ембріонів

препарувалися та підлягали подальшому детальному гістологічному дослідженню на предмет виявлення формування уроджених вад серця, або відставання у формуванні камер та великих судин, що виявлялося при співставленні їх з серцями контрольної групи.

З вад розвитку серця в дослідженні зовнішніх проявів вад нами спостерігалася ектопія серця. Ектопія серця - це патологічне положення серця, при якому воно почасти або повністю перебуває поза кістком грудної клітки - у край рідка аномалія для ссавців, але в ембріогенезі птахів зустрічається частіше. Виявити ектопію серця можливо лише після 4-5-ї доби інкубації, коли сформована передня стінка грудної та частково черевної порожнини і вже відсутня в нормі фізіологічна кила пупкового канатику. Відомо, що ектопія часто приєднується до важких аномалій розвитку внутрішньої структури серця й інших органів (тетрада Фалло, вади клапанів, дефекти перегородок). Розрізняють загрудинну (серце розташоване попереду грудної клітки), шийну (серце розташоване в шийній частині з порушенням м'яких тканин шиї) й черевну (серце розташоване в черевній порожнині без порушення м'яких тканин передньої стінки, або ззовні з порушенням тканин передньої черевної стінки у вигляді кили) ектопії. У нашому дослідженні ми спостерігали загрудинну ектопію серця у 3,6% експериментальної групи ембріонів, які підлягали впливу високою температурою (рис.3.5).

У контрольній групі ембріонів випадків ектопії серця нами не спостерігалось зовсім. У процесі досліджень також було помічено, що ембріони, які перенесли вплив високої температури й дожили до пізніх стадій не тільки відстають у своєму розвитку, але, при розкритті яйця, виглядають ослабленими, малорухомими, з яскраво вираженою гіперемією покривів і швидко гинуть після вилучення з ембріональних оболонок.

Випадки ектопії та утворення кили в експериментальній групі зустрічалися нами на різних стадіях розвитку ембріона.



Рис. 3.5. Ембріон курки 4-х діб інкубації після впливу гіпертермією. Стрілкою вказано серце, яке розташоване поза грудною кліткою. Порушення торсії та флексії ембріону.

Найбільш пізнім випадком ектопії серця в позагрудинний простір й при цьому з явним недорозвиненням передньої стінки грудної та черевної порожнини, нами зустрічався випадок на 10-й та 13-й добі ембріогенезу. Зовні ембріон не відставав у розвитку від норми (рис. 3.6 та рис. 3.7), формування його повік, дзьоба, кінцівок, пір'яних сосочків й інших діагностичних ознак зовнішнього розвитку відповідало таблицям нормального розвитку НН. Останнім за термінами розвитку випадком появи ектопії серця, що спостерігалось нами в експерименті впливу гіпертермії – це ембріон 13-тої доби інкубації (рис. 3.7).

Це були випадки загрудинної ектопії серця, причому рівень загального розвитку ембріона в цілому також не відставав від норми, як і в інших випадках ектопії або кили, його основні діагностичні та вагові показники не

відрізнялися від таких з контрольної групи. Формування пір'я, пальців кінцівок, очей та дзьоба відповідало нормі.

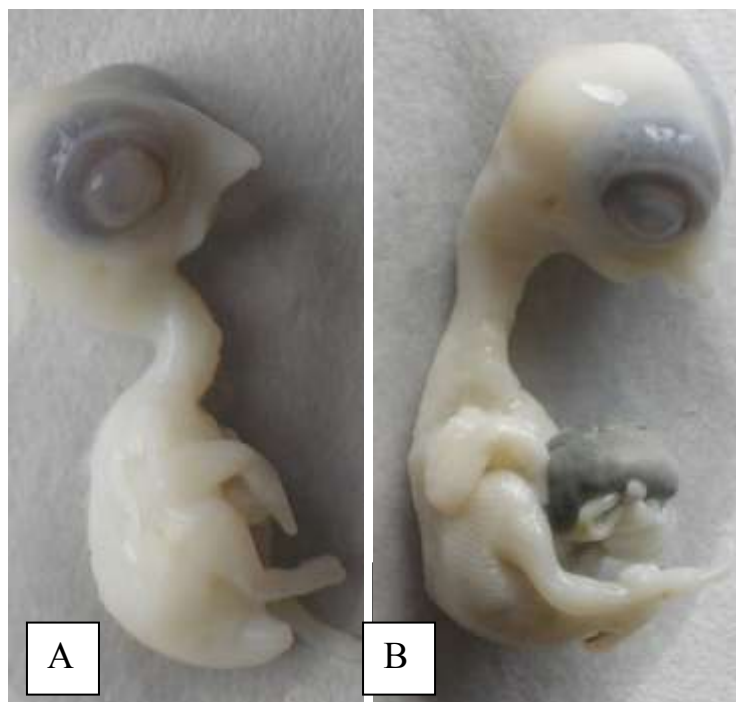


Рис. 3.6. Курячий ембріон 10-ї доби інкубації.

А - нормальний ембріон інтактної групи;

В - ембріон після впливу гіпертермією з килою.

Таким чином, при проведенні експерименту з впливу високою температурою, нами були виявлені основні зовнішні аномалії розвитку курячого ембріону на різних етапах розвитку. Дослідження показали, що вплив високих температур приводить до явного відставання в рості, порушення скручування та згинання ембріона в головному, тулубовому та хвостовому відділах.

Відставання розвитку ембріона виявлялося у запізненні формування бруньок кінцівок, формування мозкових пухирів, дзьоба, ока та повік. В експериментальній групі вже з 4-ї доби інкубації ми спостерігали ектопію серця, а з 10-ї доби нами також спостерігалась кишкова кила та ектопія серця. Відставань у загальному розвитку ембріонів на пізніх етапах спостерігалось

значно менше, але зниження вагових показників все ж відмічало порушення розвитку ембріона.

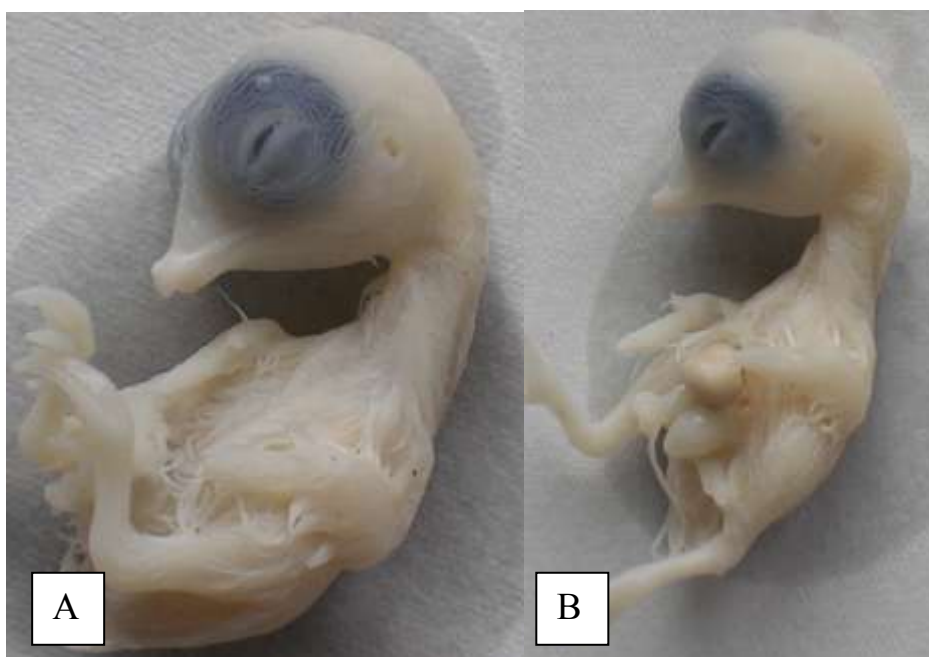


Рис. 3.7. Курячий ембріон 13-тої доби інкубації.

А - нормальний ембріон інтактної групи;

В - ембріон після впливу гіпертермією із заградинною ектопією серця.

Спектр аномалій розвитку був досить значний, багато вад розвитку серця були сполучені між собою. Наприклад ектопія серця майже завжди супроводжувалася порушенням згинання та скручування ембріону, а випадки формування кили ніколи не співпадали з ектопією серця. Формування кили супроводжувалося відставанням у розвитку ембріона на 2-4 стадії. Ми відібрали ті порушення ембріогенезу під впливом високих температур, які найчастіше зустрічались в експерименті. Розподіл зовнішніх вад розвитку ембріонів курки після впливу високими температурами представлено у діаграмі (рис.3.8.).

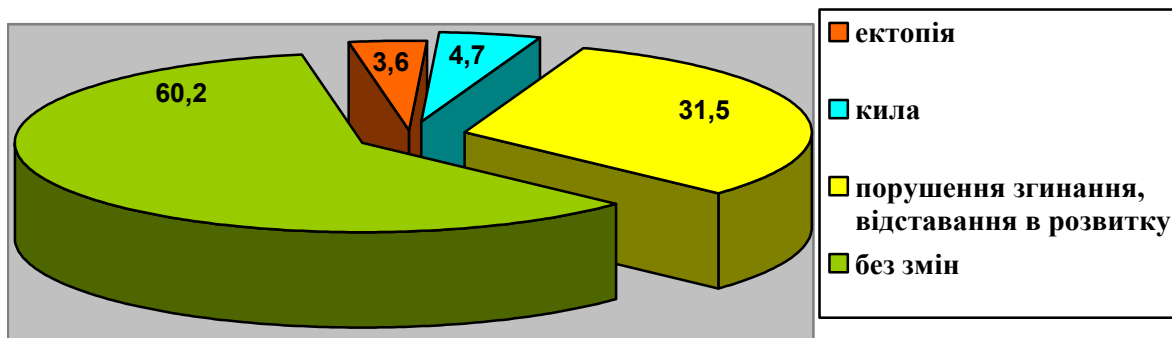


Рис. 3.8. Співвідношення відсотків вад розвитку та нормально розвинутих ембріонів курчати в експерименті під впливом гіпертермії (%).

3.3. Вплив гіпертермії на кардіогенез курячого зародка

Дослідження впливу гіпертермії на хід кардіогенезу курки виявили зміни нормального розвитку серця в різні терміни інкубації в різних ділянках серця.

На 3-й добі ембріонального розвитку в нормі серце курячого зародку чітко розділено на первинні шлуночки і первинні передсердя і сформований атріо-вентрикулярний канал (АВК). Стінка передсердь тонка, утворена 2-3 шарами щільно розташованих клітин міокарду. Стінка ж шлуночку представлена 3-5 шарами клітин і має добре сформований трабекулярний шар. Ендотеліальна вистилка - одношарова - утворена великими клітинами, покриває внутрішню поверхню шлуночку і численні трабекули в його порожнині. Міокард АВК вже на даному етапі розвитку відрізняється від міокарду стінки передсердя та шлуночку. Компактний міокард каналу починає розшаровуватися (делямінація) на дві приблизно рівні за товщиною пластинки між якими з'являється щілина, добре помітна з 84-ї години інкубації – так звана – делямінаційна щілина.

Дослідження зрізів серця ембріонів курки на 4-ту добу інкубації після впливу високими температурами показали витончення стінки обох шлуночків в порівнянні з нормальним розвитком серця ембріонів контрольної групи. Крім цього, нами відмічались деякі порушення формування стінки серця на цьому етапі розвитку. Особливо звертала на себе увагу участь епікарда та його похідних протягом раннього кардіогенезу в різних відділах серця. Епікард передсердь утворює єдину структуру стінки разом з міокардом та ендокардом так як і в нормі, але прошарок епікарду, який вкриває шлуночки та великі судини досить пухкий, утворений багатьма шарами мезенхімних клітин, які містять у собі велику кількість судин, що формуються (рис. 3.9).

Нами спостерігались деякі зміни у формуванні стінки передсердь під впливом гіпертермії. В контрольній групі вже з 28 стадії (за НН) була добре розвинена трабекуляція стінки передсердь. Кожна трабекула була самостійною структурою, мала чіткі контури та двошарову будову.



Рис. 3.9. Серце курячого зародка після впливу гіпертермії (4-та доба розвитку).

Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. x 10. ок. x 10.

1 – порожнина передсердя;

2 – стінка шлуночку;

3 - великі судини серця;

4 - епікард.

Трабекула складалася з 10-15 кардіоміоцитів, до яких щільно прилягав шар ендотеліальних клітин. Дія високих температур на початкових етапах розвитку спочатку призводила до витончення міокарду стінки передсердя (табл.3.4), а на більш пізніх стадіях розвитку до незначного потовщення та формування аномальних трабекул. Ці трабекули представлені потовщеннями компактного міокарду передсердь, який не містить судин і в контрольній групі не спостерігались (рис. 3.10).

Таблиця 3.4

Динаміка зміни товщини передсердь в нормі та під впливом гіпертермії у серці зародка курки на етапах онтогенезу (мкм), $M \pm m$

Стадії розвитку (за НН)	Контрольна група	Експериментальна група
21	21,6±1,7	20,3±1,1
25	25,3±1,4	24,7±1,2
28	28,3±1,3	26,4±2,3
29	48,8±3,6	42,5±3,1
31	60,9±3,2	51,3±3,1*
35	66,4±3,1	57,5±2,9*
37	67,6±4,4	64,8±4,2
39	72,5±4,9	69,7±4,1
41	76,4±5,2	74,2±5,1
43	77,3±5,9	78,5±4,3
45	78,2±4,3	80,6±5,9
46	79,5±6,2	82,5±6,1

Примітка: * - достовірність між групами $p < 0,05$

Шар ендотелію не збільшувався і був подібним до таких структур контрольної групи. Міокард залишався компактним, крім його потовщення, інших аномалій розвитку з боку стінок передсердь нами не виявлено.

Інкубація при підвищеній температурі викликала зміни і в розвитку міжпередсердної перегородки (МПП). Терміни формування МПП явно відставали від контрольної групи, а механізм розподілу передсердь порушувався. За допомогою гістотопографічного аналізу серійних гістологічних зрізів серця ембріонів в нормі (контрольна група) було визначено, що первинна МПП зростала від дорзокраніальної стінки передсердь у вигляді напівмісяця назустріч атріовентрикулярним ендокардіальним подушкам і не відразу розділяла загальне передсердя на праве та ліве. Між цими двома закладками ембріонального серця зберігався міжпередсердний отвір. Сама первинна МПП за будовою була схожа на стінки передсердя, тобто утворена ендокардом та компактним міокардом.

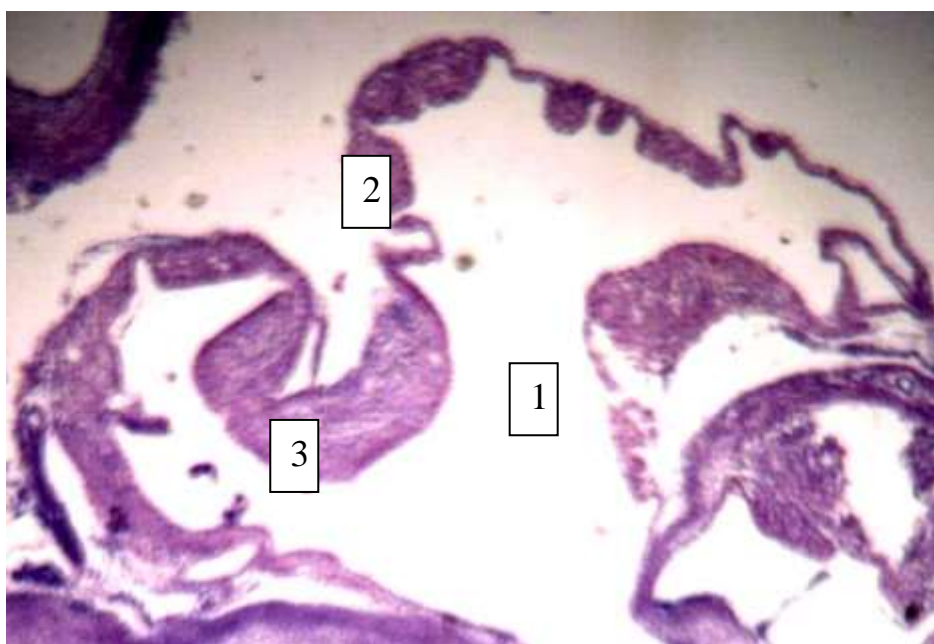


Рис. 3.10. Серце курячого зародка після впливу гіпертермії (9-та доба розвитку). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. x 10. ок. x 10.

1 – порожнина передсердя;

2 – стінка передсердя;

3 – аномальні трабекули передсердя.

На задньо-нижній ділянці МПП з 3-ї доби інкубації в нормі з'являвся так званий ведучий край перегородки – виразне потовщення, яке утворене не стільки компактним міокардом, але й утримує в собі досить значний прошарок кардіогелю, вкритого ендотелієм. На цей час в передсердях це єдина ділянка, де зберігається кардіогель – структура, що здатна стимулювати міграційні процеси. Згодом, а саме починаючи з 20-ї стадії за НН, в цій частині МПП з'являлись мезенхімні клітини, що хронологічно співпадає з подальшим заселенням мезенхімою ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу (АВК) ембріонального серця.

Всі структури ембріонального серця, які на момент впливу високими температурами, утримують залишки кардіогелю та мезенхімні клітини стають найуразливішою ланкою для агенту впливу. Ще до закриття первинного міжпередсердного отвору і до розділення загального АВК між ведучим краєм первинної МПП та атріовентрикулярними ендокардіальними подушками встановлювався контакт через дорзальний мезокард, тобто мезенхіма МПП, АВК та дорзального мезокарду мала сполучення та умови для вільного переміщення. Остаточне злиття цих двох закладок та утворення МПП і розподіл передсердь завершувався на 19-22 стадії за НН, тобто на 3,5-ю добі інкубації (рис. 3.11). Вплив гіпертермії порушує процес переміщення мезенхімних клітин та їхній розподіл як в ЕП АВК так і в ендокардіальних гребнях КСВ серця. Затримка процесу злиття двох закладок МПП призводить до збереження овального вікна на тих термінах розвитку, коли в нормі вже отвору не повинно бути.

Таким чином, вплив гіпертермії призводить до змін у формуванні перегородок серця, а саме: порушення термінів та неповне формування міжпередсердної перегородки (МПП) та міжшлуночкової перегородки (МШП). МПП в експерименті була більш витончена спочатку, а при подальшому розвитку товща від норми, зберігала овальний отвір, тобто не

була повною в той час, як в нормі передсердя вже були ізольовані одне від одного (рис. 3.12).

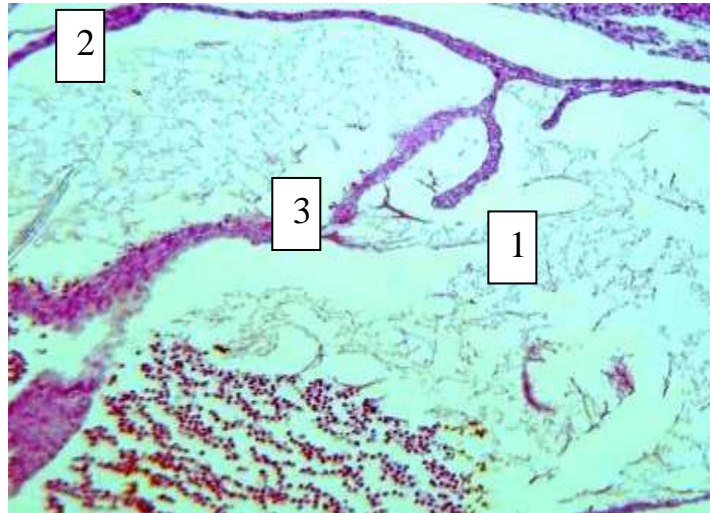


Рис. 3.11. Міжпередсердна перегородка серця курячого зародка 9-та доба розвитку контрольної групи. Забарвлення: гематоксилін-еозін. Збільшення: об. х 10. ок. х 10.

- 1 – порожнина передсердя;
- 2 – стінка передсердя;
- 3 – міжпередсердна перегородка.

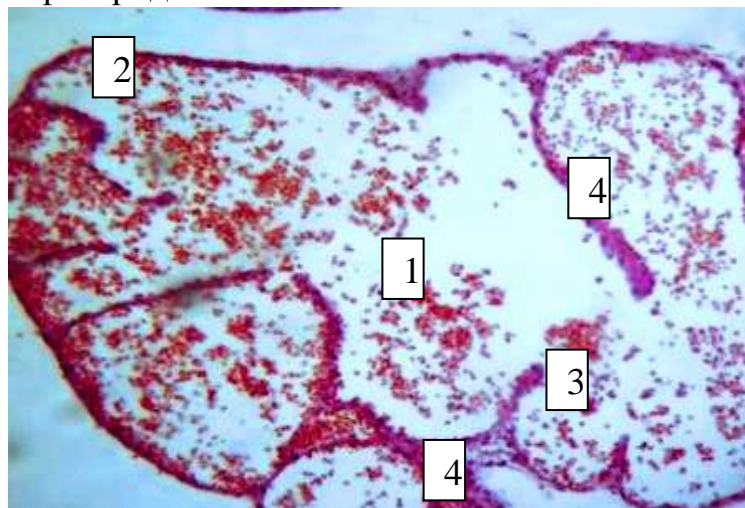


Рис. 3.12. Міжпередсердна перегородка серця курячого зародка після впливу гіпертермії (9-та доба розвитку). Забарвлення: гематоксилін-еозін. Збільшення: об. х 10. ок. х 10.

- 1 – порожнина передсердя;

- 2 – стінка передсердя;
- 3 – овальний отвір міжпередсердної перегородки;
- 4 – міжпередсердна перегородка.

В контрольній групі МПП з 21-ї стадії за НН у фронтальній проекції набувала вигляду піщаного годинника з розширеними верхньою та нижньою частинами і звуженим перешийком у середній частині. Кожна з частин перегородки, крім різної товщини (табл. 3.5), має відмінності в тканинному складі. Верхня частина складається з щільно розташованих кардіоміоцитів та прилеглих до них типових ендотеліальних клітин.

Таблиця 3.5

Динаміка зміни товщини відділів міжпередсердної перегородки в нормі та під впливом гіпертермії серця ембріону курки на етапах ембріогенезу (мкм), $M \pm m$

Стадії розвитку За НН	Верхня частина МПП		Середня частина МПП	
	контроль	експеримент	контроль	експеримент
21	44,2±4,3	43,7±4,3	24,3±2,2	25,5±2,7
25	51,5±4,8	51,7±4,9	25,7±2,4	26,7±2,5
28	53,3±5,3	52,9±5,7	27,4±2,3	28,2±2,6
29	55,8±4,6	56,1±4,8	28,5±2,4	28,9±2,7
31	58,7±5,3	58,9±5,7	29,3±2,3	31,3±3,1
35	59,4±5,2	59,8±5,4	32,5±2,9	34,4±3,1
37	60,6±5,4	61,8±5,9	34,8±3,2	36,8±3,7
39	62,5±6,1	63,7±6,3	36,2±3,1	38,1±3,6
41	63,4±6,2	64,6±6,6	36,2±3,1	38,2±3,7
43	68,3±5,9	69,2±5,9	36,5±3,3	39,2±3,8
45	75,2±7,3	75,9±7,4	37,6±3,6	39,6±3,9
46	76,5±8,4	77,6±7,2	38,5±3,2	40,3±3,7

В середній – вузькій частині - спостерігались від 5 до 8 перфорацій, які були оточені відростками ендотеліальних клітин. Нижня розширена частина складалася в основному з мезенхімних клітин та сполучалася з мезенхімою АВК без чітких кордонів. Морфометричні показники товщини МПП в нормі та після впливу високими температурами виявили незначне потовщення середньої частини перегородки.

В нормі міжшлуночкова перегородка (МШП) починає формуватися як щільний м'язовий виріст, що зростає від верхівки раннього ембріонального серця назустріч мезенхімі ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу, тобто вона формується з м'язової та мезенхімної частини. Між цими двома закладками деякий час зберігається міжшлуночковий отвір.

На наступних стадіях кардіогенезу обидва джерела з'єднуються і формують повний розподіл загального шлуночку на правий та лівий. Гістотопографічний аналіз серійних зрізів серця ембріону показав, що вже на 20-й стадії (за НН) формується перегородка шлуночків у вигляді м'язового гребеня, який від верхівки серця зростає до ендокардіальних подушок АВК. М'язовий гребінь складається з міокардіальних трабекул, вкритих ендокардом. На початку формування трабекули розташовані досить пухко і мають перфорації та синусоїди. Але вже, починаючи з 26-ї стадії розвитку за НН щільність

З боку АВК до м'язового гребеня зростає виріст ендокардіальних подушок, який містить в собі лише мезенхімні клітини, вкриті ендокардом. До 5,5-ю доби інкубації між цими двома закладками зберігається міжшлуночковий отвір, але вже на 28-й стадії (за НН) обидві частини МШП об'єднуються і розділяють єдиний шлуночок на правий та лівий. Товщина МШП неоднакова в різних її відділах, тому ми виділяли три частини: апікальну – найтовщу, яка прилягає до верхівки серця, середню та базальну, що з'єднується з АВК.

Аналіз впливу гіпертермії на формоутворюючі процеси перегоронок серця показав, що апікальна частина менше підлягає дії підвищеної температури, її розміри майже не змінюються у порівнянні з нормою. В окремих випадках ми зустрічали якісні зміни цієї частини МШП, а саме: перфораційні отвори, що вкриті ендотелієм та відставання у процесах зростання, в той час як середня та базальна частка суттєво відрізнялись від норми. Середня частина достовірно зменшувалась, а базальна – мезенхімна - збільшувалась (табл. 3.6). Тобто гіпертермія призводила в певній мірі до витончення середньої частини міжшлуночкової перегородки.

Таблиця 3.6

Динаміка зміни товщини міжшлуночкової перегородки в нормі та під впливом гіпертермії у серці ембріона курки на етапах ембріогенезу (мкм), $M \pm m$

Стадії розвитку за НН	Апікальна частина		Середня частина		Базальна частина	
	контроль	експеримент	контроль	експеримент	контроль	експеримент
28	180,3±15,3	186,3±15,4	102±8,7	96±9,7	100,4±11,2	109,7±12,3
29	206,8±14,6	204,8±14,8	180±15,7	110±12,2*	180,5±11,8	193,4±12,4
31	336,7±25,3	316,7±16,1	290±16,8	230±19,3*	289±13,1	296,0±12,3
35	408,4±15,2	408,8±15,7	390,8±17,4	280,7±16,6* *	320,5±14,9	348,7±13,6
37	708,6±15,4	712,6±15,9	560,5±25,4	348,6±26,1* *	390,8±17,2	430,3±16,2
39	1120,5±16,1	1134,3±17,2	730±57,7	507±28,1**	500,2±16,1	576,6±18,2
41	1122,4±18,2	1128,4±19,5	730±19,9	569±23,7**	600,2±18,3	678,3±19,1
43	1380,3±15,9	1408,3±16,9	1200±31,7	890±32,4**	710,5±14,5	790,3±13,3
45	1585,2±17,3	1580,2±18,3	1300±45,1	1090±41,9* *	920,6±12,4	989,7±13,9
46	1750,5±18,2	1770,9±19,4	1550±55,8	1300±53,2* *	1500,5±18,3	1630,8±18,6

Примітка * - достовірність між групами $p < 0,05$

Примітка ** - достовірність між групами $p < 0,001$

Під впливом гіпертермії міжшлуночкова перегородка розпушена й виглядає як папілярно-трабекулярний апарат шлуночку з більшими просторами між пучками кардіоміоцитів ніж в нормі. Ці окремі тяжі вкриті ендокардом, тобто можна говорити про перфоративні отвори в міжшлуночковій перегородці, що призводить до порушення механізмів септації і скорочувальної функції та роботи серця. З боку клапанного апарата, що формується на даному етапі розвитку, аномалій не виявлено.

На наступних етапах розвитку, а саме, починаючи з 5-ї доби ембріогенезу курки ми спостерігали явне відставання у формуванні міжшлуночкової перегородки та порушення у формуванні клапанного апарату серця у ембріонів після впливу високими температурами.

В контрольній групі міжшлуночкова перегородка сформована, тобто відбувається об'єднання мезенхімної та м'язової частини, на 5,5-тій добі інкубації. М'язова частина на цей час представлена щільними тяжами пучків кардіоміоцитів, має конусоподібну форму та не містить отворів.

Після впливу гіпертермією ми спостерігали явне відставання у строках об'єднання цих двох закладок перегородки, бо ще на 7-й добі ембріогенезу зберігався міжшлуночковий отвір (рис.3.13). Відрізнялась і гістологічна будова перегородки. М'язова частина перегородки зберігала численні перфорації і складалася з окремих тяжів, вкритих ендокардом. Такі тяжі нагадують трабекули шлуночків серця і в контрольній групі нами не спостерігались зовсім.

Таким чином, можна говорити про відсутність агрегації трабекул первинного шлуночку у загальний міокардіальний пласт, який має в нормі конусоподібну форму та високу щільність прилягання кардіоміоцитів. В контрольній групі саме в цій частині міжшлуночкової перегородки починає

формуватися компактний міокард, чого не відбувається в експериментальній групі при формуванні дефектів МШП.

На 7-й добі інкубації зберігалось неповне формування серцевої стінки шлуночків із-за відставання ущільнення епікарду. В нормі епікард щільно прилягає до міокарду вже на 6-й добі розвитку та утворює єдину стінку серця. Нами спостерігалось розпушення мезенхіми епікарду, що свідчило про затримку кардіогенезу.

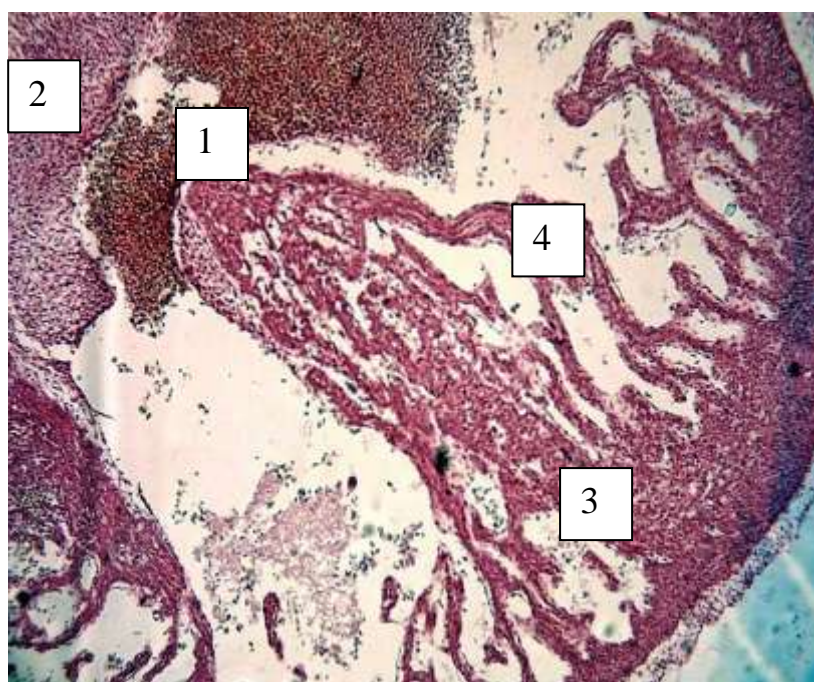


Рис. 3.13. Міжшлуночкова перегородка серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: гематоксилін-еозін. Збільшення: об. x 10. ок. x 10.

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

Як відмічалось раніше, в експерименті з впливом високих температур, витончення стінок передсердь на ранніх етапах розвитку змінювалось пізніше на потовщення. Поряд з витонченням стінок ми спостерігали, що самі

порожнини передсердя збільшені. Трабекули передсердь на зрізах відрізнялися меншою кількістю, та товщиною, що свідчить про відставання у формуванні стінок камер серця дією високих температур (рис. 3.14). Трабекули передсердь мали різноманітну аномальну форму від грибоподібної до кулястої і міокард, що їх складав досить швидко диференціювався в компактний. Трабекули шлуночків зачасту не відрізнялись від норми і в формуванні клапанного апарату нами на даному терміні розвитку відхилень від норми не спостерігалось.

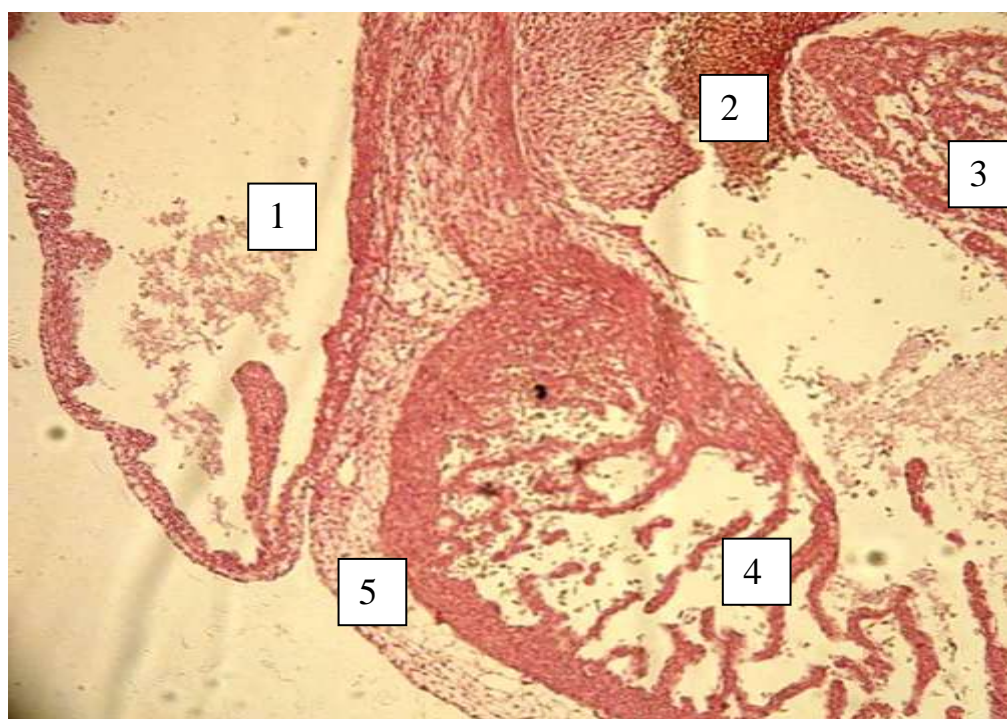


Рис. 3.14. Серце ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 10. ок. х 10.

- 1 – порожнина передсердя;
- 2 – міжшлуночковий отвір;
- 3 – міжшлуночкова перегородка;
- 4 – трабекули шлуночку;
- 5 – епікард.

На подальших етапах ембріогенезу, а саме, розпочинаючи з 8-ї доби інкубації, нами спостерігались зміни не тільки в формуванні серцевої стінки, а й в утворенні клапанного апарату серця птахів. При дослідженнях розвитку та формування вад клапанного апарату серце курки є унікальним об'єктом. В нормі передсердно-шлуночкові клапани курки неоднакові в правій та лівій частині серця. В правому передсердно-шлуночковому отворі розташовується м'язовий одностулковий клапан, що утворюється шляхом делямінації міокарду шлуночку та атріовентрикулярного каналу. В лівому передсердно-шлуночковому отворі знаходиться двохстулковий клапан ендокардіального походження з сухожилковими струнами та соскоподібними м'язами, подібний до клапанів серця ссавців та людини.

Під впливом гіпертермії змінювалась форма м'язового клапана правого передсердно-шлуночкового отвору. Підстава клапану витончена, а сама стулка потовщена, особливо на дистальному кінці. Сам клапан в ряді випадків утворений щільно упакованими м'язовими волокнами, вкритими ендокардом (рис. 3.15.), але так ми спостерігали і інші відхилення від норми в ході експерименту.



Рис. 3.15. Зріз правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки 9-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 4. ок. х 10.

- 1 – стінка правого шлуночку;
- 2 - м'язова стулка передсердно-шлуночкового клапану;
- 3 – міжшлуночкова перегородка;
- 4 – порожнина правого шлуночку.

На поверхні стулки правого передсердно-шлуночкового клапану зберігаються залишки ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу, які містять в собі мезенхімні клітини (див. рис. 3.16). Мезенхіма стулок на цей час ще досить пухко розташована та в ній відбуваються виразні процеси міокардіолізації. Сама стулка складається з міокардіальної та мезенхімної частин. Міокард стулки представлений пухкими пучками волокон, що мають досить виразні збільшені інтерстиціальні простори та містять велику кількість судин, чого в нормі на цьому етапі розвитку не спостерігається. Мезенхімна частина складається з мезенхімних клітин залишків ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу.

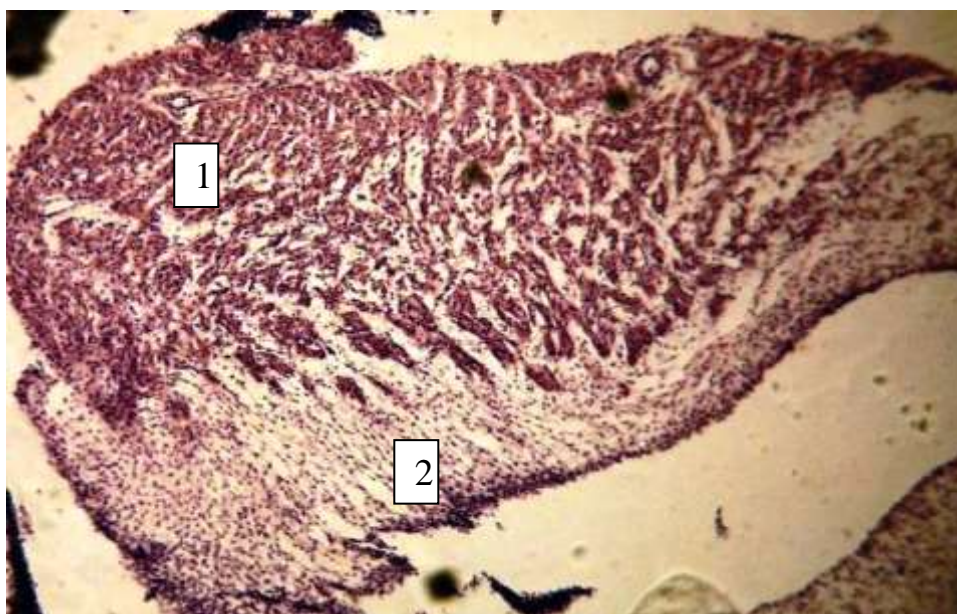


Рис. 3.16. Стулка правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки 9-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об. х 10. ок. х 8.

1 – міокард;

2 – мезенхіма.

На межі міокардіальної та мезенхімної частин відбуваються активні процеси міокардіолізації мезенхіми, тобто утворення м'язових пучків, що проростають у товщу мезенхімних клітин. Такі процеси характерні для даного етапу кардіогенезу і відбуваються при нормальному розвитку. Пучки кардіоміоцитів в зоні межі двох частин стулки потовщені та більш орієнтовані ніж м'язові волокна всієї стулки (рис. 3.17.)

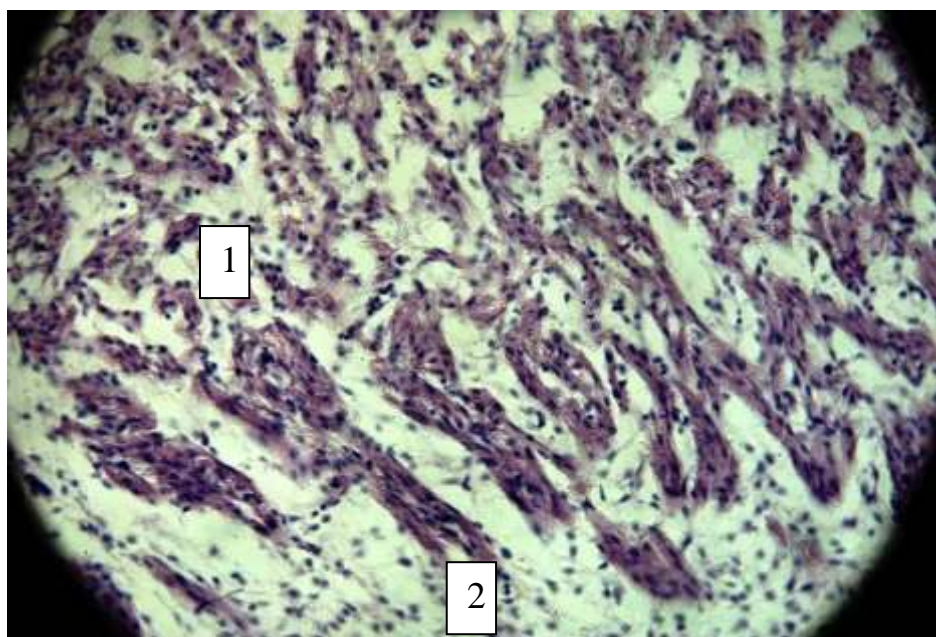


Рис. 3.17. Стулка правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки 9-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Зріз проведено на межі між м'язовою та мезенхімною частинами. Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об. х 10. ок. х 40.

1 – міокард;

2 – мезенхіма.

Для виявлення можливих порушень процесів міокардіолізації мезенхіми у стулках клапанів після впливу високими температурами, ми провели порівняльний аналіз з контрольною групою ембріонів. Порівнюючи розвиток клапану в нормі та під дією гіпертермії нами проводилась морфометрія мезенхімної та м'язової частин стулки клапану. Виміри робилися, починаючи з 38-ї стадії (з 12-ї доби інкубації) до вилуплення курчати. Співставлення результатів представлено в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Питомі площі мезенхімної та м'язової частин стулки правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки на пізніх стадіях розвитку в нормі та під впливом гіпертермії.

Стадія Розвит- ку, час інкубаці ї	Питома площа в нормі			Питома площа під впливом гіпертермії		
	мезенхі мної частини	м'язової частини	співвідн ошення площин	мезенхі мної частини	м'язової частини	співвіднош ення площин
38 (12 діб)	0,16±0,0 13	0,39±0,0 31	41,1%	0,17±0,0 14	0,37±0,0 31	45,9%
40 (14 діб)	0,12±0,0 08*	0,45±0,0 39*	26,6%	0,14±0,0 09*	0,40±0,0 37*	35%
42 (16 діб)	0,106±0, 007*	0,47±0,0 42*	22,3%	0,12±0,0 08*	0,48±0,0 4*	25%
44 (18 діб)	0,084±0, 006*	0,503±0, 047*	16,8%	0,098±0, 007*	0,50±0,0 45*	19,6%
46 (21 доба)	0,060±0, 003*	0,57±0,0 36*	10,6%	0,095±0, 004*	0,55±0,0 3*	16,4%

Примітка: * - різниця достовірна (достовірність між групами $p < 0,05$).

Результати дослідження виявили, що мезенхімна частина стулки після впливу гіпертермії збільшується відносно м'язової в порівнянні з нормою, але саме збільшення стулки зростає несуттєво у порівнянні з нормою, тобто

можна зробити висновки про затримку процесу міокардіолізації, а не про порушення утворення самого клапану. Дослідження показали, що мезенхімна частина стулки правого передсердно-шлуночкового клапану представлена типовими мезенхімними клітинами з довгими зірчастими відростками та пухко розташованими. Відсутність компактизації клітин мезенхіми на пізніх термінах інкубації після впливу гіпертермією свідчить про затримку гістогенетичних процесів серця.

Нами також вимірювалися та порівнювалися питомі площі стулок клапанів серця, що формується в нормі та експерименті. Результати вимірювань наводяться у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Питомі площі стулки правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки в нормі та після впливу гіпертермії на пізніх стадіях розвитку і співвідношення цих показників.

Стадія розвитку, час інкубації	Питома площа стулки в нормі	Питома площа стулки після гіпертермії	Співвідношення площин (експеримент/норма)
38 (12 діб)	0,55±0,03	0,45±0,03	81,8%
40 (14 діб)	0,57±0,01	0,48±0,05*	84,2%
42 (16 діб)	0,58±0,02	0,52±0,03*	89,6%
44 (18 діб)	0,58±0,03	0,55±0,05	94,8%
46 (21 доба)	0,63±0,04	0,56±0,04*	88,8%

Примітка * - достовірність між групами $p < 0,05$

Формування клапанного апарату передсердно-шлуночкових отворів відбувається у тісному зв'язку з розвитком передсердно-шлуночкової борозни, її мезенхіми та судин, що закладаються в цій структурі. Клітини епікарду, що інвагінують в товщу борозни, розділяють міокард шлуночків та передсердь, а на самих ранніх етапах кардіогенезу мезенхіма передсердно-шлуночкової борозни підтримує зв'язок з позасерцевою мезенхімою дорзальної брижі ембріонального серця (рис. 3.18.).

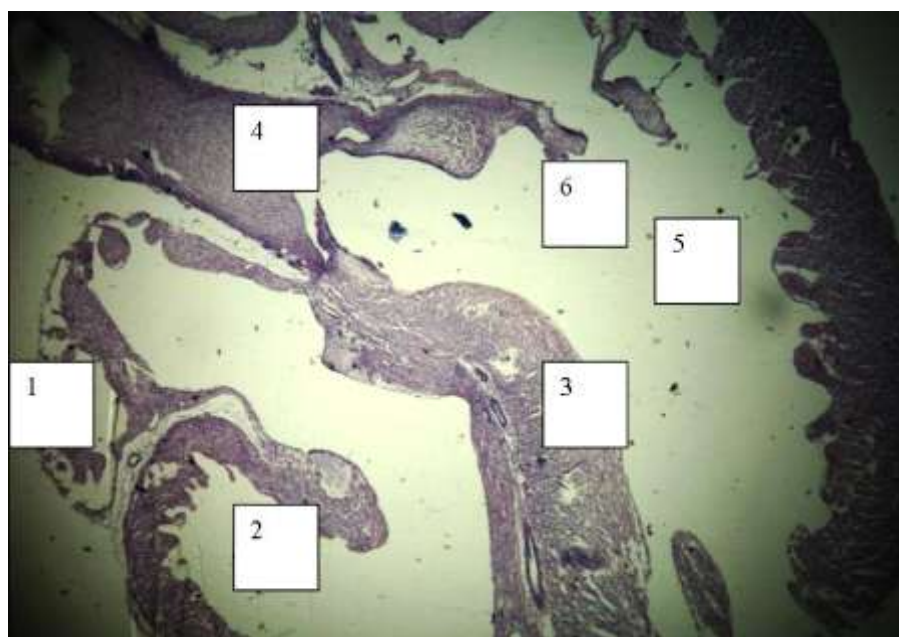


Рис. 3.18. Правий передсердно-шлуночковий клапан серця ембріона курки 9-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об. х 4. ок. х 10.

- 1 – стінка правого передсердя;
- 2 - м'язова стулка передсердно-шлуночкового клапану;
- 3 – міжшлуночкова перегородка;
- 4 – аорта;
- 5 – порожнина лівого шлуночку;
- 6 – лівий передсердно-шлуночковий клапан.

Даному етапу кардіогенезу характерний зв'язок мезенхіми стулки правого передсердно-шлуночкового клапану з мезенхімою передсердно-шлуночкової борозни (рис. 3.19). В цей період кардіогенезу у зоні передсердно-шлуночкової борозни активно формуються як вінцеві так і дрібні судини серця. Зберігання зв'язку міокарду шлуночків з міокардом передсердь вказує на неповне формування провідної системи серця, бо на пізніших етапах розвитку цей зв'язок втрачається цілком. Міжшлуночкова перегородка в цей період зберігає на своїй поверхні залишки ендокардіальних подушок з мезенхімними клітинами, які ще виконують функцію протилежної стулки для правого передсердно-шлуночкового клапана.



Рис. 3.19. Правий передсердно-шлуночковий клапан серця ембріона курки 9-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Збільшений фрагмент попередньої фотографії. Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об. х 10. ок. х 10.

- 1 – м'язова стулка передсердно-шлуночкового клапану;
- 2 – міжшлуночкова перегородка;
- 3 – порожнина правого шлуночку;
- 4 – стінка шлуночку;

- 5 – передсердно-шлуночкова борозна з судинами, що формуються;
 6 – залишки ендокардіальних подушок міжшлуночкової перегородки.

Міжшлуночкова перегородка містить у собі досить розвинуту сітку кровоносних судин, що на цей період не характерно для перегородки шлуночків контрольної групи. Звертає на себе увагу також той факт, що щільність пучків міокарду міжшлуночкової перегородки як і її товщина збільшена у порівнянні з нормою.

З боку лівого передсердно-шлуночкового клапану на цей час нами виявлено укорочення стулок, що формуються (рис.3.20.). Стулки як і в нормі, так і в експерименті утворені мезенхімою та вкриті шаром ендотелію, їх склад не відрізняється від контрольної групи, але мезенхімні клітини розташовані значно компактніше. Таке ущільнення мезенхіми може в подальшому призводити до виникнення аномалій розвитку стулок передсердно-шлуночкових клапанів.

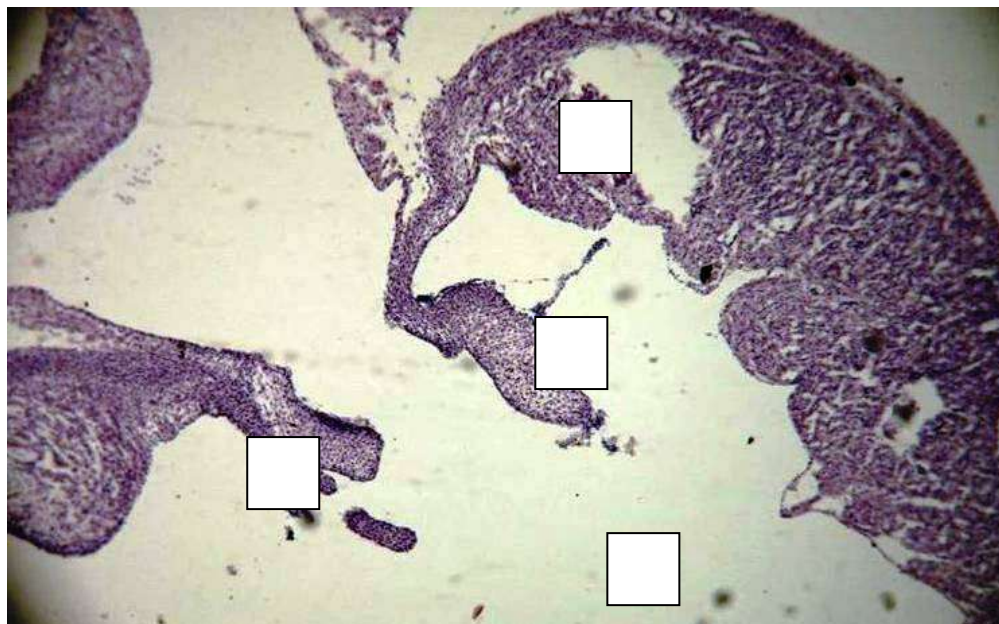


Рис. 3.20. Лівий передсердно-шлуночковий клапан серця ембріона курки 9-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об. x 10. ок. x 10.

1 – стулка передсердно-шлуночкового клапану;

- 2 — стінка шлуночку;
- 3 – порожнина лівого шлуночку.

Одним з наслідків впливу гіпертермії на формування стінки шлуночку ембріонального серця було змінення товщини міокарду. Стінка правого шлуночку досить часто мала потовщення в середній третині, де пучки кардіоміоцитів утворювали досить товстий прошарок.

В міокарді стінок ембріонального серця як правого так і лівого шлуночків, починаючи з 7-8-ї доби розвитку, нами спостерігались досить помітні зміни після впливу високих температур. Стінка правого шлуночку витончена та трабекульована. Напрямок пучків міокарду у трабекулах орієнтований до центру шлуночку. Верхівки трабекул потовщені та часто мають грибоподібну форму.

Верхівки окремих трабекул стінки шлуночку пов'язані між собою тонкими перекладками у вигляді «містків» з міокарду, вкритого ендокардом (рис.3.21.). Формування таких аномальних трабекул є результатом порушення процесів делямінації та перфорації делямінаційної пластинки. Такі «містки» не можуть не впливати на скорочувальну функцію шлуночків і в нормі не формуються в серці птахів. Аномальний розвиток трабекул частіше спостерігався в середній третині шлуночків і майже зовсім не зустрічався в області верхівки серця.

В середній третині шлуночків серця нами спостерігались в окремих випадках «двошаровий міокард», що явно свідчить про порушення механізмів утворення серцевої стінки під впливом гіпертермії. Нами зроблено припущення, що утворення таких містків є результатом порушення процесу делямінації раннього серця. Як відомо делямінація тобто розшарування міокарду шлуночків та АВК призводить до короточасного утворення двохшарового міокарду шлуночків, але це явище швидкоплинне і внутрішній прошарок міокарду швидко перфорується та дає початок трабекулам і

соскоподібним м'язам шлуночків, а також стулкам, сухожилковим ниткам передсердно-шлуночкових клапанів.

Затримка процесів перфорацій внутрішнього шару міокарду призводить до порушення трабекуляції міокарду, що в свою чергу формує аномально розташовані трабекули шлуночків.

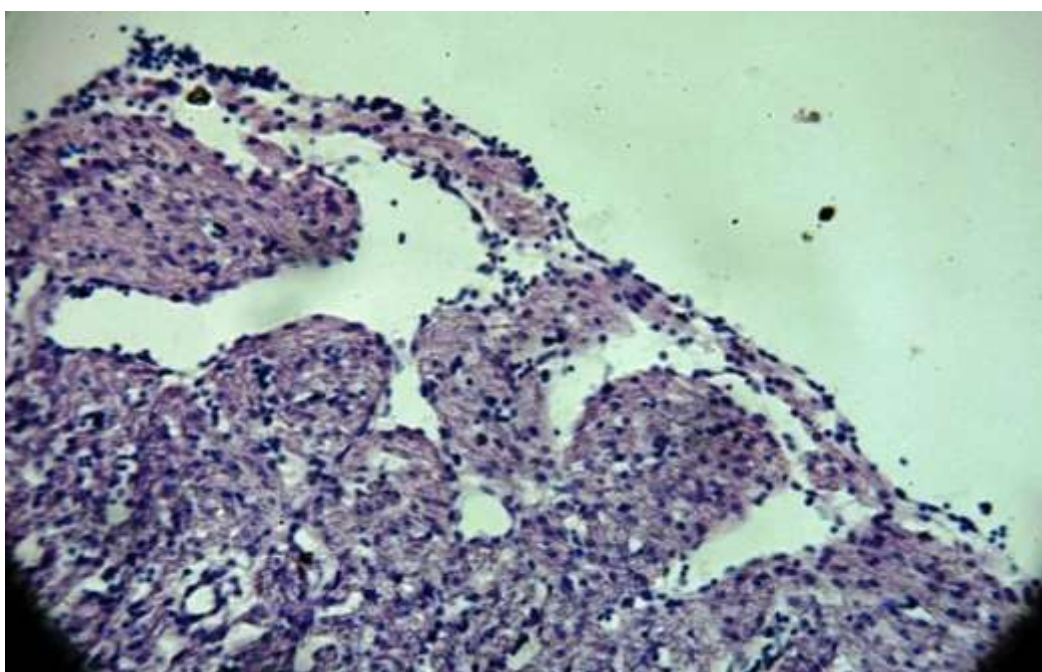


Рис. 3.21. Зріз стінки правого шлуночку серця ембріона курки 9-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Формування аномальних трабекул внутрішнього шару міокарду шлуночку. Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об. x 40. ок. x 10.

Формування міокарда стінок шлуночків супроводжувалось утворенням сітки кровоносних судин міокарду та епікарду. Вплив гіпертермії призводить до прискореного формування судин серцевої стінки, що в свою чергу сприяє

швидшому «дозріванню» міокарда, тобто прискорює процеси диференціювання тканин. Процеси компактизації кардіоміоцитів відбувалися активніше у тварин експериментальної групи. Утворення щільних прошарків спостерігалось раніше ніж в серцях експериментальних тварин контрольної групи. Зовнішній шар м'язових пучків орієнтований вздовж епікарду, а пучки трабекулярного шару розташовані майже під кутом 90 градусів та містять в собі багато судин, що формуються (рис. 3.22.)

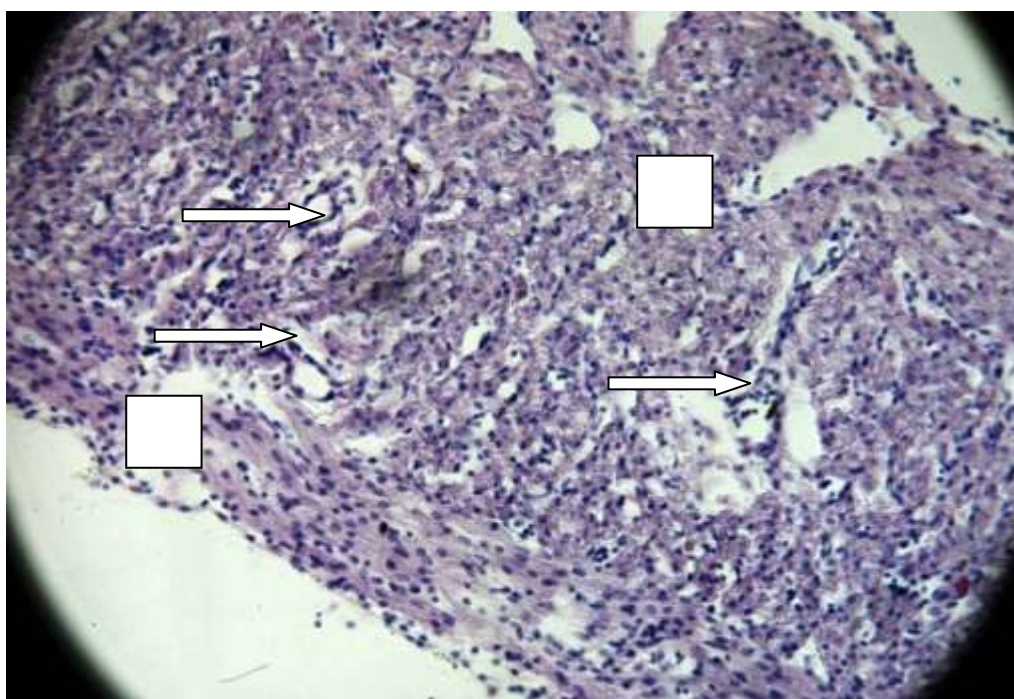


Рис. 3.22. Зріз стінки правого шлуночку серця ембріона курки 9-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об. х 40. ок. х 10.

1 – епікард;

2 – трабекули міокарду; стрілками вказано судини.

Стінка передсердя та міжпередсердна борозна ні гістологічною будовою ні термінами утворення не відрізнялись від контрольної групи. Цей факт можна пояснити тим, що формування передсердь та міжпередсердної перегородки відбувається на ранніх етапах кардіогенезу, тобто, закладка

вказаних структур відбувається ще до впливу високими температурами і не залежить від них.

В другій половині ембріогенезу, тобто, розпочинаючи з 10-ї доби інкубації, з явно виражених вад розвитку серця в експериментальній групі ми спостерігали укорочення правого передсердно-шлуночкового клапану, наявність міжшлуночкового отвору та порушення формування клапанів великих судин, таких як аорта та легеневий стовбур (рис. 3.23).

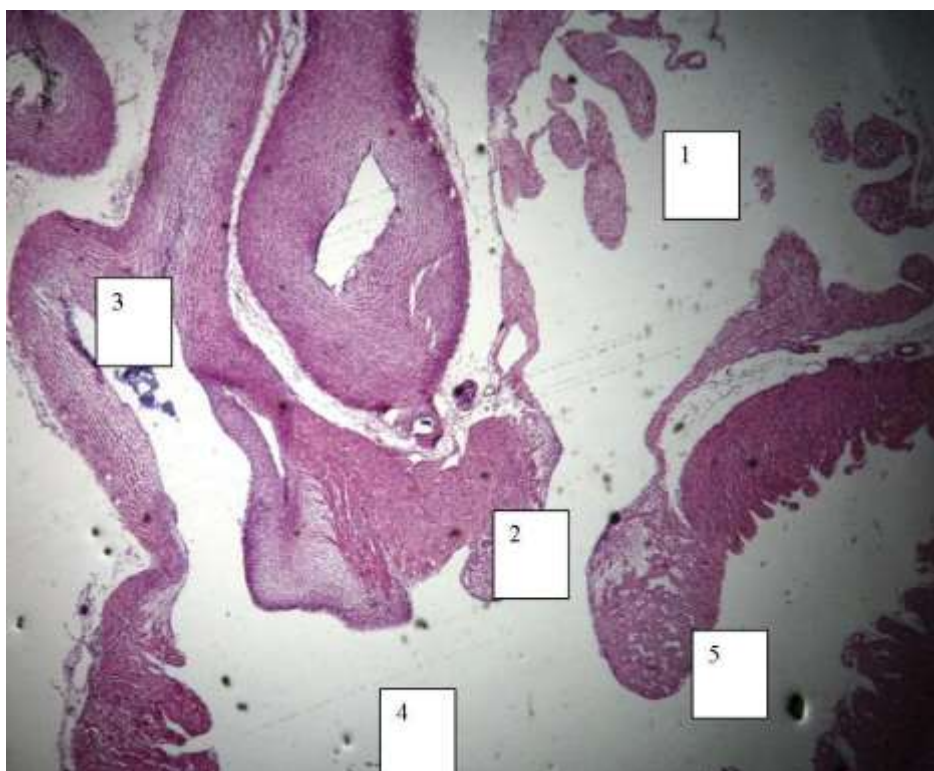


Рис. 3.23. Зріз стінки правого шлуночку та передсердя серця ембріона курки 11-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Укорочення правого передсердно-шлуночкового клапану та порушення формування півмісячних засліноу легеневого стовбуру. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 4. ок. х 10.

- 1 – праве передсердя;
- 2 – правий шлуночок;
- 3 – легеневий стовбур;

4 – міжшлуночковий отвір;

5 – стулка правого передсердно-шлуночкового клапану.

Укорочення стулки м'язового клапану та наявність великого міжшлуночкового отвору призводила до порушень скорочувальної функції серця. Як і на більш ранніх строках розвитку, ця аномалія супроводжувалась порушенням співвідношення питомого обсягу мезенхімної та м'язової частин стулки (рис.3.24).

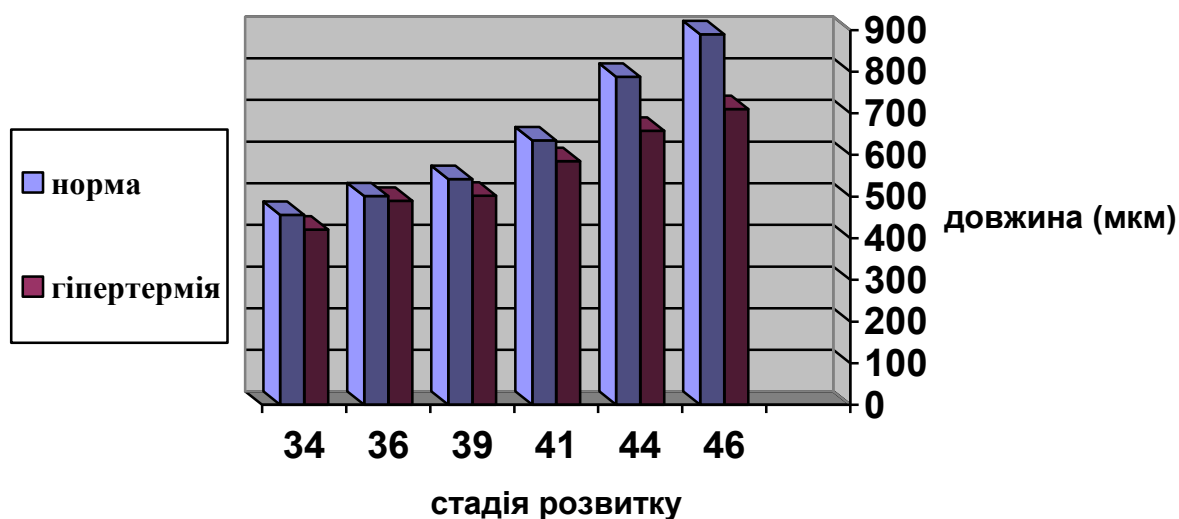


Рис. 3.24. Динаміка зростання довжини стулки правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки в нормі та після впливу гіпертермією протягом ембріогенезу (мкм) $M \pm m$

Особливі зміни спостерігаються у формуванні клапанного апарату крупних судин серця: аорти та легеневого стовбуру. В нормі на цей період ембріогенезу півмісяцеві стулки аорти та легеневого стовбуру (вони розвиваються хронологічно паралельно) представлені мезенхімними кишеньподібними утвореннями в основі судини, тобто в місці відходження судини від стінки шлуночку. В наших дослідженнях дія високих температур

не тільки змінювала обсяг та форму клапанів великих судин серця, але й місце відходження самої судини. Як аорта так і легеневий стовбур розпочиналися значно нижче в порівнянні з нормою (рис. 3.25). Стулки напівмісячних заслінок мали різноманітну форму і місце прикріплення. Найбільш виразно змінювався питомий обсяг самих стулок (рис. 3.26). В нормі питомий обсяг стулок змінювався досить плавно, прямо пропорційно етапам розвитку. В експерименті збільшення питомого обсягу мезенхімних стулок не тільки випереджувало за розмірами, але й самі стулки не завжди мали карманоподібну форму. Дослідження процесів утворення колагену показали явне відставання на 3-4 стадії у формуванні перших колагенових прошарків в стулках напівмісячних заслінок аорти та легеневого стовбуру.

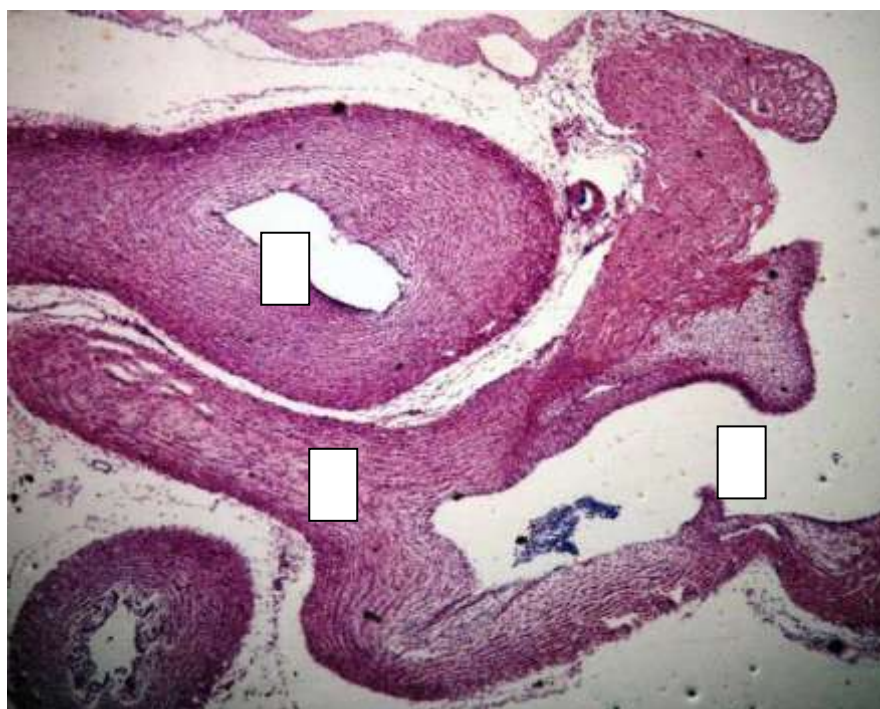


Рис. 3.25. Великі судини серця ембріона курки 11-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 10. ок. х 10.

1 – аорта;

2 – легеневий стовбур;

3 – аномальні клапани легеневого стовбуру.

Подальші дослідження формоутворюючих процесів показали відставання у формуванні міжшлуночкової перегородки. На 11-ту добу ембріогенезу зберігався міжшлуночковий отвір, злиття м'язової та мезенхімної частин перегородки не відбувалося. Сама ж міжшлуночкова перегородка являла собою окремі трабекули, вкриті ендокардом. В порівнянні з більш ранніми етапами розвитку ці трабекули були вже набагато товщі, тобто відбулося злиття окремих трабекул, але перфоративні отвори в самій перегородці зберігалися, а її розміри залишалися на рівні нормального розвитку ембріона 5-ї доби інкубації.

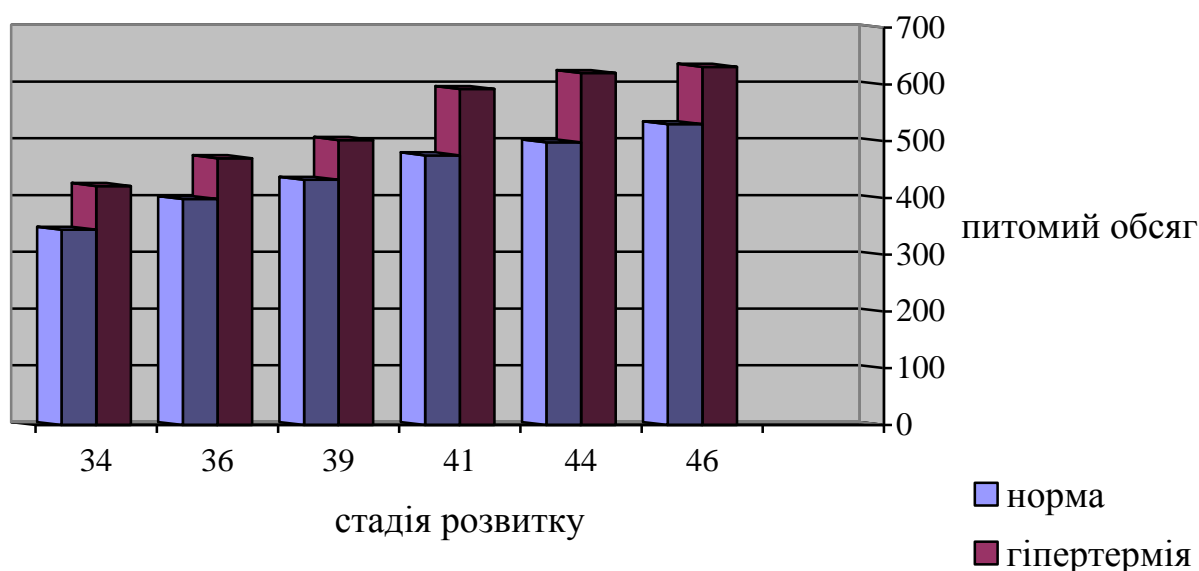


Рис. 3.26. Динаміка зростання питомого обсягу стулок півмісяцевих заслінок аорти серця ембріона курки в нормі та після впливу гіпертермією протягом ембріогенезу (мкм) $M \pm m$

В більшості випадків міжшлуночкова перегородка була сформована з двох окремих трабекул, які самі складаються з менших за розміром і товщиною трабекул та з'єднані своїми верхівками (рис. 3.27).

На 11-ту добу інкубації спостерігались також в стінці шлуночків наявність «містків», тобто злиття окремих трабекул з утворенням ще одного шару міокарду. Такі перекладки, що поєднують окремі трабекули, вкриті ендокардом і об'єднують від 5 до 9 трабекул стінки шлуночку. Спостерігались вони і в попередніх строках ембріогенезу, тільки в середній частині стінки шлуночку. Загалом стінка сформована відповідно до норми, тобто її товщина та ступінь васкуляризації звичайні для контрольної групи дослідних тварин. Але в окремих випадках ми спостерігали відставання епікардіальної висилки від міокарду стінки шлуночків(рис.3.28).



Рис. 3.27. Зріз міжшлуночкової перегородки серця ембріона курки 11-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Відсутність компактного міокарду та порушення злиття м'язової частини МШП. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. x 10. ок. x 10.



Рис. 3.28. Стінка правого шлуночку серця ембріона курки 11-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Стрілками вказано відставання епікарду. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. x 10. ок. x 10.

Дослідження напівтонких гісто-топографічних зрізів цілого серця ембріонів, що підлягали дії гіпертермії, продемонстрували зсуви кардіоміогенезу раннього серця. Ми спостерігали відхилення утворення шарів міокарду шлуночків серця та переорієнтацію волокон міокарду. Найбільш вираженими були порушення двох типів: порушення утворення трабекул шлуночків та орієнтація волокон компактного шару міокарду шлуночків. Значних відхилень на гістологічному рівні у розвитку стінки передсердь крім витончення та зменшення кількості трабекул передсердь нами не спостерігалось. При порівнянні з нормою ходу утворення шарів в стінці шлуночку ми спостерігали зміну напрямку пучків кардіоміоцитів, що може впливати на скорочувальну функцію серця. Найбільш вираженим змінам в формуванні напрямку пучків кардіоміоцитів підлягали ті волокна, що утворюють трабекулярний прошарок стінки шлуночку, в той час як формування компактного міокарду відбувалось без суттєвих змін (рис. 3.29).

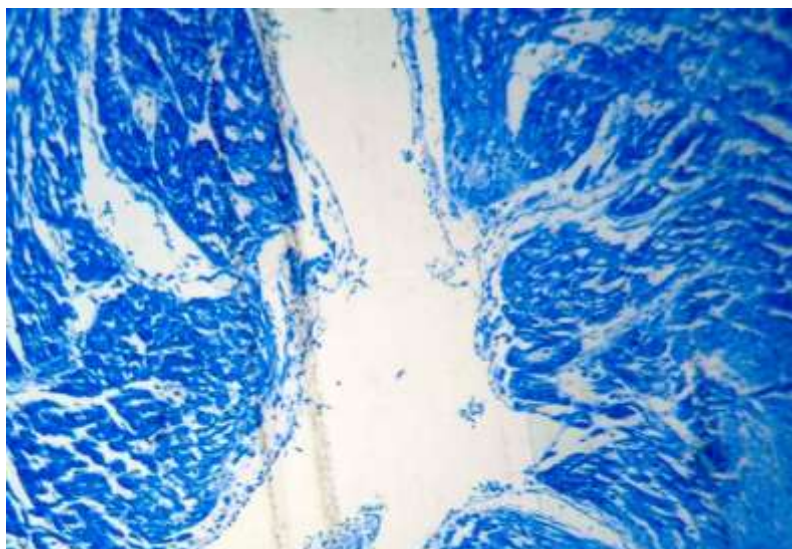


Рис. 3.29. Напрямок міокардіальних пучків стінки лівого шлуночку серця ембріона курки 12-ї доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: метиленовий синій. Збільшення: об. x 10. ок. x 8.

Після впливу гіпертермії спостерігались також зміни в судинній системі серця ембріона курки. Кількість та просвіт капілярів не змінювався, але периваскулярний простір був явно збільшений, що свідчить про набряк навколосудинних тканин (рис.3.30). Вплив гіпертермії на стінку серця ембріона проявлявся також у локальному набряку ендокарду (рис. 3.31).

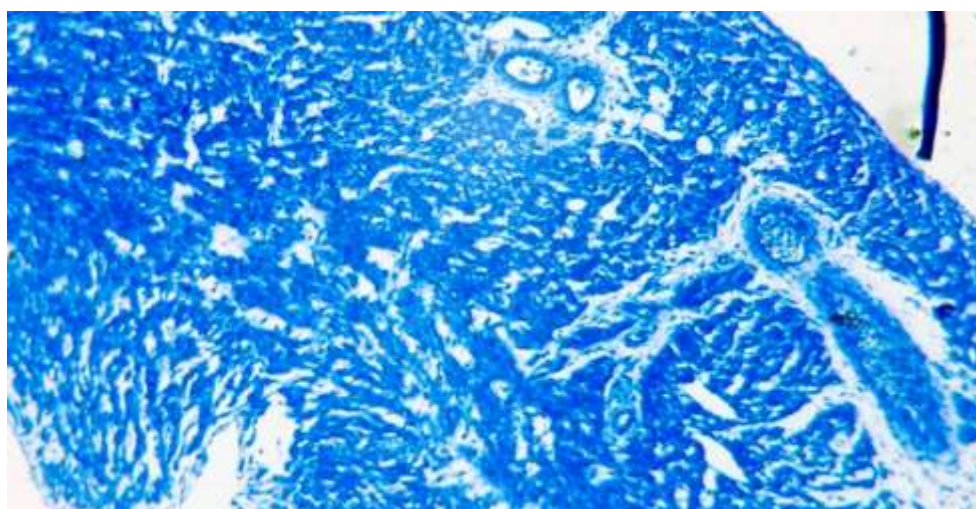


Рис. 3.30. Судини міокарду правого шлуночку ембріона курки 7 доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: метиленовий синій. Збільшення: об. x 10. ок. x 8.

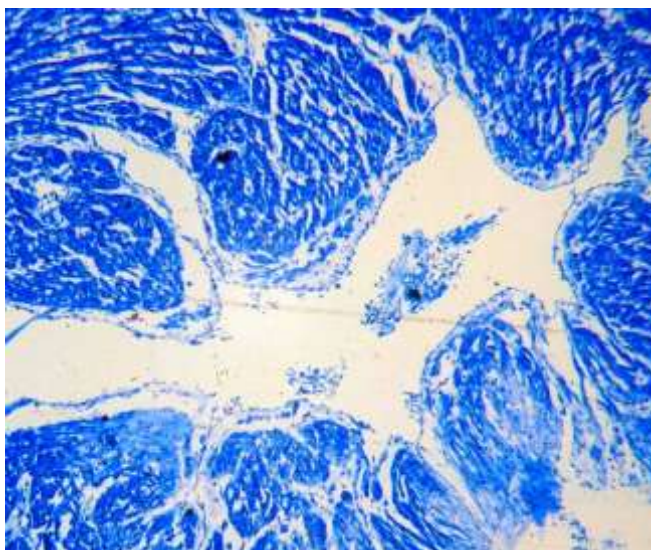


Рис. 3.31. набряк ендокарду стінки лівого шлуночку ембріона курки 12 доби інкубації після впливу гіпертермією. Забарвлення: метиленовий синій. Збільшення: об. x 10. ок. x 8.

Таким чином, вплив високими температурами на хід кардіогенезу виявлявся на всіх структурах серцевої стінки та серця у цілому. Найменшому впливу, як показали наші дослідження, підлягає епікард. Виникнення відходів від норми було незначним та лише на ранніх стадіях кардіогенезу. На останніх стадіях розвитку ми не спостерігали значних порушень цієї ділянки серцевої стінки. Підсумовуючи всі дані, що отримані нами по вадам серця ембріона курки після впливу гіпертермією, ми дійшли висновку, що найуразливішою ланкою раннього ембріонального серця є процес формування міжшлуночкової перегородки (рис. 3.32). Формування дефекту МШП відбувалося як порушення злиття мезенхімної та м'язової частин МШП.

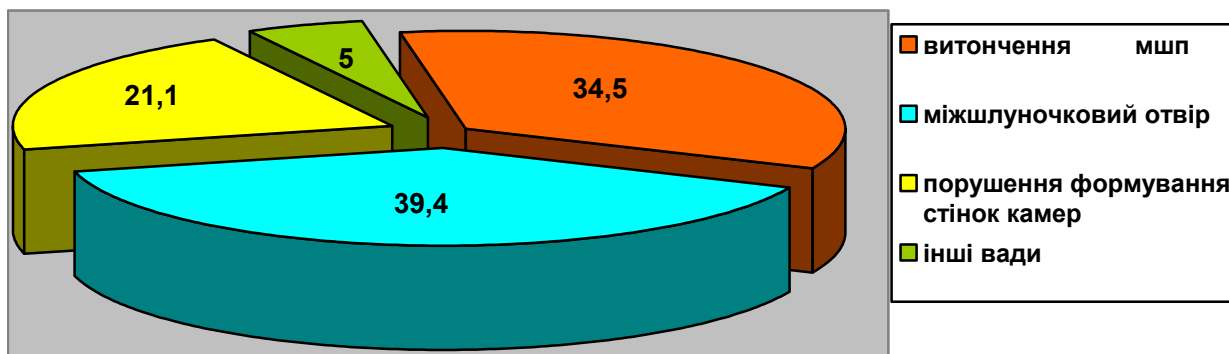


Рис. 3.32. Розподіл вад розвитку серця після впливу гіпертермією на ембріон курки.

Вплив високих температур на формуючі процеси раннього кардіогенезу відбивався, в першу чергу, на структурах серця, які на момент впливу утримували залишки кардіогелю або мезенхімні клітини. Порушення визначалося на ЕП та ендокардіальних гребенях КСВ ембріонального серця, які утримують як кардіогель так і мезенхіму.

Висновки за розділом

Таким чином, у результаті проведених досліджень ми виявили вплив гіпертермії на хід ембріогенезу та кардіогенезу курки. Було встановлено достовірне зменшення маси ембріонів при дії гіпертермії в порівнянні з контрольною групою. В 31,5% ембріонів після впливу високою температурою спостерігається виражене відставання в розвитку на 2-3 стадії за НН. Причому це відставання більш явно було виражено після 10-ї доби інкубації, тобто у віддаленій післядії. Нами були виявлені основні зовнішні аномалії розвитку курячого ембріону на різних етапах розвитку. На ранніх етапах ембріогенезу вплив високих температур приводить до відставання в рості, порушення

скручування та згинання ембріона в головному, тулубовому та хвостовому відділах, запізненні формування бруньок кінцівок, формування мозкових пухирів, дзьоба, ока та повік. Відставань у загальному розвитку ембріонів на пізніх етапах спостерігалось значно менше, але зниження вагових показників все ж відмічало порушення розвитку ембріона.

Поряд з загальними прикметами порушення розвитку, ми спостерігали також і порушення нормального кардіогенезу, а саме: вже з 4-ї доби інкубації ми спостерігали ектопію серця (3,6%), а з 10-ї доби нами також спостерігалась кила (4,7%).

Вивчення гістотопографічних та напівтонких зрізів показало, що гіпертермія призводила в певній мірі до змін в будові різних відділів камер серця, перегородок та серцевої стінки. Серед таких слід зазначити: витончення середньої частини міжшлуночкової перегородки (34,5%), формування дефектів МШП (39,4%), витончення міокарду стінки передсердя, аномальний розвиток трабекул, «двошаровий міокард» шлуночків (21,1%), набряк навколосудинного простору та порушень у формуванні клапанного апарату як передсердно-шлуночкових отворів так і клапанів великих судин. Дія високих температур не тільки змінювала обсяг та форму клапанів великих судин серця, але й місце відходження самої судини.

Зміни стулок передсердно-шлуночкових клапанів ми спостерігали як в правій так і лівій половині серця. Укорочення стулки м'язового клапану у правій частині та наявність великого міжшлуночкового отвору призводила до порушень скорочувальної функції серця, ця аномалія супроводжувалась порушенням співвідношення питомого обсягу мезенхімної та м'язової частин стулки. З боку лівого передсердно-шлуночкового клапану спостерігається також укорочення стулок, що формуються. Стулки як і в нормі, так і в експерименті утворені мезенхімою та вкриті шаром ендотелію, їх склад не відрізняється від контрольної групи, але мезенхімні клітини розташовані значно компактніше.

Результати дослідження за розділом представлені у публікаціях: 35, 37, 39, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 69, 117, 120, 123, 129, 130, 134, 136, 137, 138.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ НА МОРФОГЕНЕЗ КУРЯЧОГО ЗАРОДКА

4.1. Вплив гіпоксії на кількісні показники розвитку

Проведення попереднього дослідження впливу гіпоксії на різних групах ембріонів курей, показало, що вплив даного фізичного фактору відбувається в різних групах по-різному. За часом впливу гіпоксією ембріони розділялися на 3 групи: 1 група - вплив на 2-ій добі інкубації; 2 група - вплив на 4-ій добі інкубації; 3 група - вплив на 6-ій добі інкубації (контрольна група складала 50 ембріонів). Значна частина матеріалу гинула на різних стадіях інкубації. Розподіл матеріалу за часом загибелі представлено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Відсоток загиблих ембріонів курей після впливу гіпоксією та в нормі протягом ембріогенезу

Строк інкубації (доба)	1-ша група	2-га група	3-тя група	Контроль%
3	-	-	-	0,5%
4	-	-	-	0,5%
5	6,7%	-	-	-
6	6,7%	3,3%	-	-
7	3,3%	10%	-	-
8	-	10%	10%	2%
10	3,3%	13,4%	3,3%	-
12	-	3,3%	6,7%	2%
14	-	-	6,7%	2%
16	-	3,3%	6,7%	3%
18	-	-	-	4%
20	-	-	-	4%
усього	20%	43,3%	33,4%	18%

Аналіз отриманих результатів впливу показав різницю між групами. Смертність в першій групі (20%) не відрізнялась суттєво від контрольної (18%), а ембріони, що пережили вплив не мали порушень розвитку. Цей факт підтверджує слабку залежність загального розвитку ембріона від тимчасової гіпоксії на ранніх стадіях, що обумовлено незначним споживанням кисню в цей період або достатнім його запасом у повітряній камері яйця. Так як дослідження подальшого розвитку ембріонів першої групи вказало на відсутність вад розвитку як на загальному так і на органному рівнях, то дана група ембріонів нами не описувалася в нашій роботі. Ембріони другої групи мали найвищий рівень смертності (43,3%), а ті, що перенесли вплив гіпоксією мали значну кількість не тільки порушень розвитку цілого ембріону, але й вади розвитку серця. В третій групі смертність складала третину експериментальних тварин, але вади розвитку ембріона та вади розвитку серця зустрічались поодинокі, тобто вплив на хід ембріогенезу та кардіогенезу не представлявся значним.

Як видно з таблиці, напрямок збільшення смертності в контрольній і експериментальній (другій) групах були різними. Пік ембріональної смертності в експериментальних групах доводиться на 3-тю добу після впливу гіпоксією, а наприкінці інкубації ембріони, що пережили, гинули в незначній кількості. У той же час у контрольній групі пік смертності спостерігався нами на останніх стадіях розвитку. Нами вимірювались також вагові показники розвитку цілих ембріонів, які перенесли гіпоксію та порівнювались з вагою ембріонів контрольної групи. Дані представлені у таблиці 4.2.

Як показали дослідження, маса ембріонів, які підлягали впливу гіпоксією на ранніх термінах майже не відрізнялася від маси контрольної групи, що також свідчить на користь того факту, що запаси кисню у повітряній камері яйця на ранніх етапах ембріогенезу достатні для нормального розвитку ембріона, а потреба самого ембріону у кисню мінімальна. У тих групах, де вплив гіпоксією проводився на 3-4-ту та 6-ту добу маса ембріонів була зниженою протягом усіх етапів інкубації. Вагові

показники ембріонів другої експериментальної групи наприкінці ембріогенезу відставали від показників контрольної групи на 14,8%, а третьої на 16,4%.

Таблиця 4.2.

Показники маси зародків курей після впливу гіпоксією та в нормі протягом ембріогенезу $M \pm m$ (г)

Строк інкубації (доба)	1-ша група (вплив гіпоксією на 2-гу добу)	2-га група (вплив гіпоксією на 3-4-ту добу)	3-тя група (вплив гіпоксією на 6-ту добу)	Контрольна група
0	8,9±0,3	8,0±0,3	6,8±0,2**	9,1±0,7
2	9,8±0,5	8,2±0,4*	7,0±0,2**	10,3±0,6
4	14,9±0,6	13,7±0,8**	12,3±0,6**	16,5±0,7
6	22,0±0,7	21,0±0,9*	20,2±0,8*	24,7±0,6
8	25,8±0,6	23,6±1,3*	23,8±0,6*	26,6±0,7
10	29,6±0,7	26,8±1,4*	25,5±0,9**	30,5±0,7

* - $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

** - $p < 0,001$ при порівнянні з контрольною групою

Під час препарування ембріонів після 10 діб розвитку нами видалялися серця та окремо зважувалися, що дозволило обчислити кардіофетальний індекс, тобто співвідношення маси серця до маси цілого ембріона. Результати обрахування індексу представлені у таблиці 4.3.

Як видно з даних таблиці, значення кардіофетального індексу в першій експериментальній групі та в контрольній групі майже не відрізняються, що свідчить про відсутність суттєвих змін в розвитку серця ембріона при впливі гіпоксією на ранніх етапах розвитку. У подальших наших дослідженнях ми не

включали в опис результатів цю групу раннього впливу гіпоксією, бо подальший розвиток відбувався у всіх ембріонів, що виживають, нормальним. Третя група експериментальних тварин у зв'язку з відсутністю вад розвитку серця нами теж не досліджувалась. Тому в подальшому ми розглядали лише результати впливу на другу групу піддослідних тварин.

Зростання кардіофетального індексу у другій та третій групах експерименту свідчить на користь збільшення маси серця в порівнянні з контрольною групою.

Таблиця 4.3

Кардіофетальний індекс ембріонів курей в нормі та після впливу гіпоксією протягом ембріогенезу

Строк інкубації (доба)	1-ша група (гіпоксія на 2-гу добу)	2-га група (гіпоксія на 3-4-ту добу)	3-тя група (гіпоксія на 6-ту добу)	Контроль-на група
10	0,38±0,01	0,40±0,01	0,43±0,05	0,38±0,03
12	0,43±0,05	0,49±0,02*	0,48±0,04	0,43±0,01
14	0,56±0,03	0,59±0,01*	0,57±0,06	0,54±0,03
16	0,58±0,07	0,64±0,03*	0,62±0,05	0,58±0,02
18	0,63±0,02	0,65±0,02	0,64±0,09	0,62±0,07
20 -21	0,64±0,04	0,67±0,03	0,66±0,01	0,63±0,02

*- $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

Таким чином, ми спостерігали відсутність будь-якої значущої реакції зі сторони ембріонів першої групи, бо її вагові та відносні показники не відрізнялися від норми, що також підтверджувало наше рішення про виключення даної групи з результатів експерименту. Ми дійшли висновку, що даний період ембріогенезу майже не залежить від вмісту кисню та не може

бути розглянутий як можливий критичний період кардіогенезу. Вплив гіпоксією на 6 добу, в момент, коли вже сформовані органи, теж не відбився на розвитку серця, бо на цей термін ембріогенезу вже сформовані і серцеві перегородки і великі судини серця та клапанний апарат. Ми визначили, як можливий термінаційний період лише 3-4 добу ембріогенезу курки.

4. 2. Вплив гіпоксії на зовнішній розвиток ембріона

Вплив гіпоксії не приводив до формування зовнішніх каліцтв, відбиваючись більше на загальній смертності ембріонів. У наших дослідженнях не зустрічалися в результаті гіпоксії ні ектопії, ні кили, але спостерігалось помітне відставання в розвитку на 2-3 стадії за НН та порушення скручування ембріонів (рис. 4.1.).

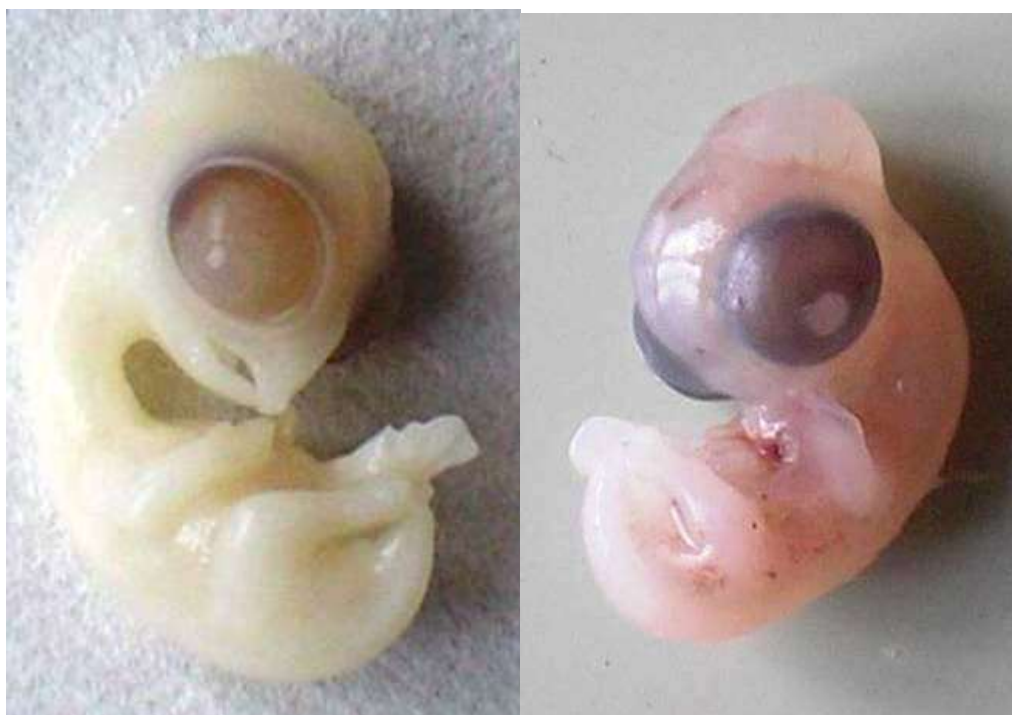


Рис. 4.1. Відставання на 3 стадії розвитку курячого ембріону 8-ї доби інкубації.

А - нормальний ембріон інтактної групи;

В - ембріон після впливу гіпоксією, затримка формування повік, бруньок кінцівок, форми голови.

При цьому явною була гіперемія покривів, порушення зовнішніх форм голови та тулубу, збільшення кута згинання, недорозвиток кінцівок, ока та дзьоба.

На більш пізніх етапах інкубації основні діагностичні ознаки, такі як поява пір'явих сосочків та розвиток кінцівок і дзьоба, а також формування ока та вії постійно демонстрували відставання у розвитку ембріонів, які підлягали впливу гіпоксії (рис. 4.2).



Рис. 4.2. Курячий ембріон 11-тої доби інкубації

А - нормальний ембріон інтактної групи;

В - ембріон після впливу гіпоксією: затримка формування повік, крила та ноги, пір'явих сосочків.

Досліджуючи вплив гіпоксії на зовнішній розвиток ембріонів курчати ми обчислили співвідношення нормально та аномально ембріонів, до яких відносили відставання у стадіях розвитку та порушення згинання ембріону (рис. 4.3.).

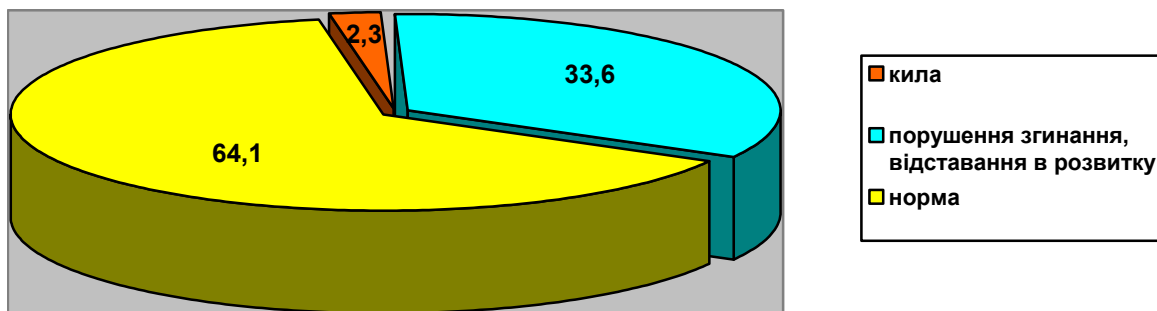


Рис. 4.3. Співвідношення відсотків вад зовнішнього розвитку та нормально розвинутих ембріонів курчати в експерименті під впливом гіпоксії.

Але відсутність зовнішніх каліцтв та порушень загального розвитку ембріона не розкривала істинної картини впливу гіпоксії на хід ембріогенезу. Як показали подальші дослідження ембріони, що були віднесені до нормальної групи розвитку за зовнішніми ознаками, мали суттєві порушення розвитку серцево-судинної системи.

4.3. Вплив гіпоксії на кардіогенез курячого зародка

Нами досліджувалися гістологічні зрізи ембріонального серця курячого зародка розпочинаючи з 7-ї доби інкубації тому, що на ранніх термінах розвитку гіпоксія не призводить до порушень ембріогенезу. Формоутворюючі процеси серця виразно змінюються під впливом зниженого рівня кисню в навколишньому середовищі. Ці зміни відбуваються в усіх ділянках дослідженого органа: перегородках, клапанах, великих судинах серця та в самій серцевій стінці.

Зміни клапанного апарату зафіксовано як у правому м'язовому клапані передсердно-шлуночкового отвору так і в лівому. Стулка правого передсердно-шлуночкового клапана укорочена, складається в основному з

мезенхімних клітин залишків ендокардіальних подушок АВК. В середині самої стулки спостерігається ділянка незабарвленої речовини, що виглядає як надто великий інтерстиціальний простір (рис. 4.4).

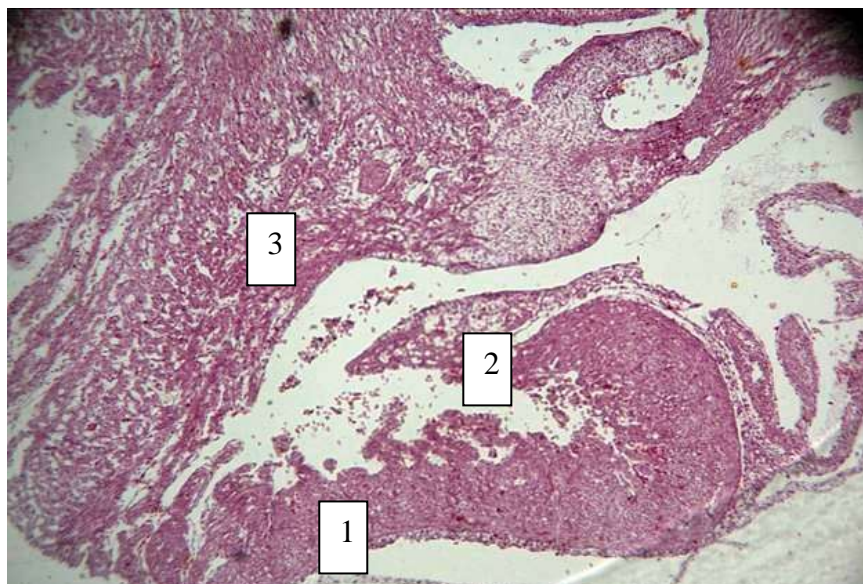


Рис. 4.4. Серце ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 4. ок. х 10.

- 1 – стінка правого шлуночку;
- 2 - стулка правого передсердно-шлуночкового клапану;
- 3 – міжшлуночкова перегородка.

На більших збільшеннях добре помітно, що вказаний інтерстиціальний проміжок є межею між мезенхімною та м'язовою частинами стулки клапану, а верхівка стулки містить незначні перфорації, або отвори, яких в нормі не зустрічається (рис. 4.5).

Формування цього інтерстиціального простору, який відмежовував м'язову та мезенхімну частини стулки правого передсердно-шлуночкового клапану відбувалось в усіх групах експериментальних тварин, навіть якщо інші зміни клапанного апарату не виявлялись.

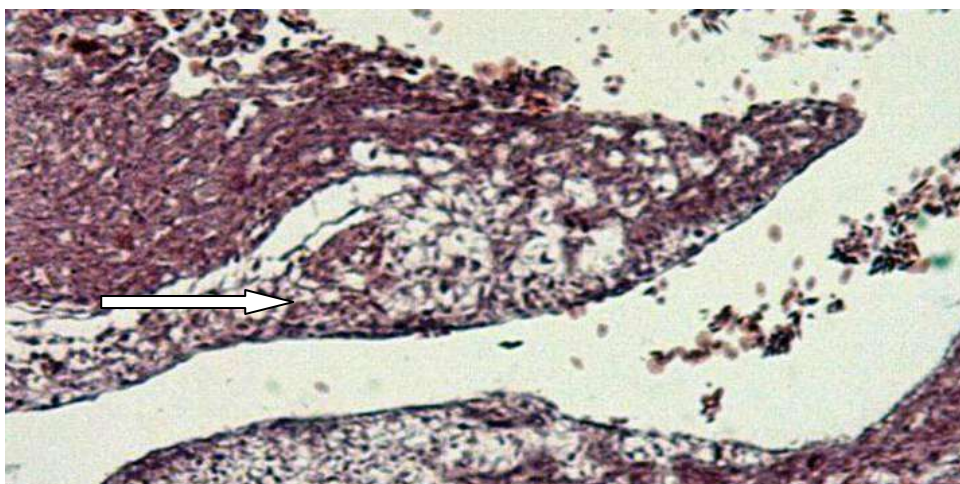


Рис. 4.5. Клапан стулки правого передсердно-шлуночкового отвору серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Збільшений фрагмент попереднього фото. Інтерстиціальний простір вказано стрілкою. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. x 10. ок. x 10.

Таке розмежування двох частин стулки свідчить про порушення процесу міокардіолізації мезенхімної частини стулки, а значить про порушення утворення самого клапану (рис. 4.6 та рис. 4.7). Цей інтерстиціальний проміжок має пряме сполучення з передсердно-шлуночковою борозною, що формується і містить у собі окремі пухко розташовані тяжкі мезенхімних клітин та залишки кардіогелю.

Та поверхня клапану, що звернена у порожнину шлуночку має добре розвинутий ендотеліальний шар клітин, до яких прилягають мезенхімні клітини залишків ендокардіальних подушок. Ці клітини виражено неоднорідні і розподіляються на групи як за своєю формою так і за розташуванням у клапані. Під ендотеліальним шаром стулки знаходяться щільно упаковані мезенхімні клітини з короткими відростками, які утворилися за допомогою епітеліально-мезенхімних трансформацій на етапах раннього кардіогенезу з ендотелію АВК.



Рис. 4.6. Серце ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Залишки ендокардіальних подушок правого передсердно-шлуночкового отвору (вказано стрілками). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 4. ок. х 10.

В середній частині мезенхімної частки стулки знаходяться типові мезенхімні клітини з довгими зірчастими відростками, що утворюють з'єднання між окремими клітинами та мають добре помітні прошарки кардіоміоцитів, що формуються. В нормі цей шар мезенхімної частини на даному етапі розвитку вже майже повністю представлений кардіоміоцитами, але під дією гіпоксії процес міокардіолізації затримується.

Останній шар мезенхіми – це поодинокі, пухко розташовані клітини, що мають довгі відростки, які еднають їх між собою та зберігають ще досить велику кількість кардіогелю, якого в нормі в цей період вже майже не існує в стулках (рис. 4.7).

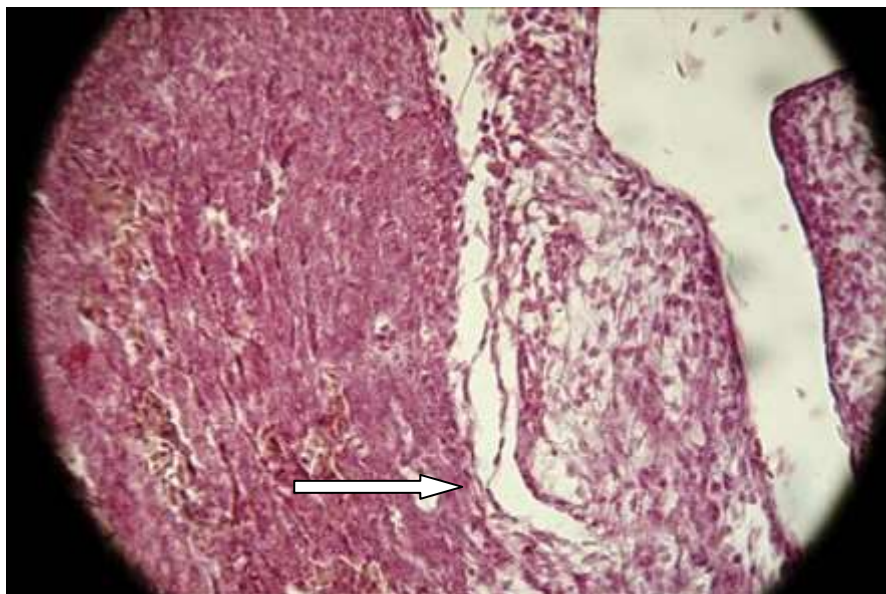


Рис. 4.7. Залишки ендокардіальних подушок правого передсердно-шлуночкового отвору серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Збереження кардіогелю на межі мезенхіми та кардіоміоцитів (вказано стрілкою). Збільшений фрагмент попереднього фото. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. x 40. ок. x 10.

В лівому передсердно-шлуночковому клапані, що формується, ми також спостерігали порушення процесів розвитку, що виявлялися у затримці компактизації мезенхіми стулок.

Нами спостерігалось також порушення форми стулок первинного клапану у вигляді укорочення або витончення підстави і порушення мезенхімної частини стулок (рис.4.8). Такі стулки не були конгруентними і це не могло не відбиватися на скорочувальній функції серця. Аномальні за формою стулки передсердно-шлуночкового отвору призводили до порушень гемодинамічної функції серця ембріону, а порушення гістогенетичних процесів призводило до зміни складу та обсягу стулок клапану.

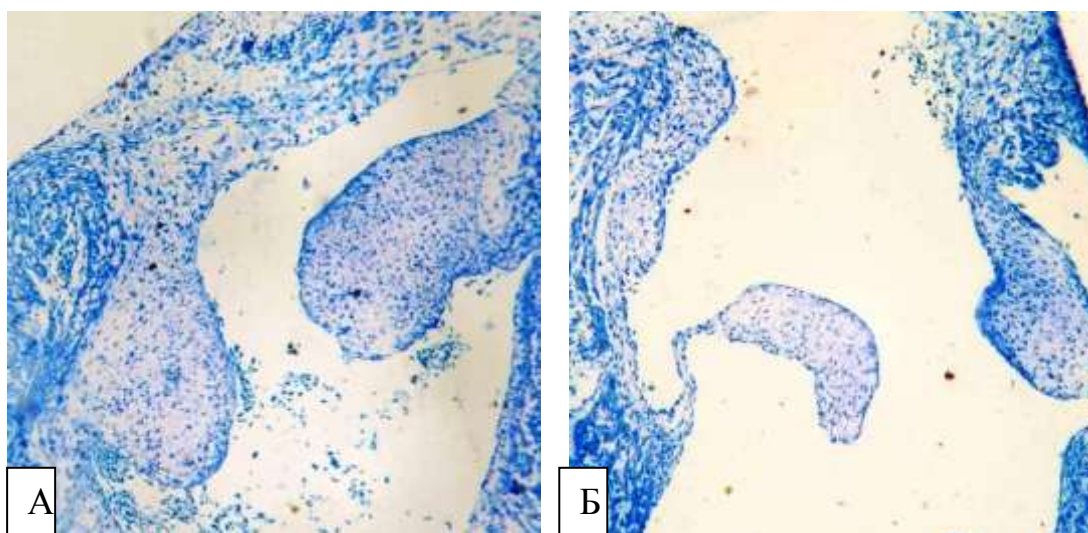


Рис. 4.8. Варіанти порушень форми первинних стулок лівого передсердно-шлуночкового отвору серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Напівтонкий зріз передсердно-шлуночкових клапанів.

А – потовщення стулок та нерівномірність ущільнення мезенхімних клітин;

Б – витончення підстави та зменшення обсягу стулки.

Забарвлення: метиленовий синій та ШИК-реакція. Збільшення: об. х 40. ок. х 10.

Змінювались під впливом гіпоксії також і морфометричні параметри, а саме: ми спостерігали збільшення довжини стулки правого м'язового передсердно-шлуночкового клапану (табл. 4.4). Ми дійшли висновку, що м'язові структури після впливу гіпоксією мають здатність до гіпертрофії. Саме такі процеси відбувались у різних ділянках серця, де розміщувався міокард. Так як правий передсердно-шлуночковий клапан є похідною делямінаційної пластинки, а вона складається з шару міокарду, то і реакція відповіді на зовнішнє втручання (гіпоксію) буде мати спільні риси з міокардом всього серця. Розташування на делямінаційній пластині мезенхімних залишків ендокардіальних подушок призводило до того, що спостерігалось збільшення довжини, але зменшення питомої площі самої стулки. Зменшення обсягу стулки відбувалось по-різному у різних її ділянках та в різних стадіях

розвитку, але загалом визначався зазначений напрямок аномального розвитку (табл. 4.5).

Таблиця 4.4

Динаміка зміни довжини стулок передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки в нормі та після впливу гіпоксією протягом ембріогенезу (мкм) $M \pm m$

Стадія розвитку за НН (доба розвитку)	Довжина стулки правого передсердно-шлуночкового клапану		Довжина стулки лівого передсердно-шлуночкового клапану	
	контроль	експеримент	контроль	експеримент
34 (8доба)	347±12	358±19	456±14	462±25
36 (10 доба)	456±24	483±28	501±29	576±38*
39 (13 доба)	497±28	537±31*	542±28	578±43
41 (15 доба)	536±31	562±27	635±34	640±49
44 (18 доба)	612±25	634±42	788±52	801±47
46 (20 доба)	645±41	676±51*	796±39	812±31

* - $p < 0,05$

Таким чином, ми виявили, що вплив гіпоксії на м'язові та мезенхімні структури раннього ембріонального серця не є однозначним. Відповіддю на вплив зазначеного чинника зі сторони м'язових елементів є часткова або повна гіпертрофія та збільшення клітинних компонентів. А відповіддю зі сторони мезенхімних ембріональних структур є зменшення їх морфометричних показників. Така неоднорідна реакція у межах одного органу, що розвивається, мабуть зумовлена ступенем диференціювання та зрілості окремих тканин та структур серця. Міокард є структурою, що швидко диференціюється, бо раннє скорочення м'язових пучків цьому сприяє.

Мезенхіма передсердно-шлуночкових стулок клапанів, як структура, що виникає значно пізніше та підлягає розвитку і диференціюванню у серці, що вже працює, підлягає впливу гіпоксії і це порушує її нормальний розвиток та призводить до зменшення обсягу і викликає зміни в клітинному складі.

Таблиця 4.5

Зміна питомої площі стулки правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки в нормі та під впливом гіпоксією на пізніх стадіях розвитку і співвідношення цих показників ($M \pm m$)

Стадія розвитку за НН	Питома площа стулки в нормі	Питома площа стулки після гіпоксії	Співвідношення площин (гіпоксія/норма)
38	0,55±0,03	0,45±0,01	81,8%
40	0,57±0,03	0,48±0,03*	84,2%
42	0,58±0,03	0,52±0,02*	89,6%
44	0,59±0,03	0,55±0,02*	94,5%
46	0,63±0,04	0,56±0,04*	88,8%

*- $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

Лівий передсердно-шлуночковий клапан суттєво відрізняється по своїй будові та гістологічному складу від правого мускульного клапану. В нормі формування його починається у ті ж самі терміни як і в правій половині серця і також за рахунок делямінації. Але, на відміну від правого, стулки цього клапану формуються більшою мірою з мезенхіми ендокардіальних подушок та невеликого прошарку кардіоміоцитів делямінаційної пластинки. Такий тип клапану характерний для серця ссавців і складається у дефінітивному стані з

дублікатури ендокарду. Краї стулок кріпляться сухожилковими струнами до соскоподібних м'язів шлуночку і утворюють клапанний апарат передсердно-шлуночкового отвору.

Після розподілу загального АВК на правий та лівий майбутні стулки клапану мають вигляд пластин, що звисають з краю передсердно-шлуночкового отвору у порожнину шлуночку та складаються з тонкого прошарку міокарду та більшої частини мезенхіми, вкриті ендокардом. Під впливом гіпоксії затримувався розвиток самих стулок, що проявлялося у затримці ущільнення самих стулок та формування сухожилкових струн. Гістологічно з боку мезенхімної частини нами не виявлено ніяких аномалій розвитку клапана, крім затримки процесів компактизації та міокардіолізації (рис. 4.9).

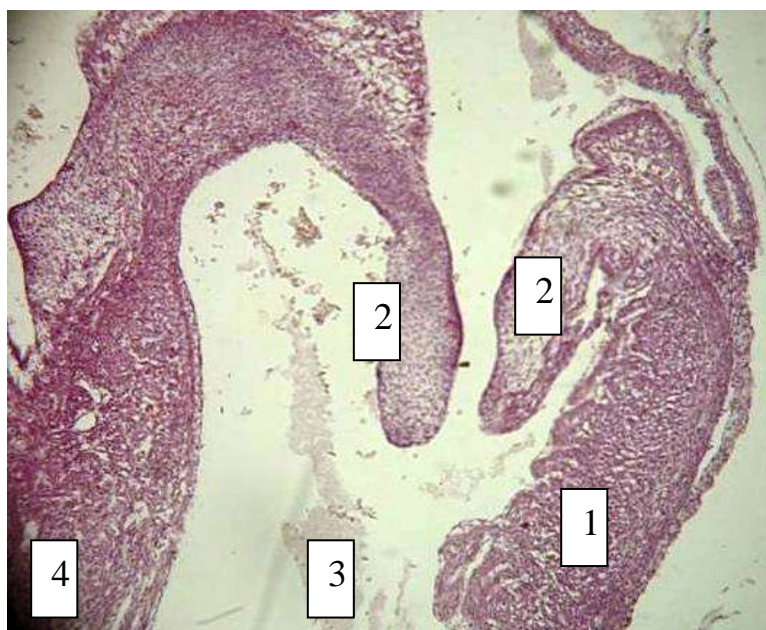


Рис. 4.9. Серце ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Лівий шлуночок та передсердно-шлуночкові клапани. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. x 10. ок. x 10.

- 1 – стінка лівого шлуночку;
- 2 – стулки передсердно-шлуночкового клапану, що формується;
- 3 – порожнина лівого шлуночку;

4 – міжшлуночкова перегородка.

Спостереження показали, що з боку міокардіальної частини стулок часто спостерігалися відхилення у формуванні клапанного апарату, а саме: утворювалися тяжі міокарду, що з'єднували стінку шлуночку та саму стулку, що формується (рис. 4.10). Такі поєднуючі тяжі не можуть не впливати на скорочувальну функцію шлуночків та роботу клапанів серця ембріона.

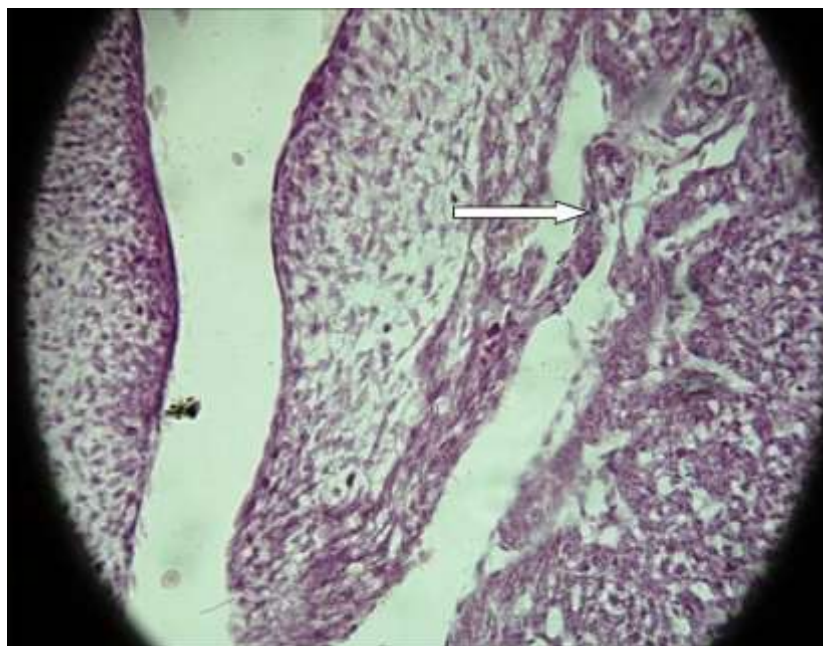


Рис. 4.10. Лівий передсердно-шлуночковий клапан серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Збільшений фрагмент попереднього фото. Стрілкою вказано на аномальний тяж міокарду. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 40. ок. х 10.

Формування стінок шлуночків відбувалося в цей період з невеликими змінами у порівнянні з нормою. Міокард обох шлуночків був потовщений та спостерігалося більш посилене проростання судин. У стінках передсердь на даному етапі розвитку аномалій не виявлено.

Відміни від норми спостерігалися нами у області формування клапанів великих судин та в місцях їх відходження. Клапани аорти та легеневого стовбуру майже не зазнавали патологічних гістологічних змін у своїй будові,

але виявляли досить чітке відставання на 2-3 стадії розвитку від норми. На 7-й добі інкубації вже мали кишеньоподібну форму та склалися з мезенхімних клітин, вкритих ендокардом (рис. 4.11).

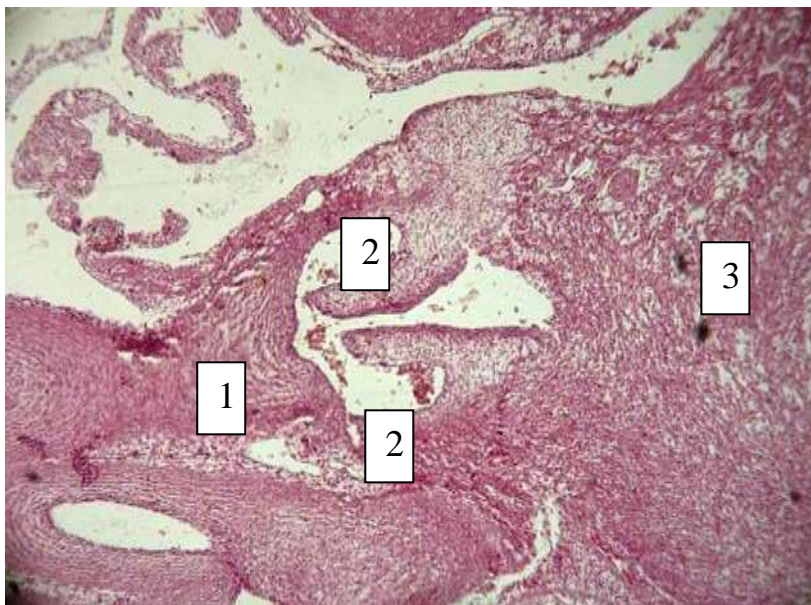


Рис. 4.11. Клапани аорти серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 10. ок. х 10.

- 1 – аорта;
- 2 – клапани аорти;
- 3 – міжшлуночкова перегородка.

Поверхня стулок клапанів, що звернена у просвіт судини під шаром ендотеліальних клітин містить у собі 4-5 шарів щільно упакованих мезенхімних клітин без відростків. Середня частина стулки складається з типових мезенхімних клітин з численними відростками, які з'єднують між собою окремі рідко розташовані клітини. А внутрішній шар стулки, тобто та її поверхня, що звернена до стінки судини та контактує з ендотелієм представлена поодинокими клітинами, які не утворюють щільного контакту з ендотеліальною вистилкою (рис. 4.12). Але в нормі в цей період формування судин та серця клапани великих судин уже містять прошарки кардіоміоцитів,

що виявляються у вигляді спрямованих вздовж краю стулки прошарків. В нормі в основі ендокардіальних потовщень стулок знаходяться перші окремі угруповання кардіоміоцитів, які мігрують від стінки шлуночку. Міграція здійснюється завдяки процесам спрямованого зростання окремих пучків кардіоміоцитів. Характерним є також той факт, що ці пучки зростають у товщі мезенхімних клітин, утворюючи прошарки міокарду у основі стулки клапану. Ми дійшли висновку, що ці угруповання клітин відіграють роль строми для стулки, що формується.

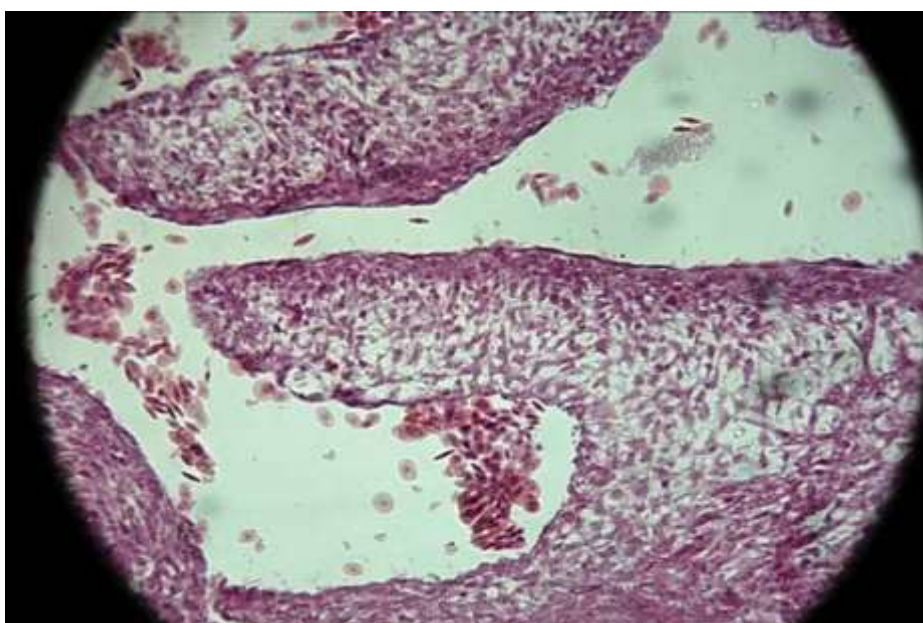


Рис. 4.12. Клапани аорти серця ембріона курки 7-ї доби інкубації після впливу гіпоксією. Мезенхімні клітини стулок. Збільшений фрагмент попереднього фото. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 40. ок. х 10.

Як показали гістологічні дослідження ембріональних сердець другої половини ембріогенезу, вплив гіпоксії може істотно змінювати формування стінки шлуночку серця. Зокрема, знижений вміст кисню приводив до патологічного осередкового потовщення стінки правого та лівого шлуночку в його середній третині (рис. 4.13). Явно виражена неоднорідність товщини міокарда, на нашу думку, може приводити до порушення динаміки скорочення

раннього серця й у нормі у ембріонів контрольної групи нами не спостерігалася. Якщо на ранніх етапах розвитку зустрічалася рівномірне збільшення товщини стінок шлуночків, то в другій половині ми спостерігали сема серединне потовщення стінки шлуночків.



Рис. 4.13. Стінка правого шлуночку ембріона курчати 12-тої доби інкубації після впливу гіпоксією. Зabarвлення: гематоксилін-еозин, збільшення Об. х 10, ок. x10.

1 – епікард серцевої стінки;

2 – потовщення міокарду в середній частині шлуночку.

Таке потовщення серцевої стінки може вказувати на вентрикулярну гіпертрофію ембріонального серця. При порівнянні товщини серцевої стінки шлуночків ембріонів, які підлягали впливу гіпоксією, та товщини серця ембріонів контрольної групи протягом усього ембріогенезу, можна стверджувати, що гіпоксія достовірно збільшує товщину шлуночків серця (табл. 4.6). Для більш достовірного порівняння ми окремо досліджували товщину компактного та трабекулярного шарів міокарду стінок серця, бо як

загальновідомо ці показники досить виразно змінюються протягом раннього кардіогенезу.

Таблиця 4.6

Динаміка зміни товщини компактного шару міокарду стінки шлуночку серця ембріонів курки протягом ембріогенезу в нормі та після впливу гіпоксії (мкм)

Стадія розвитку за НН (доба)	Товщина компактного шару міокарду стінки			
	правого шлуночку		лівого шлуночку	
	контроль	експеримент	контроль	експеримент
34 (8 доба)	120±6,4	157±6,3	120±6,2	132±7,8
36 (10 доба)	190±11,8	270±21,2	347±8,2	376±12,3*
39 (13 доба)	430±12,1	628±34,0*	529±11,6	587±17,6
41 (15 доба)	720±34,1	970±68,0*	924±46,3	1120±52,1*
44 (18 доба)	1030±67,3	1385±96,2*	1220±59,7	1431±62,2*
46 (20-21 доба)	1212±54,8	1830±99,0*	1443±78,1	1690±96,3*

*- $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

Наші дослідження показали, що товщина стінки шлуночків після впливу гіпоксією достовірно збільшується.

Нами спостерігались зміни в формуванні МШП серця ембріонів, які підлягали впливу гіпоксією та ембріонів контрольної групи протягом усього ембріогенезу. Можна стверджувати, що гіпоксія достовірно збільшує товщину міжшлуночкової перегородки серця в її верхівковій, проміжній та базальній частинах (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Динаміка зміни товщини міжшлуночкової перегородки серця ембріонів курки протягом ембріогенезу в нормі та після впливу гіпоксії (мкм) $M \pm m$

Строк інкубації	Товщина міжшлуночкової перегородки					
	верхівкова частина		проміжна частина		базальна частина	
	контроль	експеримент	контроль	експеримент	контроль	експеримент
10 діб	521±34	589±21	611±46	751±12	465±32	472±22
12 діб	654±42	734±29*	674±52	782±36*	512±27	628±34*
14 діб	835±58	897±73	876±68	957±28	689±48	740±51
16 діб	1234±73	1540±85 *	1423±94	1542±86 *	1067±62	1149±60 *
18 діб	1765±49	1863±97	1849±79	1946±79 *	1679±93	1720±94 *
20 діб	1860±95	1958±92	1956±92	1980±47	1785±84	1825±79

*- $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

Як видно з таблиці, товщина міжшлуночкової перегородки протягом ембріогенезу достовірно збільшувалася.

Крім того, ми спостерігали невластиву для нормального кардіогенезу картину нещільного прилягання епікарду до міокарда шлуночку. Це свідчить про затримку формування серцевої стінки. Утворення трьохшарової стінки серця відбувається в нормі досить неоднаково в різних відділах серцевої трубки. Епікард розвивається з невеликою затримкою в часі, його виникнення у зоні дорзального мезокарду та «обгортання» сигмоподібного серця відбувається в той період, коли серцевої трубки вже не існує як і вентрального мезокарду. В ділянках, які дають початок майбутнім шлуночкам, епікард не щільно прилягає до міокарду, але в області майбутніх передсердь у нормі

відбувається досить швидко щільне прилягання та утворення єдиної серцевої стінки. В наших дослідженнях епікард шлуночків ембріонального серця птахів після впливу гіпоксією розташовувався досить пухко по відношенню до міокарду та навіть утворював численні містки. Міокард шлуночків під впливом гіпоксії утворював «містки» між окремими трабекулами – тобто гіперрозвинуті або аномальні трабекули, схожі на такі після гіпертермії (рис. 4.14). Такі трабекули виглядали як додатковий шар міокарду, що розташований над трабекулярним шаром стінки шлуночку. Це порушення формування стінки шлуночку пов'язане зі зсувом процесу делямінації стінки шлуночку на ранніх етапах розвитку. Порушення формування делямінаційної пластинки призводить до порушення утворення клапанів передсердно-шлуночкових отворів та трабекул внутрішнього шару шлуночків. Трабекули вкриті шаром ендотелію, який повністю зберігається і на поверхні «містків», але вкриває їх досить пухко на відміну від самих трабекул.

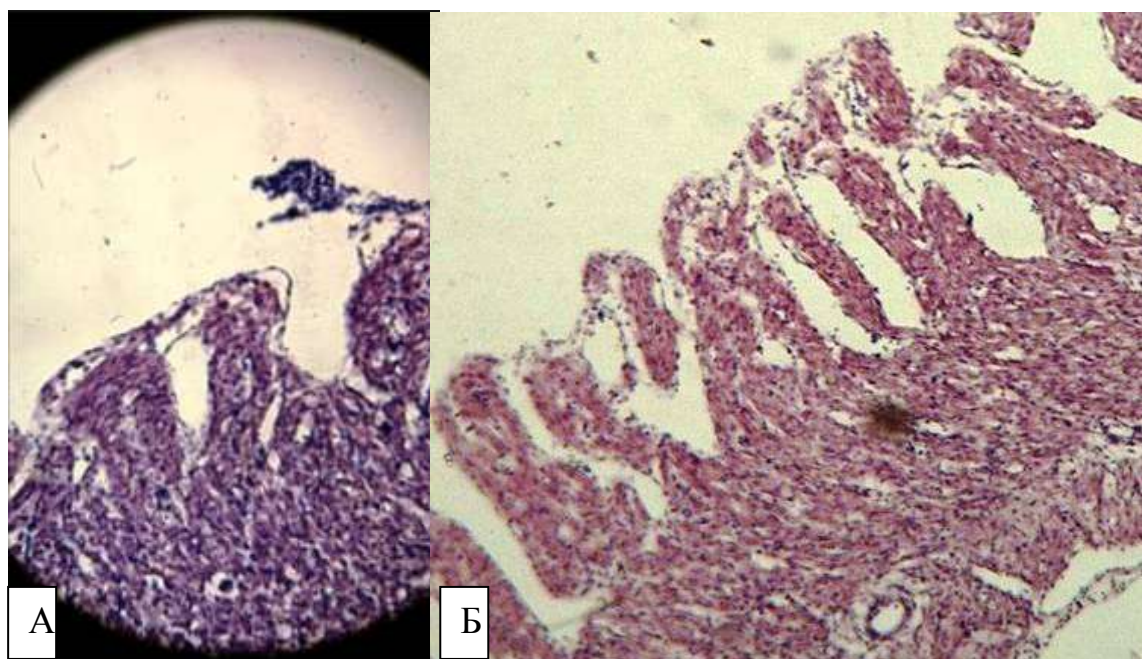


Рис. 4.14. Утворення «містків» між трабекулами міокарда шлуночків серця під впливом гіпоксії у ембріона курчати 9 діб (А), та 12 діб (Б) інкубації. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення: об. х 20, ок. х 20.

У міокарді шлуночків і передсердь нами виявлено більш високий ступінь васкуляризації в порівнянні з нормою. Дослідження показали, що

гіпоксія провокує активне проростання судин у межах компактного міокарда. Описаний період ембріогенезу в нормі характеризується формуванням протокапілярів шляхом каналізації міжклітинних просторів за рахунок агрегації веретеноподібних мезенхімних клітин. Але в серці ембріона, підданого впливу гіпоксії, істотно підвищувалася кількість функціонуючих розгалужених судин. У трабекулярному шарі проростання судин нами помічено не було міокарді в обох групах, тому що кровопостачання цих елементів серцевої стінки здійснюється з порожнини серця. Звертає на себе увагу також те, що збільшується периваскулярний простір, а також збільшені інтерстиціальні проміжки між пучками кардіоміоцитів (рис. 4.15).

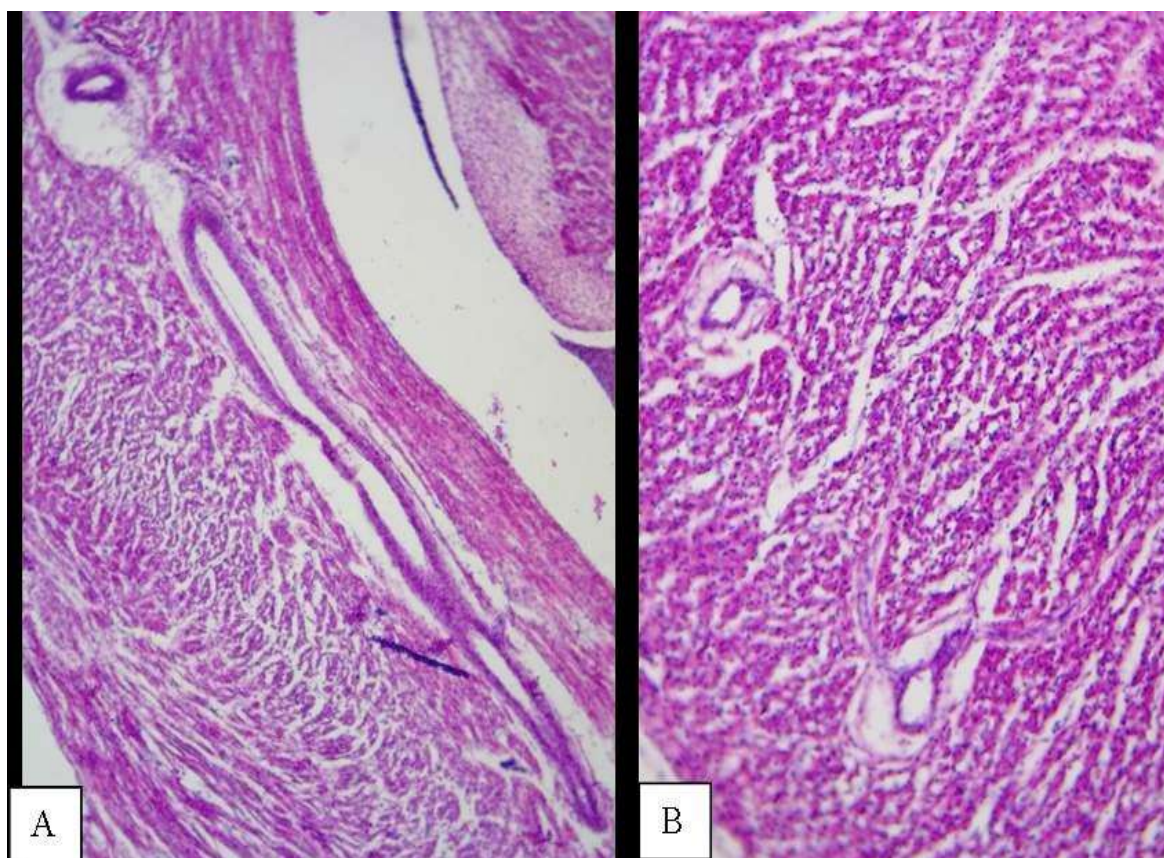


Рис. 4.15. Судини міокарду міжшлуночкової перегородки (А) і стінки правого шлуночку (В) ембріона курчати 12-тої доби інкубації після впливу гіпоксією. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення: об. х 10, ок. х 20.

Питома площа судин у стінці міокарда ПШ ембріона на цьому строку розвитку після впливу гіпоксією становила $0,0686 \pm 0,001$, у той час як у нормі вона становила не більше $0,047 \pm 0,001$. Таким чином, збільшення питомого числа судин у міокарді, підданому гіпоксії відбувається в 1,45 більше.

В період кардіогенезу, що відповідає 12-16 добі розвитку в стінці передсердь експериментальної групи формуються аномальні трабекули з тонкою підставою й масивними стовщеннями на кінцях, в той час як товщина стінки передсердя зменшується з 29 по 35 стадію розвитку а наприкінці інкубації спостерігається незначне потовщення міокардіального прошарку (табл. 4.7). Трабекули передсердь експериментальної групи містять численні судини з форменими елементами крові. Епікард передсердь місцями багат шаровий, пухко впакований (рис. 4.16).

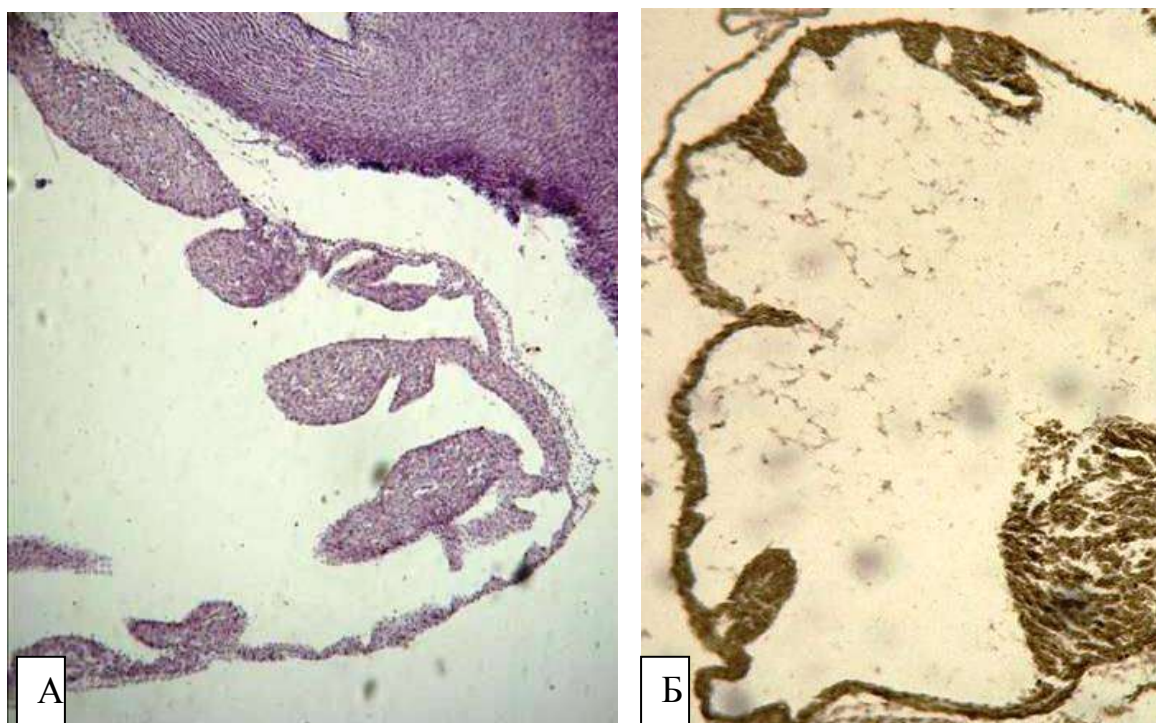


Рис. 4.16. Трабекули міокарду стінки правого передсердя ембріона курчати 12-тої доби інкубації після впливу гіпоксією (А) та в нормі (Б). Забарвлення: гематоксилін-еозін, збільшення Об. x 4, ок. x10.

Таблиця 4.7

Динаміка зміни товщини передсердь в нормі та під впливом гіпоксії в серці ембріона курки на етапах ембріогенезу (мкм), $M \pm m$

Стадії розвитку За НН	В контрольній групі	Під впливом гіпоксії
21	21,6±1,3	20,8±1,1
25	25,3±1,4	24,7±1,2
28	28,3±1,7	26,1±1,6
29	49,8±2,4	42,5±2,2*
31	58,9±2,3	51,3±2,5*
35	65,4±2,2	57,5±2,9*
37	67,6±3,4	64,8±3,2
39	72,5±3,9	69,7±3,1
41	76,4±5,2	74,2±4,1
43	77,3±4,9	78,5±4,3
45	78,2±5,3	80,6±4,9
46	79,5±7,2	82,5±6,1

* $p < 0,05$ – достовірна різниця при порівнянні з контрольною групою

Особливий інтерес викликали зміни у формуванні МШП. У нормі найбільш активний ріст МШП в ембріонів курки відбувається з 28-ї за 30-ту стадію (відповідно до таблиць нормального розвитку за Гамбургером і Гамільтоном), що відповідає з 5,5-ю доби до 13-тої доби ембріогенезу. У формуванні міжшлуночкової перегородки беруть участь м'язовий гребінь, що утворює її апікальну частину, а також ендокардіальні подушки атріовентрикулярного каналу, що беруть участь у формуванні її базальної частини. В експериментальній групі нами спостерігалися численні факти відставання в рості, гіпоксія приводить до посиленого трабекуляції,

розпушуванню пучків перегородки й навіть формуванню перфорацій (рис. 4.17). Верхівкова третина перегородки формується як щільний міокард, середня її третина представлена трабекулами, покритими ендокардом і утворюючої численні перфорації в перегородці.

У нормі на цій стадії розвитку МШП представлена внутрішнім шаром щільного міокарда й трабекулами з боку порожнин шлуночків. Вплив гіпоксією змінив структуру міокарда перегородки.

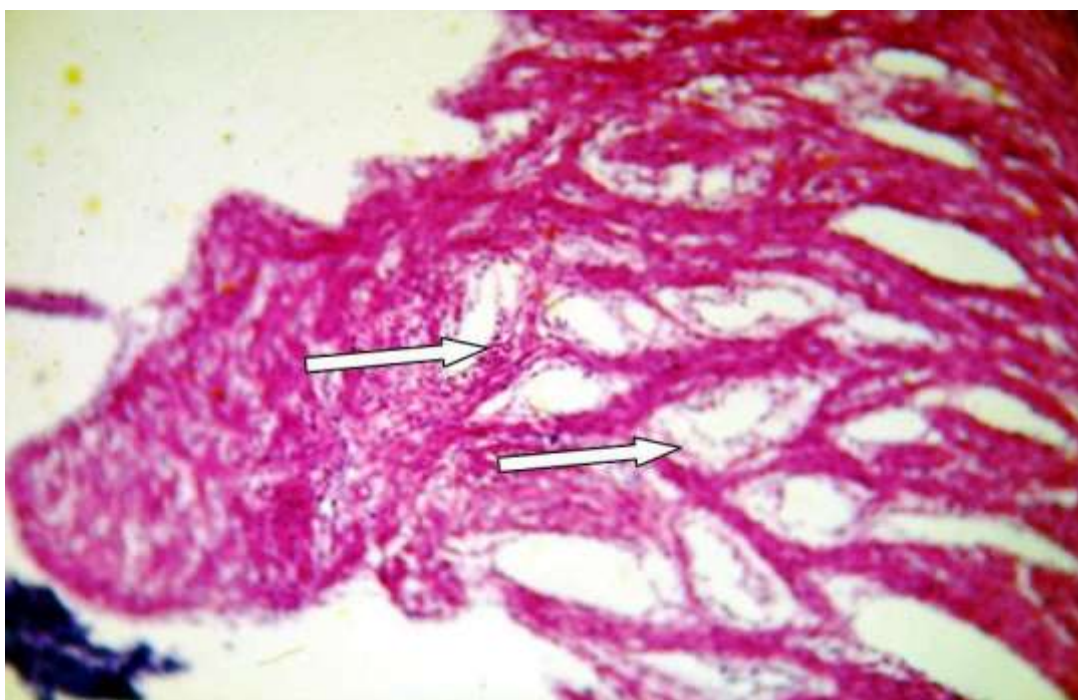


Рис. 4.17. Міжшлуночкова перегородка серця ембріона курчати 12-ти доби інкубації після впливу гіпоксією. Стрілками зазначені перфорації перегородки. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. х 10. ок. х 10.

Таким чином вплив нестачі кисню на хід кардіогенезу виявлявся на всіх структурах серцевої стінки та серця у цілому (рис. 4.18). Підсумовуючи всі дані, що отримані нами по вадах серця ембріона курки після впливу гіпоксією, ми дійшли висновку, що найуразливішою ланкою кардіогенезу є процес септації та формування стінок серця. Проте необхідно враховувати, що в даному дослідженні спостерігались комбіновані групи вад розвитку

серця, наприклад збільшення обсягу функціонуючих судин часто співпадало з порушенням формування перегородок серця або стулок клапанів. Найзначнішу частину вад як і в попередньому дослідженні складала дефекти МШП.

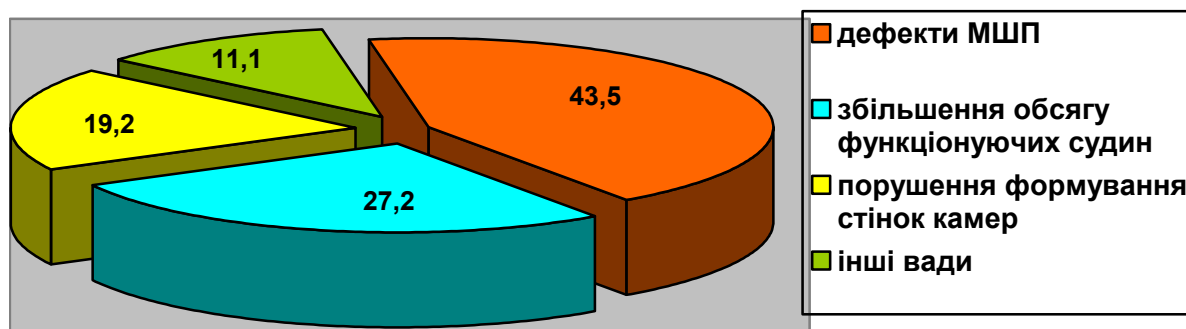


Рис. 4.18. Розподіл вад розвитку серця після впливу гіпоксією на ембріон курки.

Висновки за розділом

Вплив гіпоксії на хід ембріогенезу в першу чергу проявлявся в збільшенні загальної смертності ембріонального матеріалу, смертність в експериментальній групі досягла 43%. Характерним було також незначне зростання смертності після впливу гіпоксією на ранніх стадіях розвитку в першій експериментальній групі (20%), в той час як в контрольній групі цей відсоток становив 18%.

Маса ембріонів, які підлягали впливу гіпоксією на ранніх термінах не суттєво відрізнялася від маси контрольної групи, що також свідчить на користь того факту, що запаси кисню у повітряній камері яйця на ранніх етапах ембріогенезу достатні для нормального розвитку ембріона, а потреба

самого ембріону у кисню мінімальна. Цей факт підтверджує слабку залежність загального розвитку ембріона від тимчасової гіпоксії на ранніх стадіях.

Гіпоксія після 3-х доби інкубації значно впливає на хід кардіогенезу. У другій та третій групах, де вплив гіпоксією проводився на 3-4-ту та 6-ту добу маса ембріонів була зниженою відповідно на 14,8%, а третьої на 16,4%. Зростання кардіофетального індексу у другій та третій групах експерименту свідчить на користь збільшення маси серця в порівнянні з контрольною групою.

На всіх стадіях ембріогенезу спостерігалось помітне відставання в розвитку на 2-3 стадії за НН та порушення скручення ембріонів

В лівому передсердно-шлуночковому клапані, що формується, ми також спостерігали затримку процесів розвитку, що виявлялися у затримці компактизації мезенхіми стулок. Нами спостерігалось також порушення форми стулок первинного клапану у вигляді укорочення або витончення підстави і порушення мезенхімної частини стулок

Найчастіше порушення розвитку, що зустрічається - це нерівномірне формування стінки шлуночків, затримка росту МШП, перфорація МШП, посилена васкуляризація міокарда передсердь і шлуночків. З боку порушень будови стінки передсердь, ми спостерігали витончення міокарду та утворення аномальних трабекул передсердь ембріона.

Результати дослідження за розділом представлені у публікаціях: 35, 37, 39, 40, 43, 47, 48, 117, 119, 120, 121, 126, 129, 134, 135, 137, 138.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ГІПЕРТЕРМІЇ НА МОРФОГЕНЕЗ ЗАРОДКА ЩУРА

5.1. Вплив гіпертермії на кількісні показники розвитку

Для дослідження впливу гіпертермії на загальний хід ембріогенезу нами, як і в попередніх дослідженнях з ембріонами курки, визначалися та порівнювались з нормою вагові показники та відповідність стадіям розвитку ембріону щура за діагностичними критеріями. Волога вага ембріонів щурів фіксувалася з 12-ї доби розвитку, коли ембріон добре відокремлюється від ембріональних оболонок. Як видно з результатів дослідження, вагові показники цілого ембріона, при порівнянні з нормою, відображають вплив гіпертермії на загальний розвиток ембріона (табл. 5.1). Вже з самого початку 12-ї доби спостерігається відставання у масі ембріона, що підлягав впливу гіпертермії, а на 16 добу втрата ваги сягала 18,5%. Наприкінці ембріогенезу відставання зменшувалось до 9,5% .

Таблиця 5.1

Показники ваги ембріонів щурів після впливу високою температурою та в контрольній групі протягом ембріогенезу

Строк розвитку	Вага ембріонів (г)		Відсоткова втрата ваги
	експеримент	контроль	
12 діб	9,3±0,2*	10,4±0,5	10,6%
14 діб	14,2±0,5*	16,7±0,8	14,9%
16 діб	20,2±0,8*	24,8±0,3	18,5%
18 діб	24,3±0,6*	26,6±0,4	8,6%
20 діб	27,6±0,7*	30,5±0,9	9,5%

* - $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

Таким чином, у результаті проведених морфометричних вимірювань ми виявили достовірне зменшення маси ембріонів при дії материнської гіпертермії в порівнянні з контрольною групою.

Досліджуючи вплив високих температур на хід загального розвитку та кардіогенезу, на більш пізніх термінах розвитку ми проводили морфометрію сердець ембріонів, та порівнювали з нормою. Під час препарування ембріонів старших 14-ти діб розвитку нами видалялися серця та окремо зважувалися, що дозволило обчислити кардіофетальний індекс, тобто співвідношення маси серця до маси цілого ембріона. Результати обрахування індексу представлені у таблиці (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Зміна кардіофетального індексу ембріонів щурів після впливу гіпертермією та в контрольній групі

Термін розвитку (доба)	Гіпертермія	Контрольна група
13 доба	0,382±0,02	0,386±0,02
14 доба	0,440±0,02	0,432±0,03
15 доба	0,545±0,03	0,550±0,03
21 доба	0,579±0,04	0,582±0,04

Загалом маса цілого ембріона та маса серця у експериментальній групі були зменшені у порівнянні з контролем, але співвідношення мас залишилося майже таким як і в нормі. Результати порівнянь вказують на незначну різницю кардіофетального індексу ембріонів щурів у нормі та експерименті. Тобто на співвідношення вагових показників серця вплив гіпертермія не має.

5.2. Вплив гіпертермії на зовнішній розвиток ембріона

Порівняння цілих ембріонів після впливу гіпертермії з ембріонами контрольної групи показало, що в 28,9% після впливу високою температурою спостерігається відставання в розвитку на 2-3 стадії. Причому це відставання

більш явно виражене після 12-ї доби розвитку, тобто у віддаленій післядії. Із зовнішніх пороків розвитку на ранніх етапах виділялися такі, як порушення утворення головного вигину (в ембріонів, підданих дії високої температури він був менш виражений), а також зміна згинання тулубового й хвостового відділів (рис. 5.1). В ембріонів, що пережили гіпертермію, порушувалася не тільки "флексія" (згинання), але й повністю була відсутня "торсія", тобто скручування ембріона уздовж поздовжньої вісі. Порушення вищезазначених процесів ембріогенезу завжди є показником відхилення розвитку внутрішніх органів ембріона.

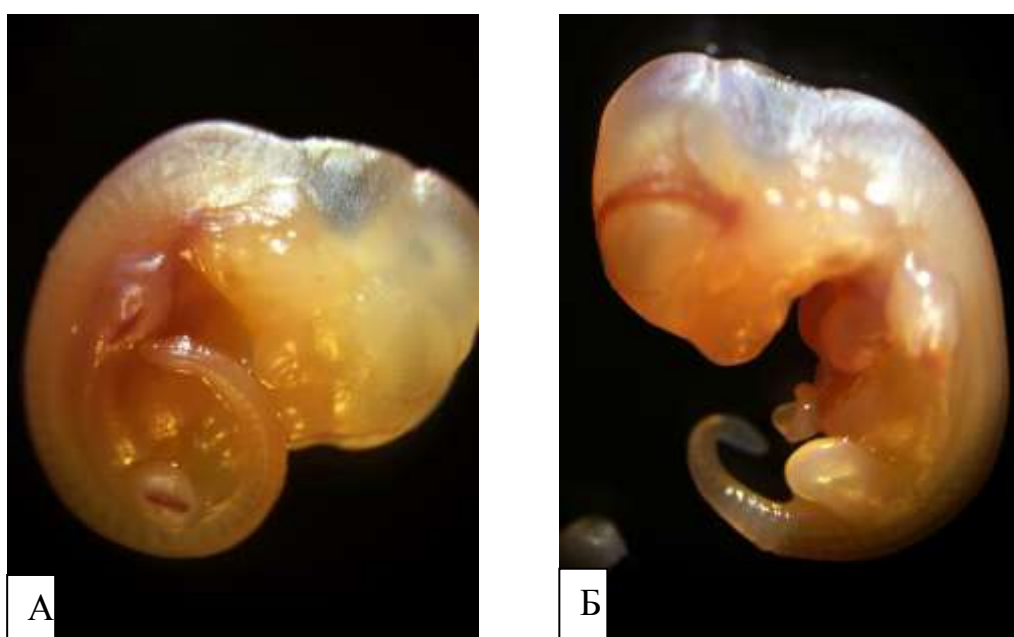


Рис. 5.1. Згинання ембріону щура 14-тої доби розвитку в нормі (А) та порушення згинання після впливу гіпертермією (Б).

Серед критеріїв відставання в розвитку існують загальноприйняті в ембріології діагностичні ознаки нормального розвитку ембріона щура на кожному етапі. Ми спостерігали відсутність чітко обумовленої пальцевої пластинки на задніх кінцівках, затримку формування слухового проходу й вібрис.

З аномалій розвитку після перенесеної гіпертермії, при дослідженні зовнішніх проявів вад розвитку, відносно часто зустрічалася ектопія серця (рис. 5.2). Ектопія серця - це патологічне розташування серця, при якому воно почасти або повністю перебуває поза кістяком грудної клітки. У даному дослідженні доля часткової або повної ектопії серця склала 4,2%. У контрольній групі ембріонів випадків ектопії серця нами не спостерігалось зовсім. У процесі досліджень також було визначено, що ембріони, які перенесли вплив високої температури та дожили до пізніх стадій, не тільки відстають у своєму розвитку, але, при розкритті матки, виглядають ослабленими, малорухливими, з яскраво вираженою гіперемією покривів.



Рисунок 5.2. Ембріон щура з ектопією серця 14-тої доби розвитку після впливу гіпертермією. Ектопія серця вказана стрілкою.

Досліджуючи вплив гіпертермії на зовнішній розвиток ембріонів щура ми вираховували співвідношення нормально розвинених ембріонів до аномально розвинених, до яких відносили відставання у стадіях розвитку та порушення згинання ембріона, ектопію серця, кили, тощо.

Аналіз частоти виникнення вад розвитку в експериментальній групі представлено у діаграмі (рис.5.3).

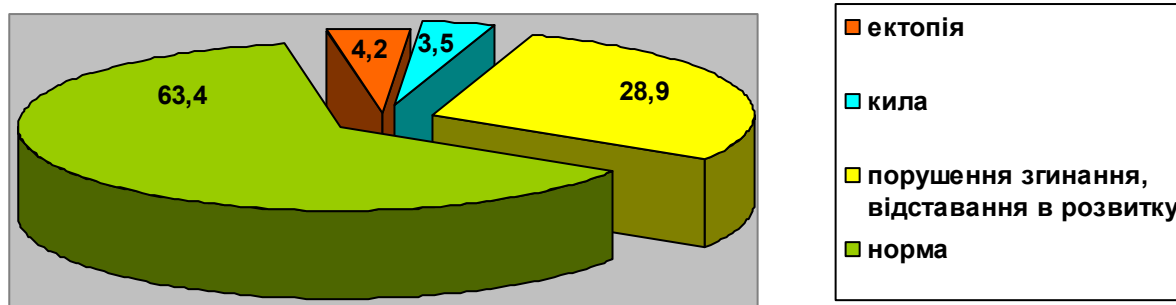


Рис. 5.3. Співвідношення відсотків зовнішніх вад розвитку та нормально розвинутих ембріонів щура в експерименті під впливом гіпертермії (%).

Вплив гіпертермії на загальний хід розвитку ембріона щура виявлявся в першу чергу в затримці ходу ембріогенезу (28,9%), а також спостерігалось виникнення загальних зовнішніх вад розвитку ембріону у вигляді ектопії серця (4,2%), кили (3,5%) та невідповідності діагностичним ознакам. Було встановлено також достовірне зменшення маси ембріонів при дії фізичного чинника – підвищеної температури.

5.3. Вплив гіпертермії на кардіогенез зародка щура

Результати проведеного дослідження показали, що протягом раннього кардіогенезу щурів в нормі можна виявити певні етапи, які пов'язані з розвитком міокардіального шару серцевої стінки, а саме: закладка прошарку міокарду у формуванні серцевої стінки; делямінація міокарду серцевої стінки; утворення міокардіальних випинань у просвіт серця, тобто утворення трабекул; об'єднання базальних частин трабекул; формування багат шарової спіральної системи міокарду. Стінка шлуночку та атріовентрикулярного каналу зберігає залишки кардіогелю між міокардом та ендотелієм. В стінці шлуночку щура як і в серці птахів також відбуваються процеси делямінації –

розшарування міокарду, внаслідок чого формується делямінаційна пластинка, перфорація якої дасть початок первинним трабекулам шлуночку. Делямінаційна пластинка як і самі первинні трабекули складаються з тонкого прошарку міокарду та залишків кардіогелю і вкриті ендотелієм.

Результатом делямінації є відокремлення від стінки шлуночку внутрішнього шару міокарду, вкритого ендотелієм – делямінаційна пластинка, яку ми спостерігали, починаючи з 10-ї доби ембріонального розвитку щура. Період утворення перших трабекул шлуночку є наслідком поглиблення делямінаційної порожнини АВК, яка розділяє міокард стінки та утворює ембріональний «двохшаровий» міокард шлуночків (рис.5.3).

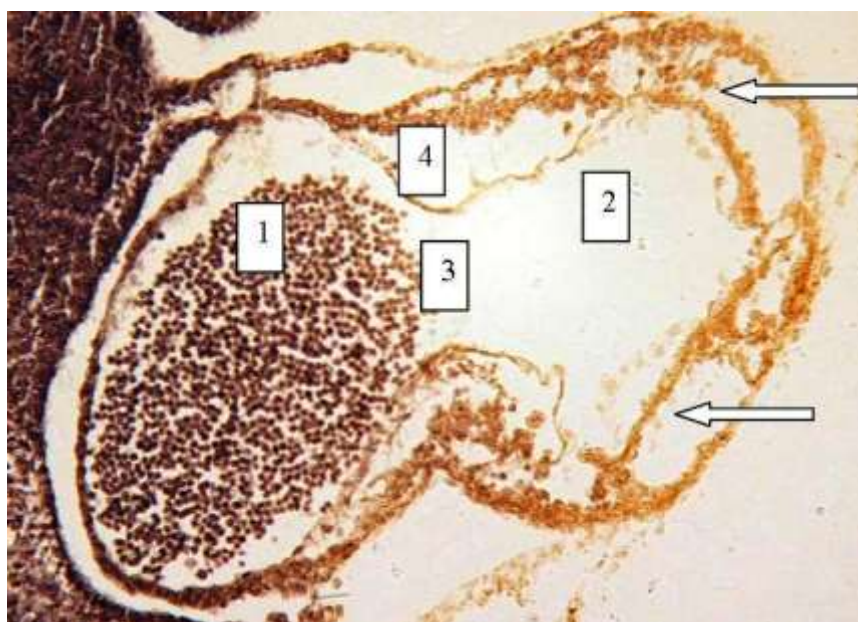


Рис. 5.3. Сагітальний гістологічний зріз серця ембріона щура 10,5 доби розвитку (контрольна група), стрілки вказують на делямінаційну щілину. Забарвлення: гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: ок.10 х об.10.

Позначення:

- 1 – порожнина передсердя;
- 2 – порожнина шлуночку;
- 3 – атріовентрикулярний канал;
- 4 – ендокардіальні подушки атріовентрикулярного каналу.

У цей же період відбувається утворення в області АВК ендокардіальних подушок (ЕП), що обернені у просвіт порожнини ембріонального серця та виповнені кардіогелем. У атріовентрикулярному каналі серця щурів виникає 4 ЕП, а саме: 2 більших – передньо-верхня, задньо-нижня, 2 менших – латеральні. Як і в попередніх дослідженнях на ембріонах курки весь обсяг ендокардіальних подушок виповнено кардіогелем. Під час делямінації подушки залишаються розташованими на внутрішній поверхні делямінаційної пластинки. Латеральні подушки досить швидко редукуються і їхня роль у формуванні передсердно-шлуночкових клапанів незначна, передньо-верхня та задньо-нижня подушки відіграють роль презумптивних клапанів та у наступному стають стулками та сухожилковими хордами клапанів.

Внутрішня пластинка міокарду, що вкрита ендотелієм з залишками кардіогелю вже наприкінці 11-ї доби розвитку розпадається на окремі тяжі – первинні трабекули. Самі трабекули на цей період виглядають як групи клітин, що складаються з 2-4 тяжів кардіоміоцитів, вкритих ендокардом. Між ендокардом та м'язовими клітинами зберігається значна кількість кардіогелю (рис. 5.4).

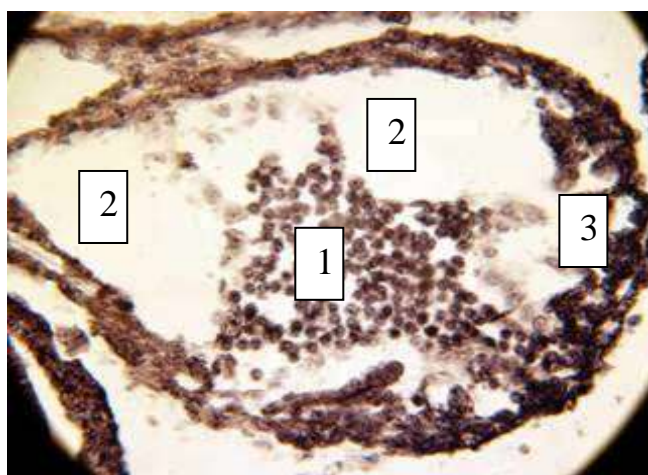


Рис. 5.4. Сагітальний гістологічний зріз шлуночка серця ембріона щура 11-ї доби розвитку (контрольна група). Забарвлення: гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: ок.8 х об.10. Позначення:

- 1 - порожнина шлуночку, формені елементи крові;
- 2 –кардіогель (не зафарбовані ділянки);

3 – стінка шлуночку та первинні трабекули.

Цей етап короткочасний, швидко минає, змінюючись етапом відокремлення окремих трабекул, тобто внутрішній прошарок міокарду швидко розподіляється на окремі тяжі – трабекули.

Розподіл на окремі трабекули відбувається за рахунок фенестрації суцільного внутрішнього прошарку кардіоміоцитів «двошарового» міокарду шлуночків. Найактивніше трабекуляція шлуночків відбувається на момент початку утворення МШП, мабуть тому, що більша частина цієї перегородки формується шляхом об'єднання підстав трабекул верхівки шлуночку.

Таким чином, в нормі у ембріонів щурів на 12-й добі розвитку вже виділяється компактний та внутрішній трабекулярний міокард. Товщина компактного шару збільшується незначно, а саме: з 1-2 шарів клітин до 3-4 шарів (рис.5.5).

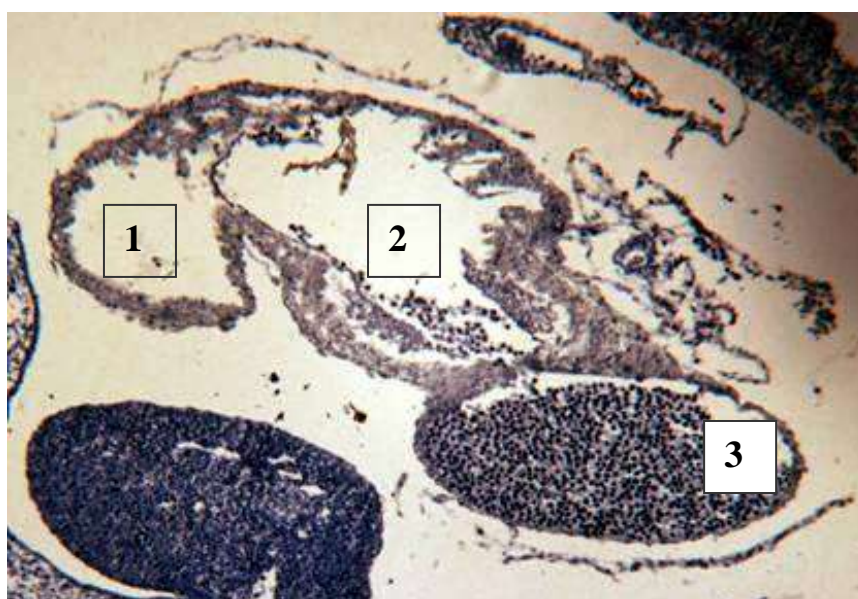


Рис. 5.5. Зріз серця ембріона щура 11,5-ї доби розвитку. Забарвлення: гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: ок.4 x об.10. Позначення:

- 1 – конотрункус;
- 2 – порожнина шлуночку;
- 3 – порожнина передсердя.

Основне збільшення маси міокарду відбувається за рахунок трабекулярного шару. В клітинах компактного шару міокарду ми спостерігали більшу кількість мітозів, що свідчить про високу проліферативну активність його в порівнянні з трабекулярним міокардом, але рівень диференціювання клітин був вищим у останнього.

Товщина компактного міокарду обмежена можливостями обмінних процесів, а саме – можливістю постачання кисню, тобто збільшення товщини компактного міокарду повинно співпадати у часі з розвитком судин, васкулогенезом. Сам трабекульований міокард розподіляється на зовнішній (базальний) шар та на внутрішній люмінальний шар. Ці частини мають суттєві відмінності: трабекули зовнішнього шару коротші та мають невеликі міжтрабекулярні простори, трабекули люмінального шару крупніші, розташовані радіально (рис. 5.6).

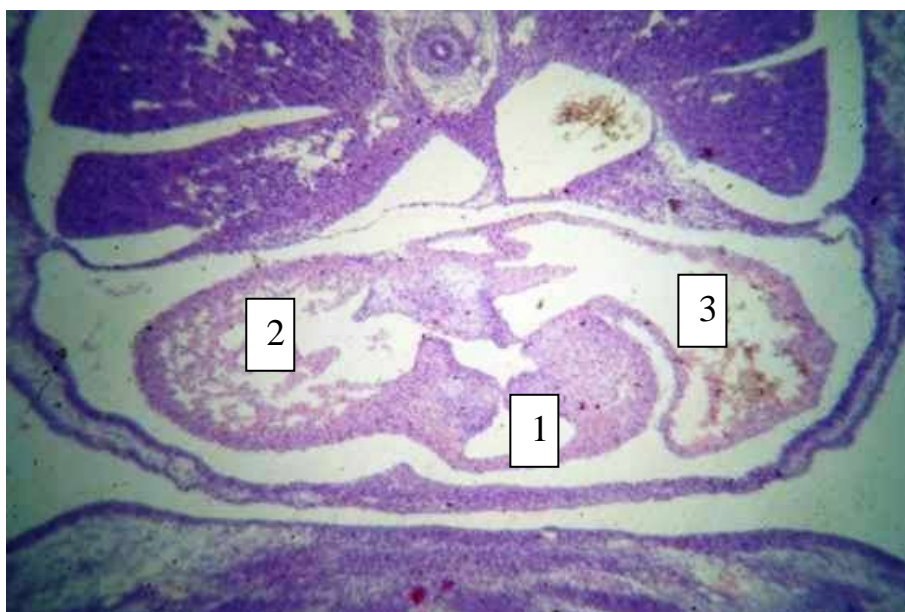


Рис. 5.6. Зріз серця ембріона щура 12,5-ї доби розвитку. Забарвлення: гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: ок.4 x об.10. Позначення:

- 1 – конотрункус;
- 2 – порожнина шлуночку та трабекули;
- 3 – порожнина передсердя.

З завершенням процесів септації, що відповідає у щурів 15,5-16-й доби пренатального розвитку змінюється орієнтація трабекул шлуночків з радіально розташованих на спіральні орієнтовані, що відображає напрямки основних функціональних навантажень серця при скороченнях.

Етап ремоделювання трабекул спостерігався нами у ембріонів щурів з 15-ї доби розвитку і полягав у тому, що трабекули люмінального шару об'єднувались або збільшувались та утворювали специфічні для даного шлуночку патерни, формуючи внутрішній рельєф вентрикулярної поверхні. Відокремлення соскоподібних м'язів відбувалось внаслідок завершення процесу делямінації, результатом якого було утворення стулки передсердно-шлуночкового клапану, первинної сухожилкової нитки та верхівки самого серцевого м'яза. Трабекули в області верхівки серця були більш виражені вже з самого початку процесу трабекуляції (рис. 5.7).

Наступне потовщення трабекул зумовлено їх компактизацією, а потовщення компактного шару відбувається внаслідок диференціювання клітин та васкулогенезу з наступним розвитком спіралізації волокон.



Рис. 5.7. Зріз шлуночку серця ембріона щура 13,5-ї доби розвитку експериментальної групи. Зabarвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: ок.4 х об.10. Позначення:

1- трабекули стінки шлуночку;

2 – порожнина шлуночку.

Досліджуючи вплив гіпертермії на хід кардіогенезу на гістологічних препаратах серця ранніх термінів розвитку, ми спостерігали невластиву для нормального кардіогенезу картину нещільного прилягання епікарду до міокарду шлуночку. Це свідчить про затримку формування серцевої стінки. В наших дослідженнях епікард шлуночків ембріонального серця щурів після впливу гіпоксією розташовувався досить пухко відносно до міокарду, чого не спостерігається в нормі. Міокардіальний шар серця являє собою складну систему, що поєднує в собі різні тканинні компоненти, між якими протягом раннього кардіогенезу відбуваються просторові перебудови. Зміни утворення прошарків міокарду спостерігались у вигляді порушень делямінації стінки шлуночку. Під впливом гіпертермії делямінаційна пластинка не підлягала повній перфорації, а залишалась часткою внутрішнього шару стінки шлуночків, утворюючи та зберігаючи до більш пізніх стадій розвитку «двохшаровий» міокард (рис.5.8).

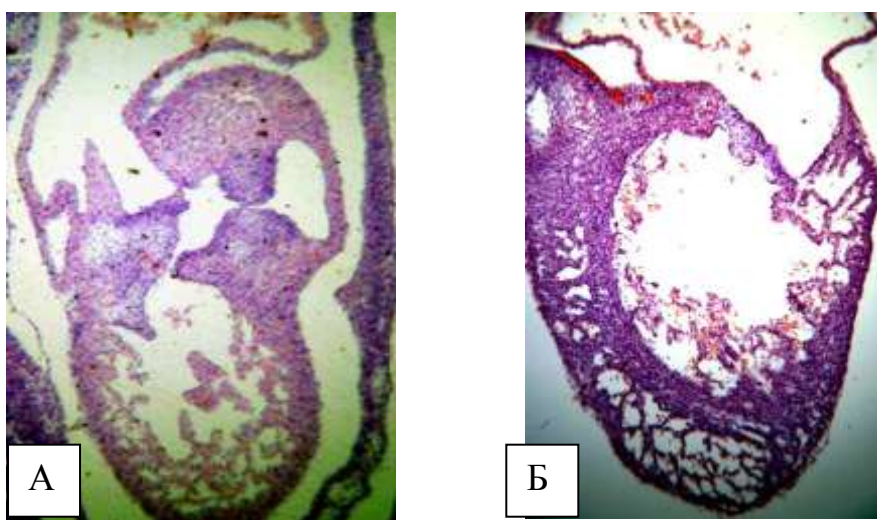


Рис. 5.8. Зріз серця ембріона щура на 14 добу розвитку. А – серце ембріона контрольної групи. Делямінаційна пластинка відсутня, окремі трабекули формують стінку шлуночку. Б – серце ембріона після впливу гіпертермією. Делямінаційна пластинка розвинута та утворює шар стінки шлуночку. Позначення: 1 – делямінаційна пластинка. Забарвлення: гематоксиліном еозином. Зб.ок.Х10, об.Х4.

Таких процесів ми не зустрічали в контрольній групі, де механізм делямінації швидко минав і в результаті формувались окремі трабекули. Порушення формування делямінаційної пластинки призводить в свою чергу до порушення процесу утворення трабекулярного шару міокарду та закладки і утворення клапанів передсердно-шлуночкових отворів. На 14-15 добу розвитку ми спостерігали аномально розташовані ЕП атріовентрикулярного каналу, що призводило в подальшому до порушень формування стулок передсердно-шлуночкових клапанів.

Формування трабекул в передсердях відбувається пізніше в порівнянні з аналогічними процесами шлуночків, а саме з 12,5 доби пренатального онтогенезу. Незначна кількість подовжених паралельних за ходом трабекул передсердь завжди сконцентрована в верхній стінці передсердя і зовсім відсутній процес трабекуляції у присінку атріовентрикулярного з'єднання. Ймовірно, трабекули передсердь на ранніх етапах розвитку відіграють контрактильну функцію.

Ми спостерігали в нормі на 10,5-ю добу розвитку ембріона стінку передсердя товщиною у 2-3 прошарки кардіоміоцитів, що вкриті ззовні епікардом та вистелені з внутрішньої люмінальної поверхні тонким прошарком ендокарду, що формується (рис. 5.9). Товщина стінки передсердя ембріона щура на цей період розвитку складала $11,4 \pm 0,9$ мкм. МПП не сформована, передсердя являло собою єдину тонкостінну камеру, що має розширену неправильну форму. При дослідженнях процесів септації у ембріона щура ми звертали увагу на час злиття закладок первинної та вторинної МПП та формування остаточної МПП та порушення формоутворюючих процесів раннього серця після впливу гіпертермії. На 12-й добі ембріогенезу щура в контрольній групі ми спостерігали утворення первинної МПП, яка формується з двох закладок, а саме: міокардіальна верхня

зкладка є виростом стінки первинного передсердя, мезенхімна – нижня зкладка є виростом ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу.

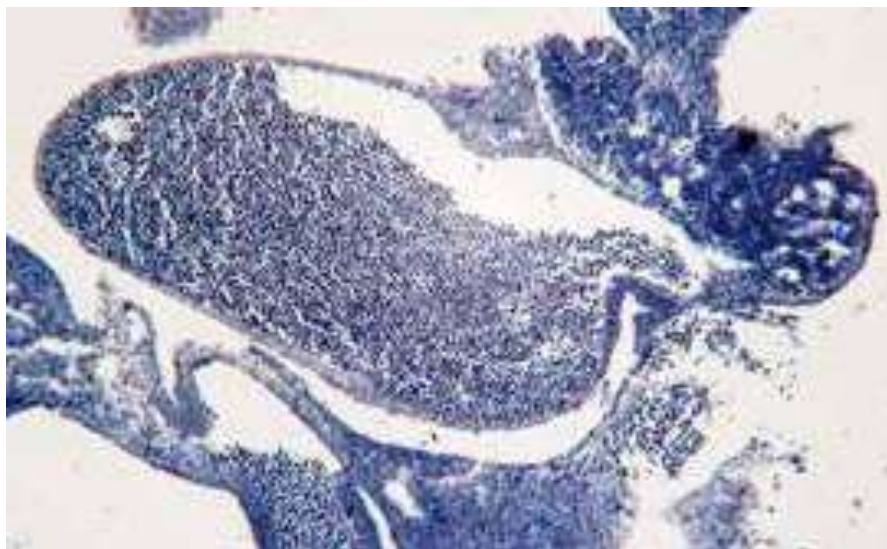


Рис. 5. 9. Зріз серця ембріона щура 10,5-ї доби розвитку контрольної групи. Передсердя. Забарвлення: гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: ок.4 х об.10.

МПП неповна і в своїй середній частині зберігає овальний отвір, який сполучає праве та ліве передсердя та складається більшою частиною з кардіоміоцитів, які вкриті ендокардом. Форма перегородки подібна до форми піскового годинника, тобто витончена в середній частині та розширена на периферійних ділянках. В цей же період починає закладатися вторинна МПП. При подальшому розвитку стінка передсердя потовщується за рахунок розростання кардіоміоцитів, утворюються малочисельні трабекули передсердь, внутрішня поверхня стінки стає більш складчастою (рис. 5.10).

Товщина стінки передсердя ембріона щура на 13-14 добі ембріогенезу складала $13,6 \pm 1,1$ мкм. Трабекули передсердь мають дорзо-вентральний напрямок та виступають у провіт порожнини передсердя. Самі передсердя на цей період зберігають зв'язок з позасерцевою мезенхімою. Крупні судини

серця (аорта та легеневий стовбур) вже відокремлені від стінки серця та розподілені.

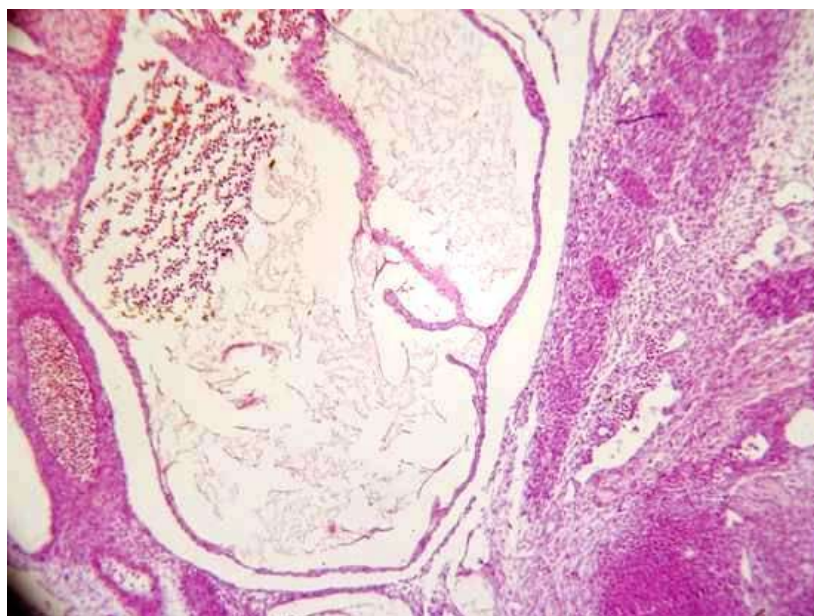


Рис. 5.10. Зріз серця ембріона щура контрольної групи 12-ї доби розвитку. Передсердя та первинна міжпередсердна перетинка. Зачаток вторинної міжпередсердної перетинки. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: ок.10 x об.10. Позначення:

- 1 – порожнина передсердя;
- 2 – овальний міжпередсердний отвір;
- 3 – вторинна міжпередсердна перетинка.

Вплив гіпертермії на розвиток стінки передсердя виявлявся у витонченні стінки та в посиленій трабекуляції (рис. 5.11). Порожнина передсердя була значно збільшена, стінка сформована, але витончена, трабекули подовжені та збільшені.

Формування МШП як і МПП відбувається також з двох джерел. А саме: м'язовий гребінь, що зростає з верхівки шлуночку назустріч

атріовентрикулярному каналу та мезенхімна частина, що прилягає до ендокардіальних подушок. М'язова частина МШП складається з окремих трабекул, пухко розташованих та вкритих ендокардом. Вона зберігає велику кількість отворів між трабекулами, через які сполучаються права та ліва половини загального ще на той час шлуночку (рис. 5.12).

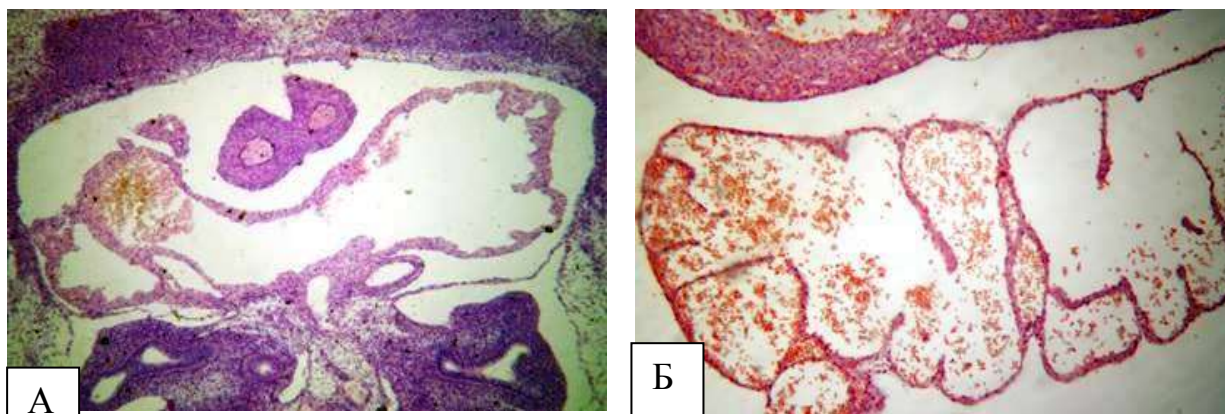


Рис. 5.11. Зріз серця ембріона щура на 15 добу розвитку. А – серце ембріона контрольної групи. Б – серце ембріона після впливу гіпертермією. Забарвлення: гематоксиліном еозином. Збільшення: ок.Х10, об.Х4.

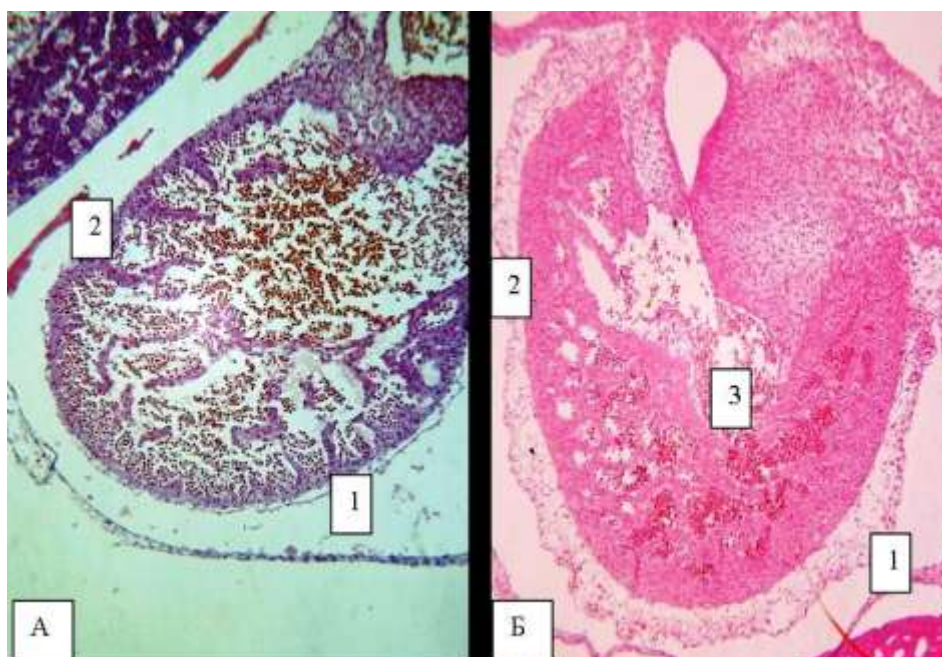


Рис. 5.12. Шлуночок серця ембріона щура контрольної групи 12-ї доби розвитку (А) та міжшлуночкова перетинка, що формується (Б) 12,5-ї доби розвитку. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: ок.10 х об.10. Позначення:

1 – епікард;

2 – стінка шлуночку;

3 - первинна міжшлуночкова перегородка.

Згодом базальні частини трабекул консолідуються, верхівки ущільнюються і отвори м'язової частини МШП закриваються.

Формування ендокардіальних подушок загального передсердно-шлуночкового отвору та їх наступне злиття призводить до розподілу отвору на правий та лівий. З 12-ї доби ембріогенезу обсяг ендокардіальних подушок передсердно-шлуночкового каналу починає заповнюватися мезенхімними клітинами, які утворюються внаслідок ЕМТ ендотелію самих подушок. Вплив гіпертермії позначився на ранніх етапах розвитку на формування й вміст ендокардіальних подушок. Починаючи з 11-ї доби розвитку в товщі ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу та в трабекулах шлуночку ми спостерігали численні крововиливи (рис. 5.13), тобто формені елементи крові в товщі ендокардіальних утворень шлуночків без помітного порушення цілісності ендокарду.

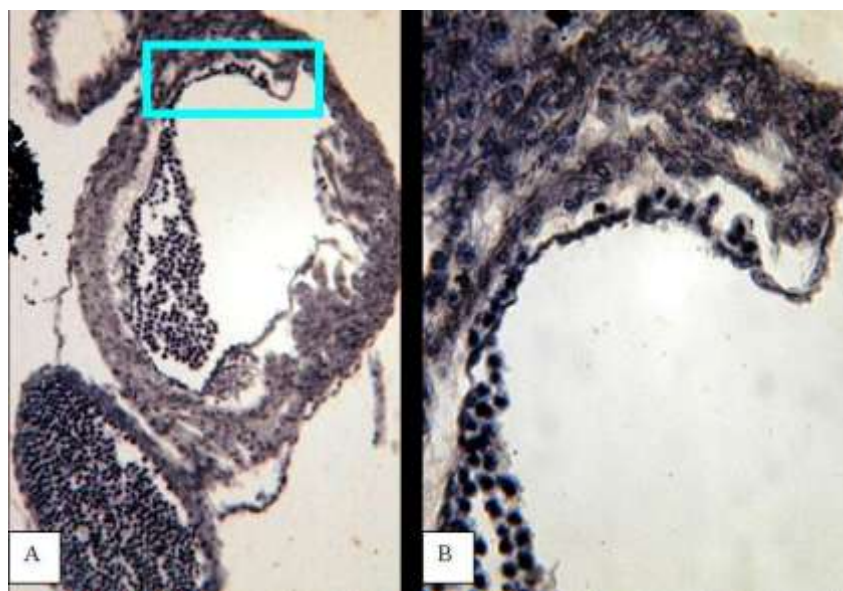


Рис. 5.13. Крововиливи в речовину ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу ембріона щура 11-ї доби розвитку після впливу гіпертермією. А - просвіт атріовентрикулярного каналу, ендокардіальні подушки з форменими елементами крові усередині. Забарвлення: залізний

гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: ок.10 х об.4.; В - збільшений фрагмент попереднього фото. Збільшення: ок.10 х об.10

В подальшому майже весь обсяг ендокардіальних подушок поступово заповнюється мезенхімними клітинами, що утворились внаслідок ЕМТ. Ці процеси йдуть паралельно процесам делямінації стінки первинного шлуночку, внаслідок чого формуються м'язові тяжі, вкриті ендокардом, що з'єднують нижню частину ендокардіальних подушок з трабекулами шлуночків (рис.5.14). Заселення мезенхімними клітинами обсягу ЕП теж є вагомим показником нормального чи аномального ходу кардіогенезу, бо порушення ЕМТ є основою для виникнення численних вад клапанного апарату серця. Щільність упаковки мезенхімних клітин в обсязі ЕП є гарантом нормального формоутворюючого процесу розвитку стулки майбутнього клапану.

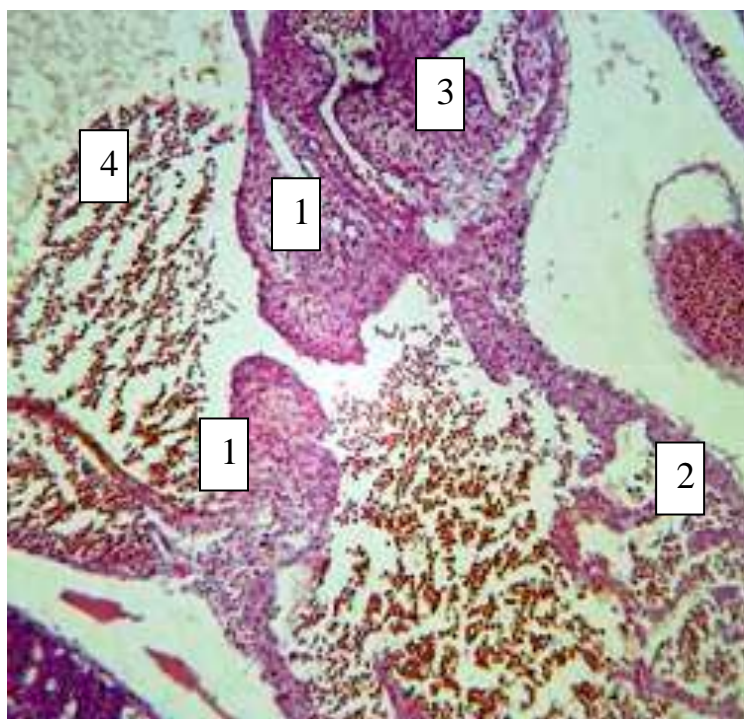


Рис. 5.14. Атріовентрикулярний канал серця ембріона щура 11,5-ї доби розвитку (контрольна група тварин). Збарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: ок.10 х об.10. Позначення:

- 1 – ендокардіальні подушки;
- 2 – стінка та трабекули шлуночку;

3 – конотрункус;

4 - передсердя.

Весь об'єм ЕП поділяється на окремі зони, щільність розташування мезенхіми в яких буде досить різною, особливо на ранніх етапах кардіогенезу. Найбільша щільність мезенхімних клітин спостерігається в нормі під ендотелієм, клітини мезенхіми в цій зоні не мають довгих відростків – субендокардіальна зона. Проміжна зона містить в собі мезенхімні клітини зірчастої класичної форми, які досить пухко розташовані та залишки кардіогелю. Зона прилягання до міокарду АВК зберігає найдовше кардіогель та містить мезенхімні клітини, що мають довгі відростки, які орієнтовані вздовж АВК (рис. 5.15).

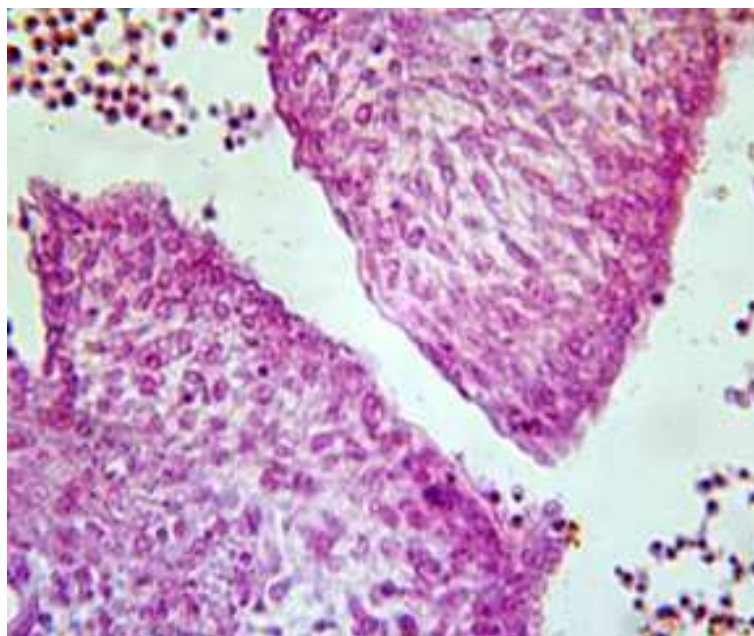


Рис. 5.15. Мезенхімні клітини ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу серця ембріона щура 11,5 доби розвитку в нормі. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: ок.10 x об.40.

Процес делямінації – початок утворення передсердно-шлуночкових клапанів та папілярно-трабекулярного апарату, який йде паралельним шляхом з утворенням сухожилкових струн та соскоподібних м'язів шлуночків. Саме з

залишків ЕП будуть в подальшому утворюватися стулки атріовентрикулярних клапанів серця. Тому порушення саме цього процесу може в подальшому призвести до порушень у формуванні стінок камер серця та передсердно-шлуночкових клапанів. Так як процес утворення клапанного апарату є єдиним як для формування стулок передсердно-шлуночкових клапанів так і для апарату, що натягає, тобто для сухожилкових струн та соскоподібних м'язів, то і аномалії розвитку, що пов'язані з процесом делямінації, представляють собою досить значний спектр вад серця. Одним з показників формоутворюючих процесів серця є процес компактизації міокарду шлуночків. Загальновідомо, що в нормі на ранніх етапах розвитку міокард шлуночків складається з компактного та трабекулярного шарів. Динаміка зростання цих прошарків серцевого м'яза досить цікава та докладно вивчена. Існують піки розвитку того чи іншого виду міокарду у кожного виду тварин. Трабекулярний прошарок в середній частині шлуночку кардіогенезу щура (15-17 доба) розвинутий настільки активно, що займає майже всю порожнину шлуночку, а потім темп його розвитку знижується майже до початкових величин. Тому ми для порівняння представляємо результати зміни товщини компактного міокарду, розвиток якого відбувається досить плавно, поступово і є більш показовим для співставлень (табл. 5.3).

Як показали результати досліджень, товщина стінки шлуночку після впливу гіпертермією зменшується і це зменшення не є однозначним для правого та лівого шлуночків та відрізняється в різні періоди ембріогенезу. Більше ушкоджується стінка правого шлуночку і моментом найбільшого витончення стінки компактного прошарку міокарду є період з 16 по 18-ту добу розвитку. Після чого компенсаторні механізми ембріона ніби «наздоганяють» відставання у розвитку цієї камери серця. Лівий шлуночок менше підлягає впливу високих температур, можливо це зумовлено його більшим фізичним та гемодинамічним навантаженням, що спрацьовує як захисний механізм.

В експериментальних моделях ми спостерігали у ембріонів невластиве для нормального кардіогенезу порушення процесу формування крупних судин

серця таких як аорта та легеневий стовбур. Дослідження в контрольній групі виявили, що утворення стінки та топографії великих судин серця відбувається завдяки динаміки співвідношення проліферації та апоптозу у різні періоди кардіогенезу.

Таблиця 5.3

Динаміка зміни товщини компактного міокарду стінки серця в нормі та під впливом гіпертермії у ембріонів щура на етапах ембріонального розвитку (мкм), $M \pm m$

Доба розвитку	Стінка правого шлуночку		Стінка лівого шлуночку	
	контроль	експеримент	контроль	експеримент
14	46,3±2,1	42,3±3,1	55,4±3,5	49,6±6,3
15	85,4±8,2	74,5±5,2*	112,9±8,2	94,2±2,1*
16	107,3±9,4	83,6±11,4**	143,7±11,1	128,4±8,4*
18	149,5±11,2	110,7±9,3**	194,4±7,6	173,5±12,2*
19	184,4±16,1	163,4±14,7*	207,1±13,3	186,4±9,1*
21	201,6±8,3	179,1±12,3*	215,3±10,7	198,2±14,3*

* - $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

** - $p < 0,001$ при порівнянні з контрольною групою

Перші етапи розподілу загального конотрункусу на аорту та легеневий стовбур супроводжуються його різким укороченням. В нормі в контрольній групі в стінці КСВ виникають локальні ділянки, що виявляються за рахунок накопичення маркера апоптозу. В таких апоптотичних зонах відбувається масова загибель цілого пулу клітин, за рахунок чого і змінюється довжина конотрункусу, стінка якого в цей період активно диференціюється. В наших дослідженнях з гіпертермією виявлено, що перед закінченням септації КСВ довжина зменшувалась у нормальних зародків, в той час як в експериментальній групі збільшувались і довжини і ширина, що також

свідчить про порушення апоптозу під впливом гіпертермії. Наслідком таких порушень було достовірне збільшення діаметру магістральних судин серця. Досліджуючи вади розвитку великих судин серця в експериментальній групі дослідних тварин визначали аномалії розвитку стулок півмісяцевих заслінок крупних судин, що безумовно, призводило до порушення гемодинаміки серця.

Досліджуючи процеси запрограмованої загибелі клітин (апоптоз) ми виявили, що кількість апоптотичних клітин на етапах формування стулок великих судин серця за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж в експерименті з гіпертермією. Істотне зменшення інтенсивності апоптотичних процесів в області конотрункусу раннього ембріонального серця безумовно має значення у формоутворенні вад аорти та легеневого стовбура. Ми спостерігали після впливу гіпертермією у ембріонів щура збільшення обсягу мезенхіми півмісяцевих заслінок аорти. Наші дані дозволяють припустити, що вплив тератогенів на ініціацію апоптотичної активності не є однозначним. Поряд з зменшенням кількості апоптозів в експериментальній групі, ми спостерігали в наших дослідженнях неоднозначне розміщення проліферативних центрів. Загалом в експериментальній групі мітотичний індекс міокарду був підвищений (++), але локалізація клітин, що поділяються суттєво відрізнялась навіть в рамках одного експерименту та стадії розвитку. Як результат порушення співвідношення апоптоз-проліферація, виникають аномальні за формою стулки півмісяцевих заслінок великих судин серця. Нерідко вони мають відрости різної товщини та довжини, які звернені у просвіт судини. Таких змін форми заслінок аорти та легеневого стовбуру ми не зустрічали в контрольній групі тварин.

Дослідження ранніх етапів формування стулок півмісяцевих заслінок аорти та легеневого стовбуру в нормі та після впливу гіпертермії показало, що поряд з порушенням формоутворюючих процесів аорти та легеневого стовбуру в період ембріогенезу (збільшення діаметру) відбувається також зсув

співвідношення апоптоз-проліферація, що призводить до формування аномальних за формою стулок заслінок судин.

Дослідження процесів утворення клапанів аорти та легеневого стовбуру серця та диференціювання стінки судин ми спостерігали в нормі на 7-8-й добі розвитку ембріону щура. В цей період ембріогенезу від стінки шлуночку починає відокремлюватися артеріальний стовбур (конотрункус). У результаті вигину серцевої трубки і ротації шлуночкових сегментів конотрункус займає переднє положення щодо випускного відділу і передсердя. Відокремлення відбувається завдяки зовнішній трансформації самого серця та при прямій участі ендокардіальних подушок. Випускний тракт серця - майбутні шлуночки - плавно переходить в конотрункус, стінки якого є продовженням стінок первинних шлуночків. Але будова стінки конотрункусу та шлуночків починає відрізнятися вже на цьому етапі, бо процеси трабекуляції міокарду, які характерні для стінки шлуночку, зовсім відсутні в стінках конотрункусу. Ендокардіальні гребені присутні в конотрункусі, мають таку ж саму форму та зміст, теж саме джерело походження як і ЕП передсердно-шлуночкового отвору і приймають активну участь у відокремленні конотрункусу та в розподілі його на аорту та легеневий стовбур.

Досліджуючи вплив гіпертермії ми спостерігали невластиве для нормального кардіогенезу порушення процесу формування крупних судин серця таких як аорта та легеневий стовбур. У серцях ранніх ембріонів (11-12 доба розвитку), які пережили вплив високих температур спостерігали локальне пригнічення проліферації та порушення процесів апоптозу. Загальновідомо, що утворення стінки та топографії крупних судин серця відбувається завдяки динаміки співвідношення проліферації та апоптозу у різні періоди кардіогенезу. Перші етапи розподілу загального конотрункусу на аорту та легеневий стовбур супроводжуються його різким укороченням. В нормі в стінці конотрункусу виникають локальні ділянки, що виявляються за рахунок накопичення маркеру апоптозу. В таких апоптотичних зонах відбувається масова загибель цілого пулу клітин, за рахунок чого і змінюється

довжина конотрункусу, який в цей період активно диференціюється. В наших дослідженнях виявлено, що перед закінченням септації його довжина зменшувалась у нормальних зародків, в той час як в експериментальній групі збільшувались і довжини і ширина, що також свідчить про порушення апоптозу під впливом гіпертермії. Наслідком таких порушень було збільшення діаметру аорти та легеневого стовбуру, що є похідними КСВ (рис.5.16). Серед досить усього діапазону вад розвитку найчастіше визначали збільшення діаметру аорти та легеневого стовбуру та на другому місці - вад розвитку стулок півмісяцевих заслінок крупних судин.

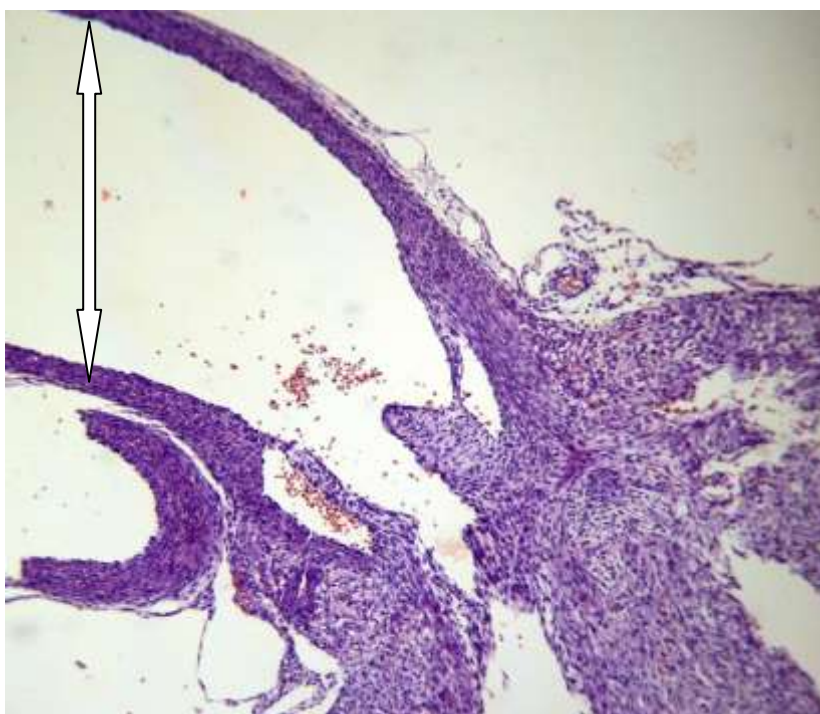


Рис. 5.16. Розширення діаметру легеневого стовбуру серця ембріона щура 11-ї доби розвитку після впливу гіпертермією (вказано стрілкою). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: Ок.8 x об.10.

Досліджуючи формоутворюючі процеси в стулках півмісяцевих клапанів на 10-12 добу ембріогенезу, ми спостерігали як наслідок впливу високої температури формування аномальних за формою стулок, що безумовно, призводило до порушення гемодинаміки серця.

Формування клапанного апарату аорти та легеневого стовбуру в нормі помітно відстає у часі від утворення передсердно-шлуночкових клапанів. В отворах великих судин серця утворюються мезенхімні накопичення, які не мають колагенових та еластичних волокон на ранніх етапах утворення і виглядають як розростання мезенхіми в порожнину судин (рис. 5.17).

Самі стулки клапана містять у собі мезенхімні клітини, які щільно прилягають до ендокарду. На подовжніх зрізах ці стулки мають потовщення у основи та більш витончені на тій частині, що вільно звернена до порожнини судини і представляють собою мезенхімні вирости у порожнину судин, основа яких кріпиться до стінки судини, а вільна поверхня звернена у простір судини. Ендотелій судини не перериваючись переходить на ці стулки клапану і щільність мезенхімних клітин більша під ним.

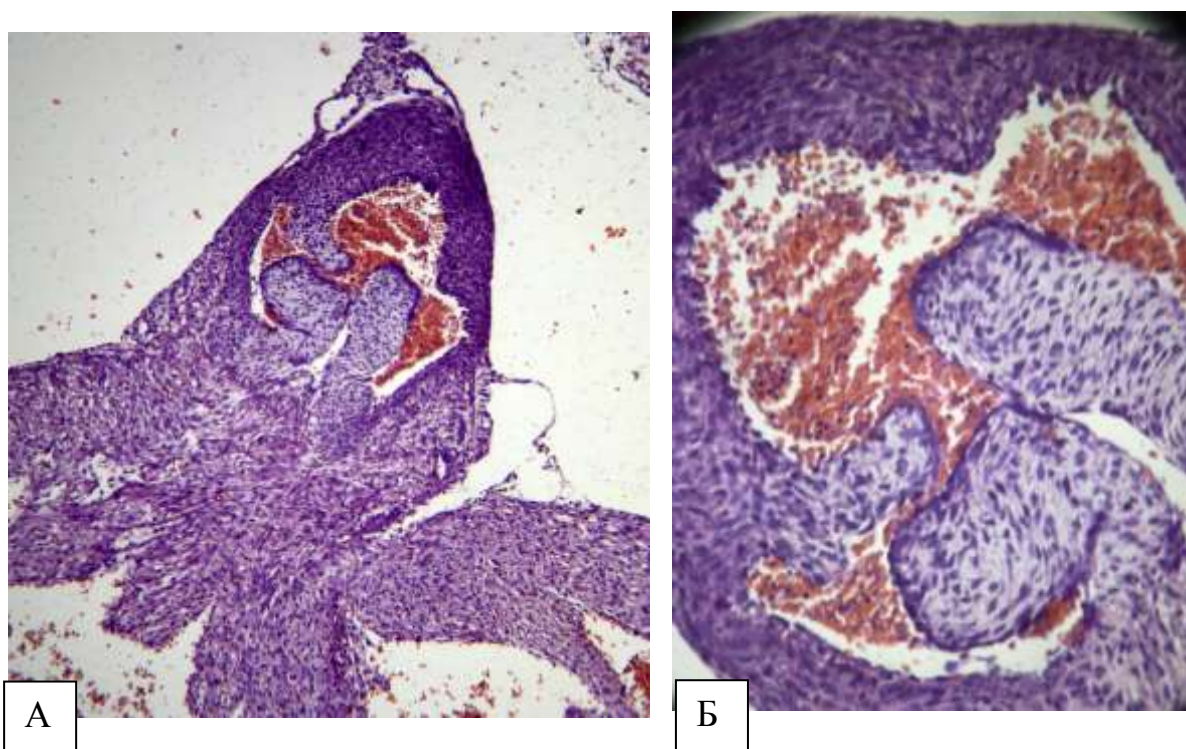


Рис 5.17. Горизонтальний зріз аорти на рівні півмісяцевих стулок клапану аорти серця ембріона щура 11-ї доби розвитку в нормі (А); Б – збільшений фрагмент попереднього фото. Мезенхіма стулок півмісяцевих клапанів аорти. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб. – А: Зб. об.10 х ок.4.; Б

- Зб. об.10 х ок.8. .

На даному етапі розвитку нами не виявлено в стулках ні колагенових ні фіброзних пучків як в нормі так і після впливу тератогенів. Ми не виявили також і м'язовий прошарок у стулках, що формуються. В ділянці підстави презумптивних клапанів знаходяться перші окремі угруповання кардіоміоцитів, які мігрують від стінки шлуночку.

Накопичення маркеру α -sma при дослідженні розвитку судин та стулок півмісяцевих клапанів показало, що найбільший рівень розвитку гладенької мускулатури – тобто процес диференціювання судини відбувається у стінках самих крупних судин серця (ступінь накопичення +++), але на даному етапі розвитку спостерігається також прошарки цих м'язових елементів в зоні підстави стулки (++) та в її поверхні, що звернена у просвіт судини (+) (рис.5.18).

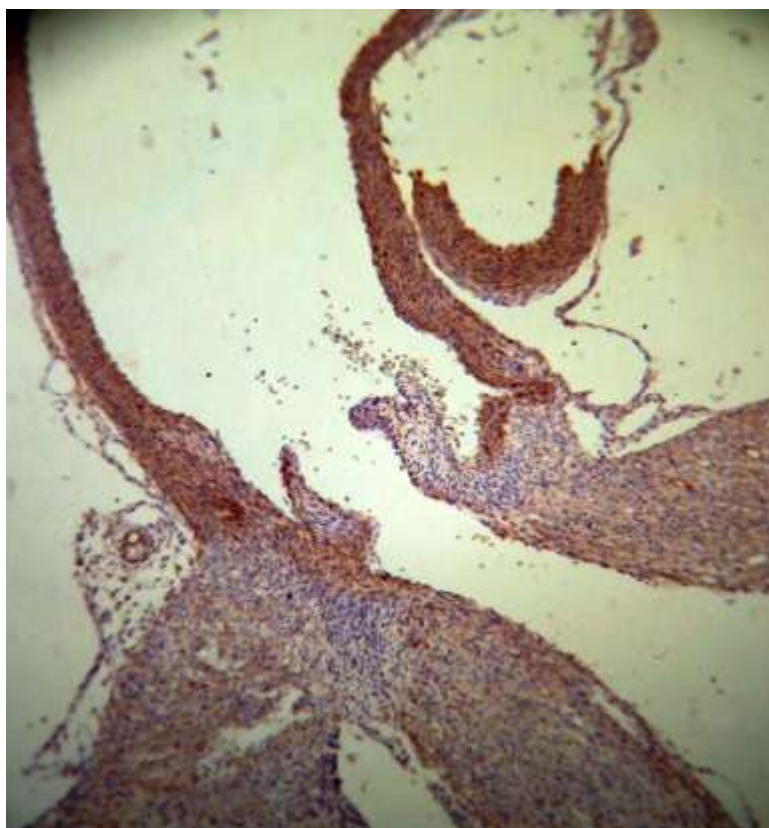


Рис 5.18. Повздовжній зріз аорти на рівні півмісяцевих стулок клапану легеневого стовбуру серця ембріона щура 11-ї доби розвитку після впливу гіпертермією. Накопичення маркера α -sma (коричневий колір). Загальне забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об.10 x ок.4.

Таким чином, ми спостерігали на різних етапах кардіогенезу вплив гіпертермії на формування клапанного апарату великих судин як на гістотопографічному рівні так і на гістологічному. Дослідження ранніх етапів формування стулок півмісяцевих заслінок аорти та легеневого стовбуру в нормі та після впливу гіпертермії показало, що поряд з порушенням формоутворюючих процесів аорти та легеневого стовбуру в період ембріогенезу (збільшення діаметру) відбувається також зсув співвідношення апоптоз-проліферація, що призводить до формування аномальних за формою стулок заслінок судин. Тобто вплив гіпертермії відбивався на структурах ембріонального серця, що містять кардіогель.

Підсумовуючи всі дані, що отримані нами по вадам серця ембріона щура після впливу гіпертермією, ми дійшли висновку, що процес септації та формування стінок серця залежить від температури. Проте необхідно враховувати, що в даному дослідженні спостерігались комбіновані групи вад розвитку серця, наприклад збільшення обсягу функціонуючих судин часто співпадало з порушенням формування перегородок серця або стулок клапанів. Найзначнішу частину вад як і в попередньому дослідженні складала дефекти МШП серед яких визначалися витончення (31,5%) та наявність міжшлуночкового отвору – 35,4% (рис. 5.19).

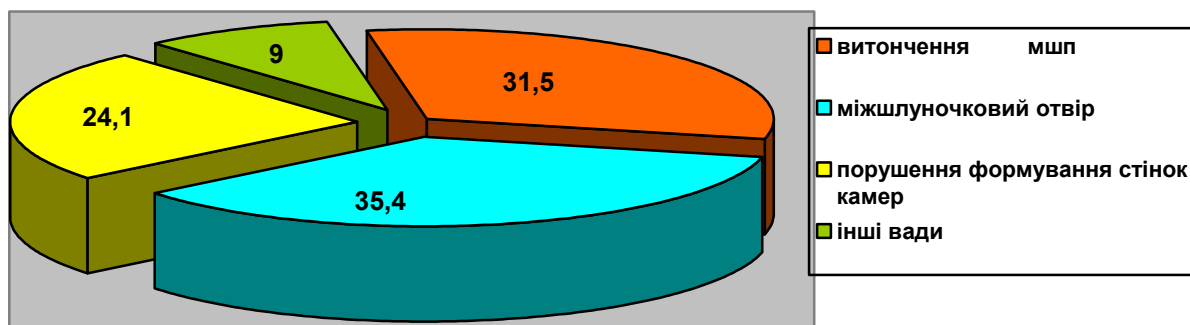


Рис. 5.19. Розподіл вад розвитку серця після впливу гіпертермією на ембріон щура.

Висновки за розділом.

Одним з важливих висновків дослідження впливу високих температур на кардіогенез щура ми вважаємо визначення періоду, протягом якого вплив на розвиток серця є максимальним. Цей період ми позначаємо як термінаційний період для гіпертермії ембріона щура і він відповідає 8-9 добі ембріогенезу.

Після впливу гіпертермією вже з початку 12-ї доби спостерігається відставання у масі ембріона, а з 14-ї доби розвитку відставання складає майже 12% ваги контрольної групи та сягає 14% наприкінці ембріогенезу. Таким чином, у результаті проведених морфометричних вимірювань ми виявили достовірне зменшення маси ембріонів при дії материнської гіпертермії в порівнянні з контрольною групою.

Вплив гіпертермії на загальний хід розвитку ембріона щура виявлявся в першу чергу в затримці ходу ембріогенезу (28,9%), а також спостерігалось виникнення зовнішніх вад розвитку ембріону у вигляді ектопії серця (4,2%), кили (3,5%) та невідповідності діагностичним ознакам.

Порушення формування делямінаційної пластинки призводить в свою чергу до порушення процесу утворення трабекулярного шару міокарду шлуночків та закладки і утворення клапанів передсердно-шлуночкових

отворів. Починаючи з 11-ї доби розвитку в товщі ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу та в трабекулах шлуночку ми спостерігали численні крововиливи, що свідчить про порушення ЕМТ.

Вплив гіпертермії на розвиток стінки передсердя виявлявся у витонченні стінки та в посиленій трабекуляції. Порожнина передсердя була значно збільшена, стінка сформована, але витончена, трабекули подовжені та збільшені.

Вплив гіпертермії на формування великих судин як на гістотопографічному рівні так і на гістологічному показав, що поряд з порушенням формоутворюючих процесів аорти та легеневого стовбуру (збільшення діаметру та довжини судин), відбувається також зсув співвідношення апоптоз-проліферація, що призводить до формування аномальних за формою стулок заслінок судин. Порушення формування півмісяцевих заслінок аорти та легеневого стовбуру виникало внаслідок впливу високої температури на мезенхімні клітини ендокардіальних гребенів конотрункусу, що викликало порушення міжклітинних контактів та ЕМТ. Таким чином, ми виявили, що всі структури раннього ембріонального серця, які на момент впливу гіпертермією утримують кардіогель, підлягають змінам у наступному розвитку.

Результати дослідження за розділом представлені у публікаціях: 35, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 46, 47, 117, 120, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 131, 132, 133.

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ НА МОРФОГЕНЕЗ ЗАРОДКА ЩУРА

6.1. Вплив гіпоксії на кількісні показники розвитку

Одним з показників впливу гіпоксії на загальний розвиток ембріона є вагові показники та відповідність стадіям розвитку ембріону за діагностичними критеріями. Волога вага ембріонів щура як і в попередніх дослідженнях фіксувалася з 12-ї доби розвитку, коли ембріон добре відокремлюється від ембріональних оболонок. Як видно з результатів дослідження, вагові показники цілого ембріона щура при порівнянні з нормою відображають вплив гіпоксії на загальний розвиток ембріона (табл. 6.1). Результатом проведених морфометричних вимірювань визначено достовірне зменшення маси ембріонів при дії гіпоксії в порівнянні з контрольною групою.

Таблиця 6.1

Показники зміни маси ембріонів щурів після впливу гіпоксією та в контрольній групі $M \pm m$ (г)

Строк розвитку ембріону	Вага ембріонів (г)	
	експеримент	контроль
12 діб	9,8±0,7	10,3±0,6
14 діб	13,9±0,9*	16,1±0,9
16 діб	19,4±0,8**	24,2±0,9
18 діб	23,7±0,7*	26,6±0,7
20 діб	28,1±0,7*	30,5±0,7

* - $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

** - $p < 0,001$ при порівнянні з контрольною групою

Досліджуючи вплив гіпоксії на хід загального розвитку та кардіогенезу, на більш пізніх термінах розвитку ми проводили морфометрію сердець ембріонів, та порівнювали з нормою. Під час препарування ембріонів старших 14-ти діб розвитку нами видалялися серця та окремо важилися, що дозволило обчислити кардіофетальний індекс, тобто співвідношення маси серця до маси цілого ембріона. Результати обрахування індексу представлені у таблиці (табл.6.2). Як видно з даних, представлених в таблиці, маса серця достовірно збільшувалася в порівнянні з нормою, тобто гіпоксія провокувала гіпертрофію серця.

Таблиця 6.2

Динаміка зміни кардіофетального індексу ембріонів щурів після впливу гіпоксією в порівнянні з контрольною групою $M \pm m$

Термін розвитку (доба)	Експериментальна група	Контрольна група
13 доба	0,432±0,02*	0,386±0,02
14 доба	0,543±0,04**	0,432±0,03
15 доба	0,583±0,05*	0,550±0,03
21 доба	0,590±0,05*	0,582±0,04

* - $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою

** - $p < 0,001$ при порівнянні з контрольною групою

Але процес збільшення маси серця протягом ембріогенезу був неоднозначним. У ембріонів, що пережили гіпоксію достовірне збільшення маси серця спостерігалось лише до 15 доби ембріогенезу, а наприкінці розвитку показники маси майже не відрізнялись від норми. Таким чином на співвідношення вагових показників серця та цілого ембріона гіпоксія впливає, демонструючи гіпертрофію серця.

6.2. Вплив гіпоксії на зовнішній розвиток ембріона

При дослідженні впливу гіпоксії на розвиток ембріону щура ми зустрічалися з тими ж ознаками порушень як і при впливі гіпертермією. Тобто наявним було відставання від норми на 2-3 стадії розвитку, спостерігалось порушення торсії та флексії ембріону, то що. Одною з відмінних ознак впливу гіпоксії на ранніх етапах розвитку виявилась зміна форми голови, що свідчило про порушення розвитку мозкових пухирів та затримка диференціювання кінцівок (рис. 6.1).



Рис.6.1.Ембріон щура 15 діб розвитку в нормі (А) та після впливу гіпоксією (Б). Порушення згинання та затримка диференціювання кінцівок у ембріонів щура після впливу гіпоксією.

Спостерігалось також затримка такої діагностичної ознаки як формування повік та закладка вібрис, хоча інші ознаки такі як закладка зовнішнього слухового проходу відбувалась без затримки (рис.6.2).

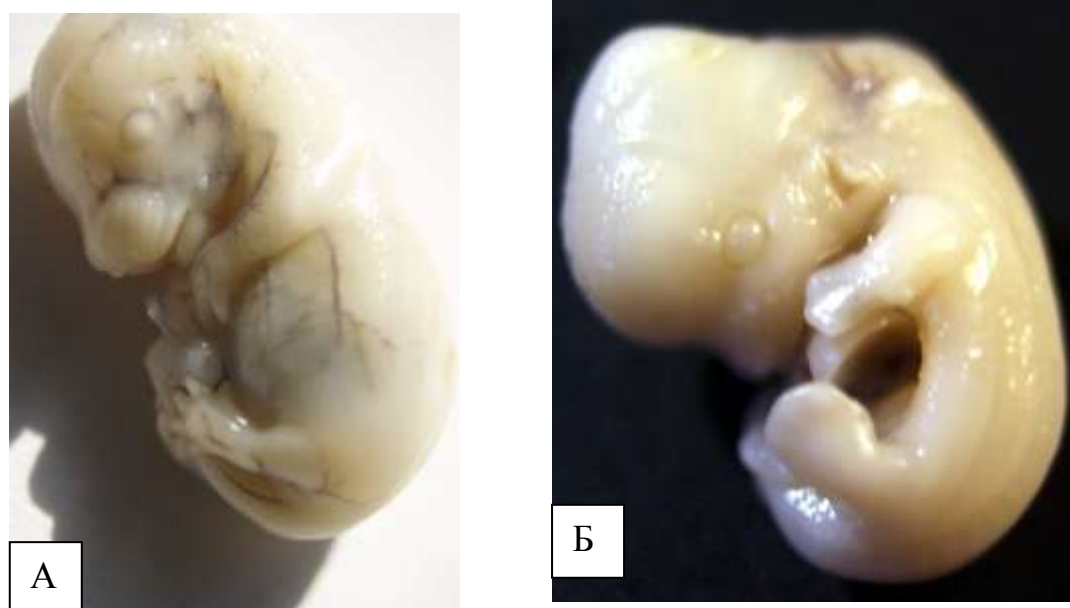


Рис.6.2.Ембріон щура 16,5 діб розвитку в нормі (А) та після впливу гіпоксією (Б). Відставання у диференціюванні бруньок кінцівок у ембріонів щура після впливу гіпоксією – затримка розподілу пальцевих пластинок, затримка закладки вібрис, зміна форми голови.

Досліджуючи вплив гіпоксії на загальний розвиток в експерименті з ембріонами щура в наших дослідженнях спостерігалася також ектопія серця та кила. Виявляли ектопію серця як серед ранніх ембріонів так і на більш пізніх термінах розвитку. У нашому дослідженні ми спостерігали за грудинну ектопію серця у 3,1% експериментальних ембріонів, які підлягали впливу гіпоксією (рис.6.3). Випадки ектопії та утворення кили в експериментальній групі зустрічалися нами на різних стадіях розвитку ембріона як і в попередніх експериментах. Останнім за терміном випадком ектопії серця з явним недорозвиненням передньої стінки грудної та черевної порожнини, нами зустрічався випадок на 16-й добі ембріогенезу. Зовні ембріон не відставав у розвитку від норми, відповідав всім необхідним діагностичним ознакам, майже не відрізнявся по масі. У контрольній групі ембріонів випадків ектопії серця нами не спостерігалася зовсім.



Рис. 6.3. Ембріон щура 13 доби розвитку після впливу гіпоксією. Ектопія серця (вказано стрілкою).

Узагальнюючі дані, що отримали досліджуючи вплив гіпоксії на зовнішній розвиток ембріонів щура ми обчислили співвідношення нормально розвинутих ембріонів до аномально розвинутих, до яких відносили відставання у стадіях розвитку та порушення згинання ембріона, ектопію серця, кили, тощо.

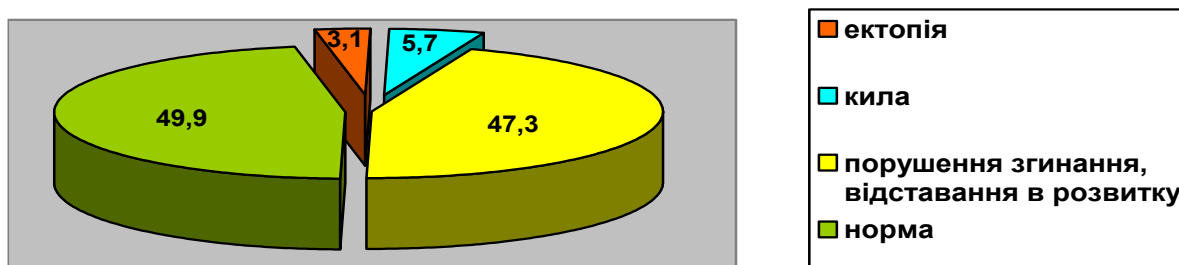


Рис. 6.4. Співвідношення відсотків вад розвитку та нормально розвинутих ембріонів щура в експерименті під впливом гіпоксії (%).

Вплив гіпоксії на загальний хід розвитку ембріона щура виявлявся в першу чергу в затримці ходу ембріогенезу (47,3%), а також спостерігалось виникнення зовнішніх вад розвитку ембріону у вигляді ектопії серця (3,1%), кили (5,7%) та невідповідності діагностичним ознакам. Було встановлено також достовірне зменшення маси ембріонів при дії фізичного чинника – гіпоксії.

6.3. Вплив гіпоксії на кардіогенез зародка щура

Як показали гістологічні дослідження ембріональних сердець, гіпоксія на ранніх етапах ембріогенезу істотно впливає на формування стінок та перегородок серця. Дефектів формування міжпередсердної перегородки як таких ми не зустрічали, але спостерігали затримку об'єднання мезенхімної та м'язової частин перегородки та витончення її середньої частини. Реакція з боку формують процесів міжшлуночкової перегородки була більш виражена та її діапазон порушень її розвитку досить значний. Зокрема, знижений вміст кисню приводив до патологічного осередкового або повного потовщення міжшлуночкової перегородки у ембріонів щурів. Явно виражена неоднорідність товщини міокарда, на нашу думку, може приводити до порушення динаміки скорочення раннього серця та у ембріонів контрольної групи нами не спостерігалась (рис.6.5).

Серед порушень формування міжшлуночкової перегородки після впливу гіпоксією визначалось збільшення її товщини завдяки гіпертрофії міокарду, що зустрічалась на всіх етапах розвитку ембріону, навіть наприкінці ембріогенезу (рис. 6.6). Дана вада розвитку зустрічалась нами як в комбінації з гіпертрофією міокарда стінки шлуночків так і окремо. При цьому завжди

спостерігалось порушення форми самого серця, тобто наближення до кулястої форми.

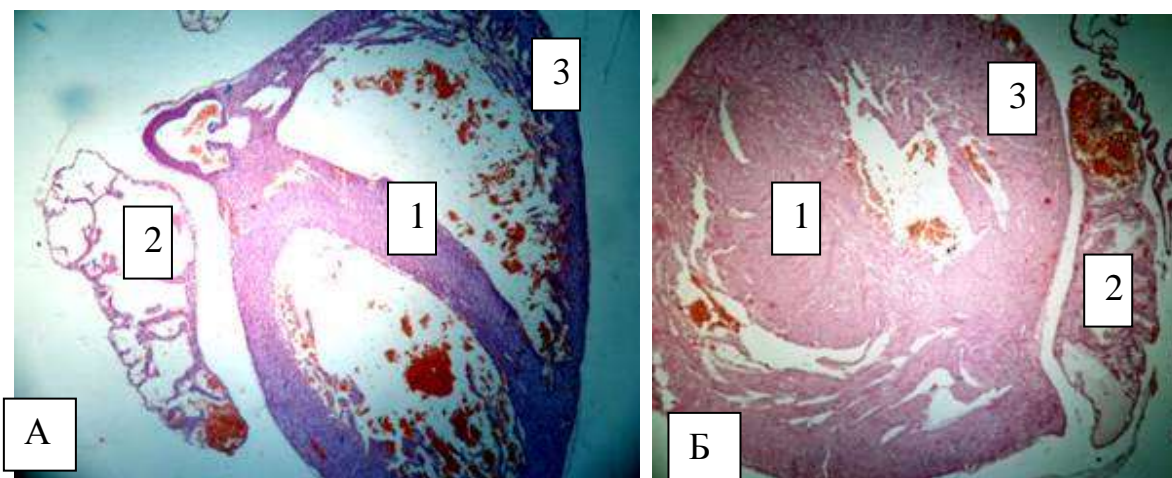


Рис. 6.5. Зріз серця ембріона щура на 15,5 добу розвитку. А – серце ембріона контрольної групи. Б – серце ембріона після впливу гіпоксією.

Забарвлення: гематоксиліном еозином. Збільшення: ок.Х10, об.Х4.

Позначення:

1 – міжшлуночкова перегородка;

2 – передсердя;

3 – стінка шлуночку.

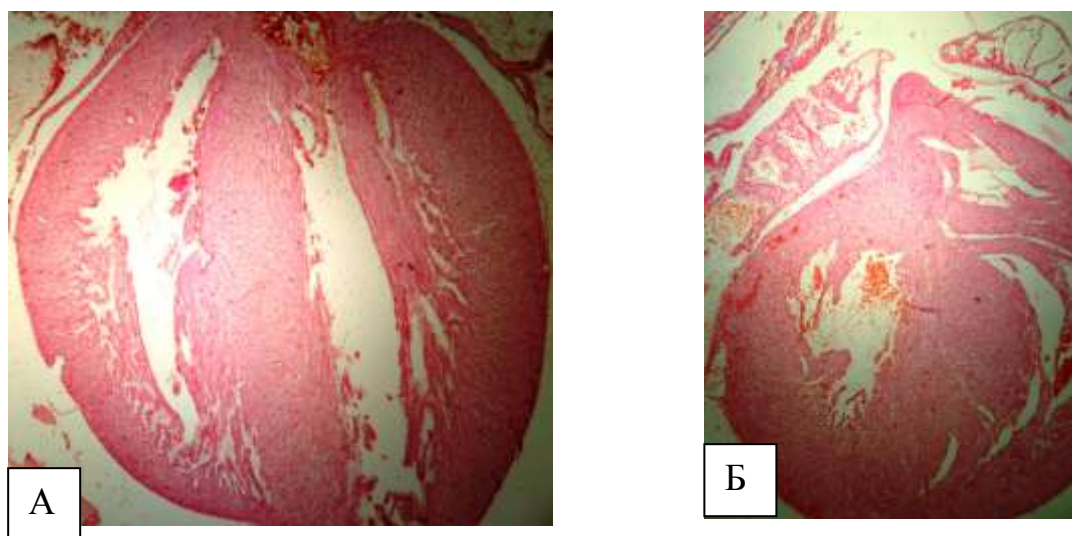


Рис. 6.6. Гістологічний зріз серця ембріона щура 17,5 доби розвитку в нормі – А та після впливу гіпоксією - Б. Збільшення товщини міокарду

міжшлуночкової перегородки після гіпертермії. А - Збільшення: об.10 x ок.8; Б - Збільшення: об.10 x ок.4. Забарвлення: гематоксилін-еозін.

Весь спектр вад міжшлуночкової перегородки, які пов'язані з її гіпертрофією ми розділили на локальні та загальні потовщення. В наших дослідженнях ми класифікували наступні варіанти порушень розвитку перегородки: гіпертрофія базальної частини перегородки, гіпертрофія апікальної частини перегородки, загальна гіпертрофія перегородки, сполучені вади. Серед сполучених вад визначали такі як гіпертрофія базальної частини перегородки, що сполучалась з витонченням апікальної частини, гіпертрофія апікальної частини перегородки сполучалась з наявністю отвору в базальній частині перегородки та ін. Розподіл вад міжшлуночкової перегородки серця у ембріонів експериментальної групи представлено в діаграмі (рис. 6.7).

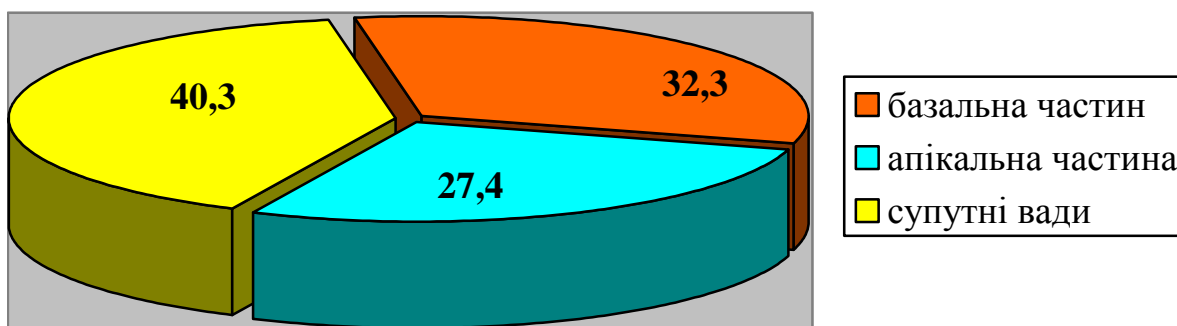


Рис. 6.7. Співвідношення відсотків гіпертрофії різних частин міжшлуночкової перегородки ембріонів щурів в експерименті під впливом гіпоксії (%).

Як показали гістологічні дослідження ембріональних сердець, вплив гіпоксії на ранніх етапах ембріогенезу збільшує ступінь васкуляризації в порівнянні з нормою. Експеримент довів, що гіпоксія провокує активне проростання судин у межах компактного міокарда.

Початок васкулогенезу в нормі характеризується формуванням протокапілярів шляхом каналізації міжклітинних просторів за рахунок агрегації веретеноподібних мезенхімних клітин. Але в серці ембріона, підданого впливу гіпоксією, істотно підвищувалася кількість функціонуючих розгалужених судин та збільшення їх діаметрів. У трабекулярному шарі проростання судин нами помічено не було, тому що кровопостачання цих елементів серцевої стінки здійснюється з порожнини серця. А в компактному міокарді, особливо у підепікардіальній зоні кількість судин була збільшена у 3,2 рази (рис. 6.8). Звертає на себе увагу також те, що збільшується периваскулярний простір, а також збільшені інтерстиціальні проміжки між пучками кардіоміоцитів.

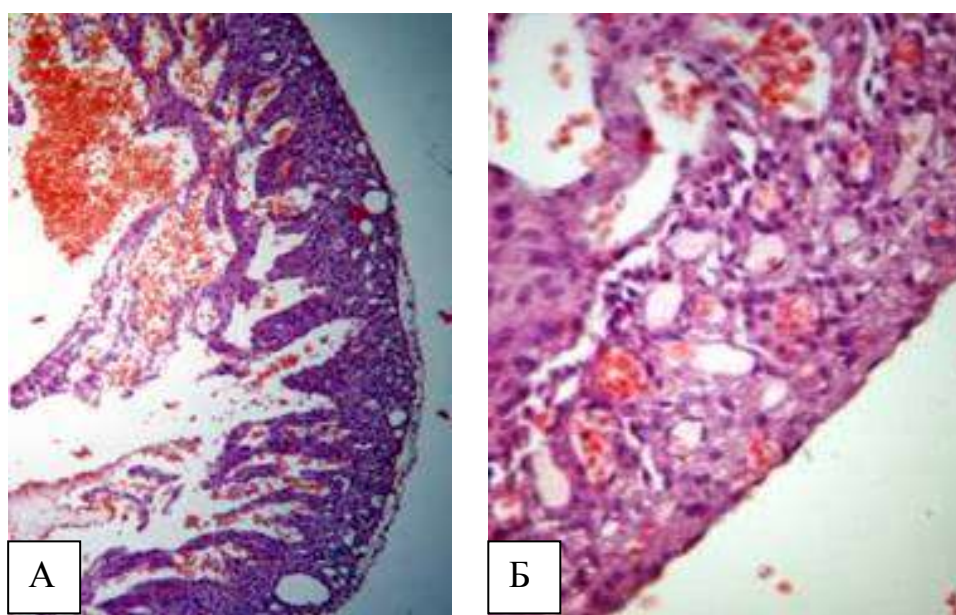


Рис. 6.8. Стінка правого шлуночка серця ембріона щура 15-ї доби розвитку після впливу гіпоксією (А). Добре вирізняються численні судини міокарду. Б – збільшений фрагмент попередньої фотографії. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: А - об. х 10. ок. х 8; Б - об. х 10. ок. Х10.

Вплив гіпоксії відбивається на формуванні серцевої стінки по-різному. В наших дослідженнях зустрічались випадки локальної гіперплазії ендотелію як

передсердь так і шлуночків. Серед зазначеної патології слід виділити деякі особливості. На терміні розвитку з 15-ї до 18-ї доби в серцях ембріонів експериментальної групи спостерігались такі види локальної гіперплазії ендотелію: часткова гіперплазія ендотелію передсердь, повна гіперплазія ендотелію передсердь, повна гіперплазія ендотелію шлуночків та повна гіперплазія ендотелію усього серця (тобто передсердь та шлуночків) (рис.6.9).

Таким чином, результати дослідження продемонстрували вплив гіпоксії на хід кардіогенезу ембріона щура, який проявлявся у порушенні формоутворюючих процесів серцевої стінки та судинного русла. Вплив гіпоксії на процес утворення стінки серця ембріонів експериментальних тварин виявлявся в першу чергу у збільшенні діаметру та кількості функціонуючих судин та в появі процесів гіперплазії ендотелію. Ступінь вираженості гіперплазії відрізнявся у ембріонів різного віку та різних камер серця. Найчастіше зустрічалась повна гіперплазія передсердь.



Рис. 6.9. А - Гістологічний зріз серця ембріона щура 15-16 доби розвитку після впливу гіпоксією. Гіперплазія ендотелію. А - Збільшення: об.10 х ок.4.

Б - Передсердя - збільшений фрагмент попереднього фото Збільшення: об.10 х ок.10. Забарвлення: гематоксилін-еозин.

Позначення:

1 – порожнина передсердя;

2 – порожнина шлуночку.

Вплив гіпоксії на розподіл конотрункусу на аорту та легеневий стовбур визначався як і в експерименті з високою температурою збільшенням діаметру крупних судин серця та змінами, що виникали в заслінках аорти та легеневого стовбура. Детальний аналіз змін, що виникають у процесі ембріогенезу проводився з використанням імуногістохімічних маркерів.

Досліджуючи вплив гіпоксії на розвиток великих судин серця таких як аорта та легеневий стовбур та формування півмісяцевих заслінок цих судин ми спостерігали той факт, що після впливу гіпоксією у ембріонів щура збільшується обсяг мезенхіми напівмісячних заслінок аорти. Отримані дані дозволяють припустити, що вплив тератогену на ініціацію апоптотичної активності як і в експерименті з високими температурами не є однозначним. Поряд з зменшенням кількості апоптозів в експериментальній групі, ми спостерігали неоднозначне розміщення проліферативних центрів. Мітотичний індекс міокарду був підвищений після гіпоксії (+++), але локалізація клітин, що поділяються, суттєво відрізнялась навіть в рамках одного експерименту та стадії розвитку.

Як і в експерименті з гіпертермією спостерігалось порушення співвідношення апоптоз-проліферація, що в свою чергу призводило до виникнення аномальних за формою стулок півмісяцевих заслінок великих судин серця. Нерідко вони мають відрости різної товщини та довжини, які звернені у просвіт судини, чого не зустрічалось в контрольній групі тварин. Безумовно, такі зміни у формоутворенні клапанного апарату великих судин серця не можуть не впливати на гемодинаміку цього важливого органа.

Дослідження ранніх етапів формування стулок напівмісячних заслінок аорти та легеневого стовбуру в нормі та після впливу гіпоксії показало, що поряд з порушенням формоутворюючих процесів аорти та легеневого

стовбуру в період ембріогенезу (збільшення діаметру та довжини) відбувається також зсув співвідношення апоптоз-проліферація у сторону збільшення проліферативних процесів на тлі зменшення апоптотичних механізмів, що призводить до формування аномальних за формою стулок заслінок крупних судин серця.

Досліджуючи процеси запрограмованої загибелі клітин (апоптоз) ми виявили, що кількість апоптотичних клітин на етапах формування стулок великих судин серця за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж в експерименті з гіпоксією. Істотне зменшення інтенсивності апоптотичних процесів в області конотрункусу раннього ембріонального серця безумовно має значення у формоутворенні вад аорти та легеневого стовбура. Ми спостерігали після впливу гіпоксією у ембріонів щура збільшення обсягу мезенхіми півмісяцевих заслінок аорти (рис.6.10).

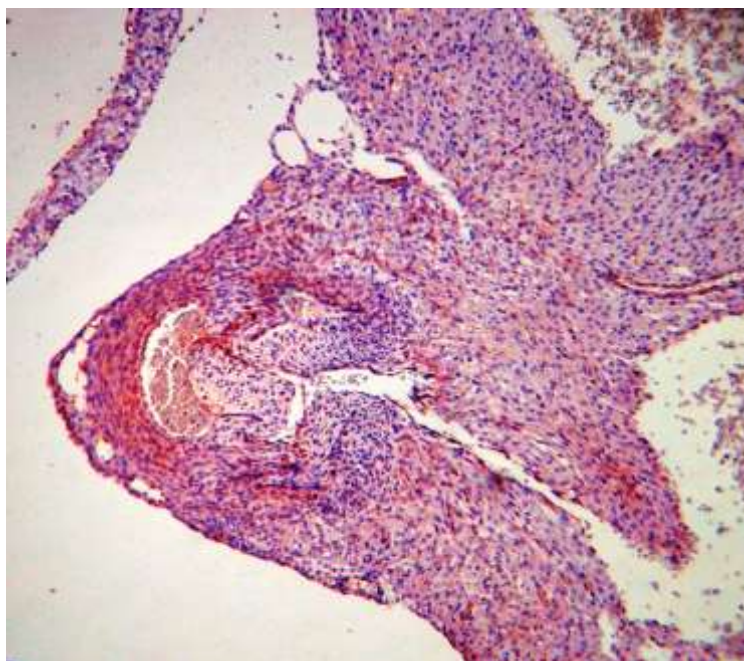


Рис 6.10. Поперечний зріз аорти на рівні півмісяцевих стулок клапану аорти серця ембріона щура 12-ї доби розвитку після впливу гіпоксією. Збільшення обсягу мезенхімної частини заслінок. Збарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об.10 x ок.4.

Дослідження ранніх етапів формування стулок на півмісячних заслінок аорти та легеневого стовбуру в нормі та після впливу гіпоксії показало, що поряд з збільшенням діаметру аорти та легеневого стовбуру в період ембріогенезу відбувається також формування аномальних за формою стулок заслінок судин. Варіанти форми заслінок, що формуються досить великий, та мабуть не всі порушення форми призводять до впливу на гемодинамічну функцію серця, тому що ми зустрічали аномальні за формою заслінки навіть наприкінці ембріогенезу без явних ознак порушень розвитку зі сторони серця.

Вплив гіпоксії на формування стінок камер серця визначався не тільки в збільшенні кількості діючих судин та їх діаметру, але й в гіпертрофії міокарда шлуночків. Збільшення товщини серцевої стінки відбувалось за рахунок розростання саме компактного міокарду як правого так і лівого шлуночків (рис.6.11).

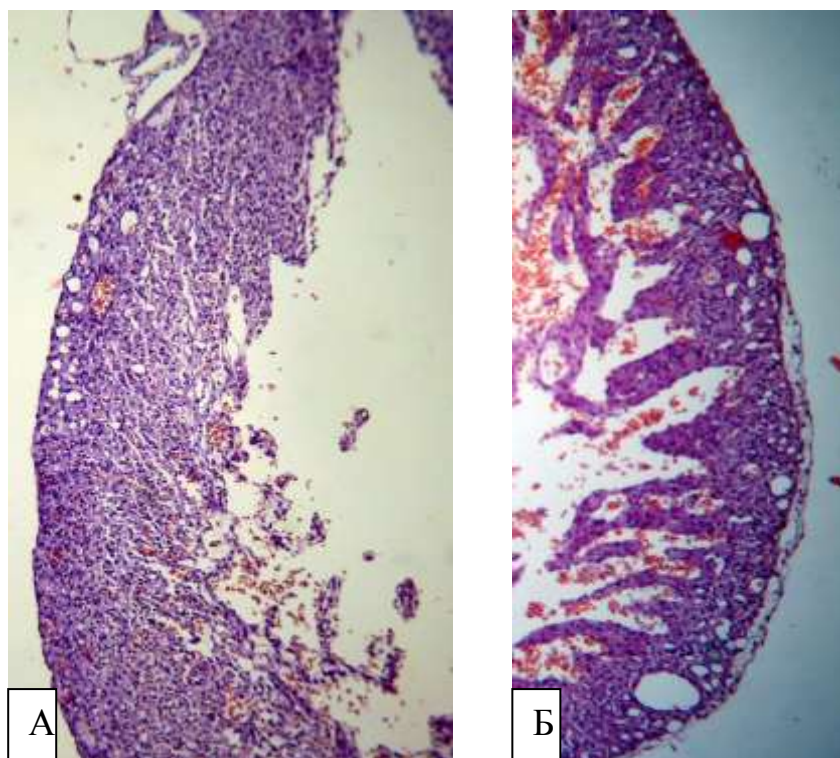


Рис. 6.11. Гістологічний зріз стінки серця ембріона щура 13-14 доби розвитку. Збільшення товщини міокарду та кількості і діаметру судин компактного міокарду після впливу гіпоксією. А – стінка лівого шлуночку;

Збільшення: об.10 х ок.4. Б - стінка правого шлуночку; Забарвлення: гематоксилін-еозин; Збільшення: об.10 х ок.4.

Вплив гіпоксії на хід кардіогенезу та на формоутворюючі процеси визначався також і в порушенні формування стінки передсердя. Хоча дані відходження від норми спостерігались рідше ніж інші види аномального розвитку, проте на ранніх етапах ми зустрічали потовщення стінки та утворення аномальних трабекул передсердя (рис. 6.12). Збільшення товщини передсердя не завжди співпадало з гіпертрофією міокарда шлуночків, що само по собі, на наш погляд, є дуже цікавою подією. Вплив гіпоксії призводив до формування широких трабекул, які за розмірами дорівнювали товщині стінки передсердя, чого ніколи не зустрічається в нормі. Ми спостерігали випадки, коли трабекули передсердя займали майже весь обсяг порожнини передсердя.

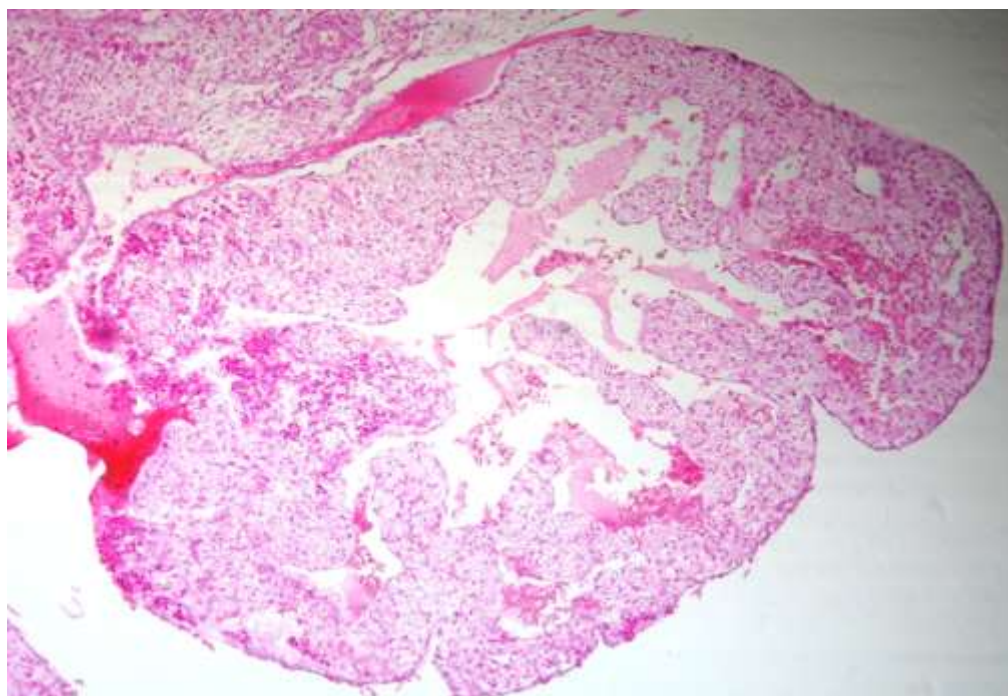


Рис. 6.12. Гістологічний зріз стінки серця ембріона щура 12 доби розвитку. Збільшення товщини міокарду передсердя та тарбекул після впливу гіпоксією. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об.10 х ок.4.

Гіпертрофія міокардіальних структур після впливу гіпоксією відбувалась за рахунок збільшення проліферації м'язових клітин. Використання маркера проліферації Ki67 дало змогу виявити, що мітотичний індекс в експериментальній групі виростає у 1,8 – 1,3 рази, залежно від часу, який проходить після впливу тератогенного чинника (рис. 6.13). Першою «відповіддю» на вплив гіпоксії у міокарді ембріонів щура, тобто відповіддю першою-другої доби є відсутність прискорення проліферативної активності, вона майже дорівнює нормі (контрольній групі), але вже з третьої доби після впливу спостерігається підвищення процесів проліферації, пік цього підвищення спостерігається на 4-6 день, а потім процеси проліферації плавно затухають і повертаються до норми. Але на цей період вже сформовано потовщення м'язових елементів стінки або перегородок серця, тобто процес гіпертрофії вже відбувся.

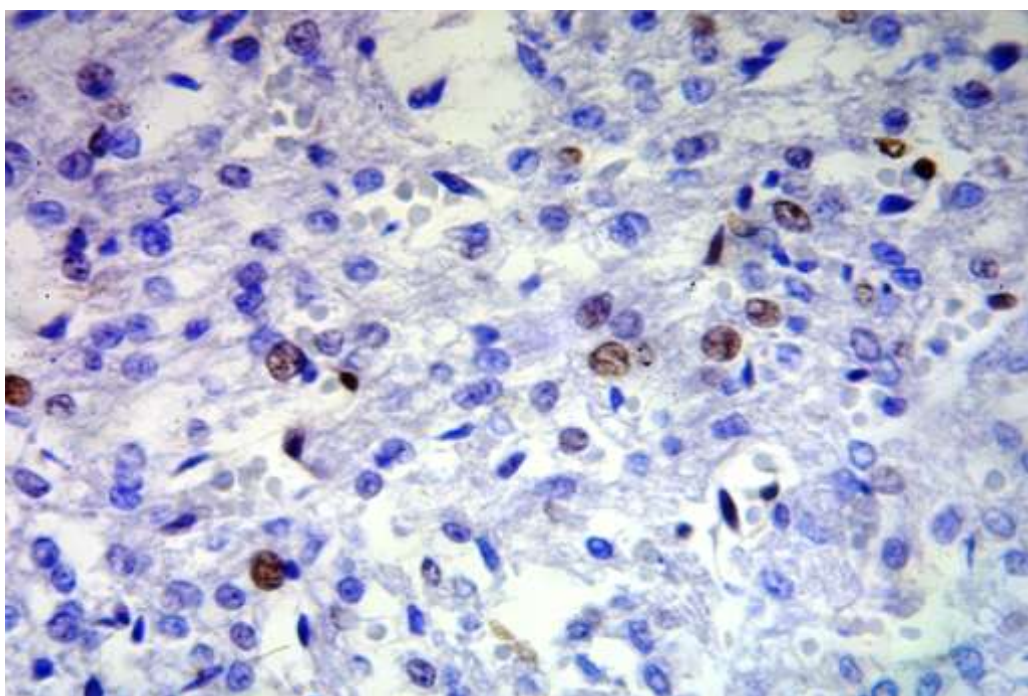


Рис. 6.13. Гістологічний зріз стінки правого шлуночку серця ембріона щура 12 доби розвитку після впливу гіпоксією. Накопичення клітинами маркера проліферації Ki67 (коричневий колір клітин). Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об.10 x ок.10.

Наші дослідження виявили, що «відповідь» на вплив гіпоксією трабекулярного та компактного міокарду досить різна. Проліферативних центрів в трабекулах шлуночків ми майже не зустрічали ні при дослідженнях під світловим мікроскопом при оглядових Забарвлення: х препарату, ні при використанні імуногістохімічних маркерів. Реакція компактного міокарду демонструвала збільшення кількості мітозів (накопичення маркера +++) (рис. 6.14). Такий розподіл проліферативних центрів пояснює той факт, що гіпертрофія міокарду відбувається в основному за рахунок розростання компактних ділянок раннього серця (компактний міокард міжшлуночкової перегородки, компактний міокард стінки шлуночку, або передсердя) і майже не впливає на товщину трабекулярного шару.

Для співставлення основних формоутворюючих процесів ембріонального серця після впливу тератогену, нами досліджувались також процеси апоптозу – запрограмованої загибелі клітин та порівнювались отримані результати з контрольною групою.

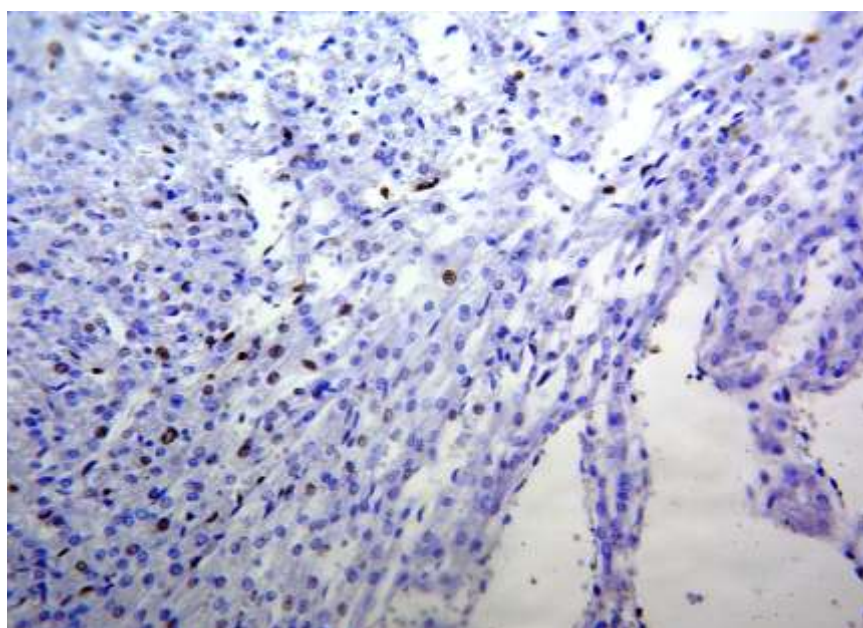


Рис. 6.14. Гістологічний зріз стінки лівого шлуночку серця ембріона щура 12 доби розвитку після впливу гіпоксією. Накопичення клітинами маркера проліферації Кі67 (коричневий колір клітин) у компактному та трабекулярному міокарді. Забарвлення: залізний гематоксилін Гейденгайна. Збільшення: об.10 x ок.8.

Тимчасовий кисневий голод клітин ембріонального серця призводив до зменшення кількості апоптозів у міокарді. Тобто співвідношення проліферація-апоптоз витримувало зсув у сторону переваги проліферації (рис.6.15). Час зниження апоптотичних процесів був досить значним у рамках раннього кардіогенезу. Таким чином, ми дійшли висновків, що гіпоксія провокує зниження апоптозу, що теж має важливе значення для формування гіпертрофії окремих структур серця. Апоптотичний індекс повертався до норми лише наприкінці ембріогенезу щура, а саме, починаючи з 17-18 доби розвитку.

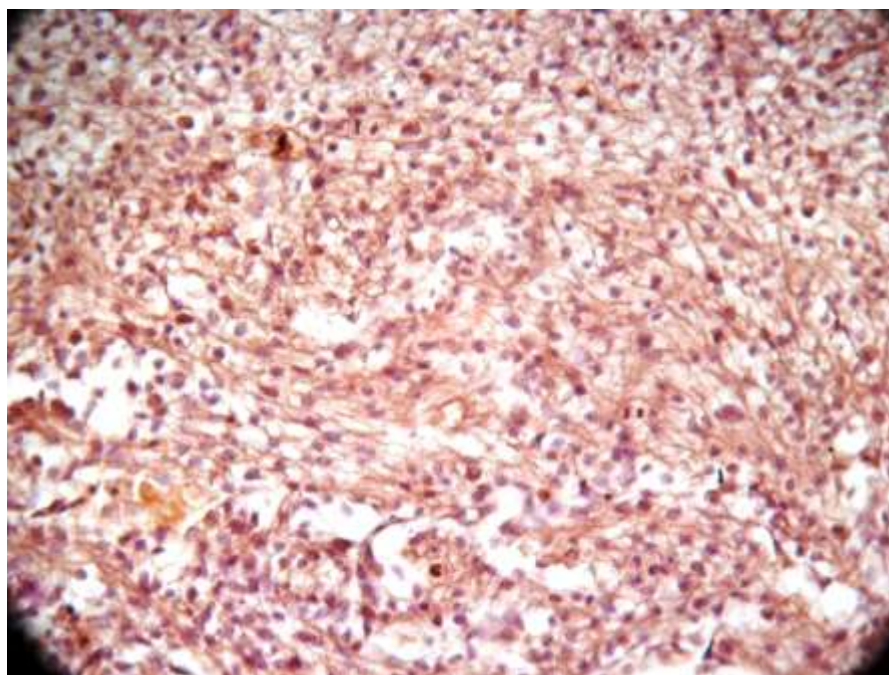


Рис. 6.15. Гістологічний зріз стінки правого шлуночку серця ембріона щура 12 доби розвитку після впливу гіпоксією. Накопичення клітинами маркера апоптозу bcl-2 (коричневий колір клітин) у міокарді. Забарвлення: залізний гематоксилін. Збільшення: об.10 x ок.8.

Як і в дослідженнях з гіпертермією, ми спостерігали зміни у формуванні передсердно-шлуночкових клапанів. Вплив гіпоксії на ЕМТ призводив до змін у клітинному складі стулок клапанів (рис.6.16).

Стулки передсердно-шлуночкових клапанів були досить неоднорідні за клітинним складом: поряд з компактно розташованими мезенхімними клітинами спостерігались характерні для раннього кардіогенезу мезенхімні клітини з зірчастими довгими відростками, що розташовувались досить пухко та зберігали у просторах між собою залишки кардіогелю, якого на даному етапі розвитку не має бути в стулках (рис. 6.17). Аномальність стулок полягала також в порушенні симетрії, форми та процесу міокардіолізації. Ми зустрічали стулки з добре диференційованим шаром м'язових пучків поряд з ембріональними мезенхімними клітинами.

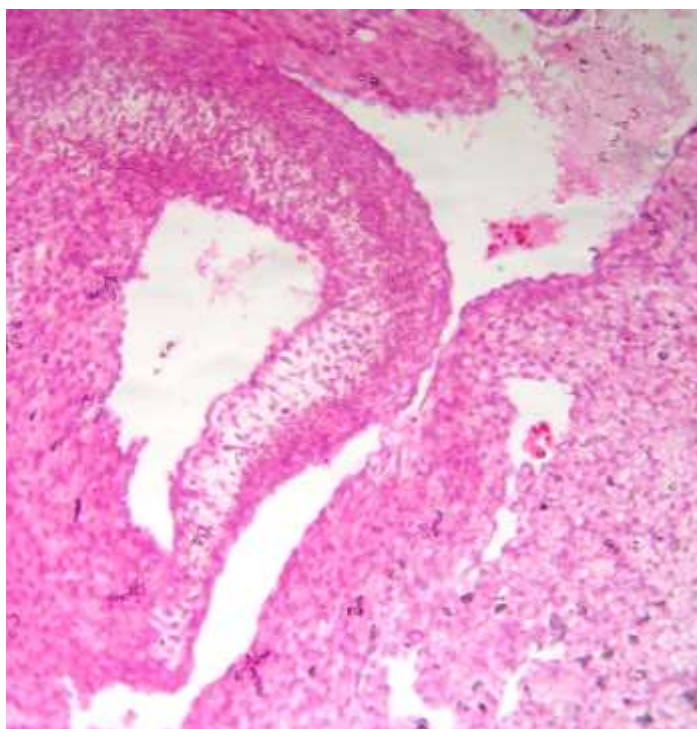


Рис. 6.16. Гістологічний зріз лівого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона щура 13 доби розвитку після впливу гіпоксією. Забарвлення: гематоксилін-еозін. Збільшення: об.10 х ок.4.

Аналогічну картину спостерігали в експериментальній групі в міокарді шлуночків, коли замість процесів компактизації диференційованих м'язових пучків виникали ділянки пухко розташованих клітин, а в трабекулярних ділянках розвивався процес компактизації (рис.6.17). Вочевидь гіпоксія може порушувати процеси просторової орієнтації м'язових пучків та зупиняє диференціювання тканини на якийсь час. Вказана аномалія зустрічалась тільки на даному етапі розвитку, швидко плинула і на наступних етапах кардіогенезу вже не спостерігалась в наших дослідженнях. Можливо тканини при поверненні нормального кисневого режиму компенсують тимчасову нестачу кисню і повертаються до нормального ходу розвитку. Таким чином, ми дійшли висновку, що є етап розвитку серця, коли відповідна реакція на стрес кисневої недостатчості може бути тимчасово неадекватною.

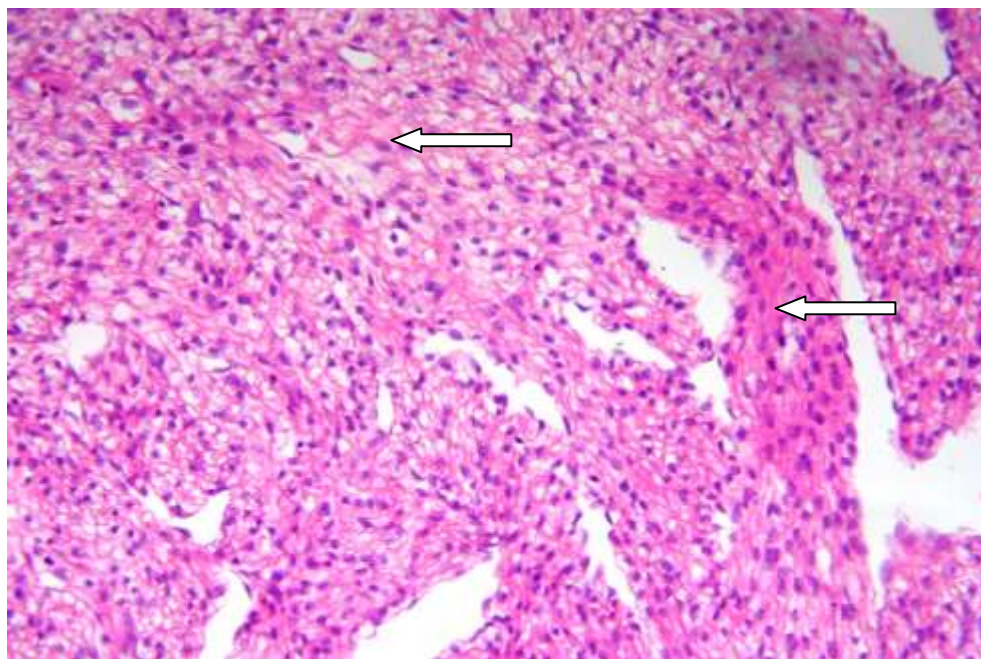


Рис. 6.17. Гістологічний зріз стінки лівого шлуночку серця ембріона щура 12 доби розвитку після впливу гіпоксією. Стрілками вказані ділянки компактизації в трабекулярному шарі, та розволокнення в компактному міокарді. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об.10 x ок.4.

Таким чином, результати дослідження продемонстрували вплив гіпоксії на хід кардіогенезу ембріона щура, який проявлявся у порушенні формоутворюючих процесів серцевої стінки, судинного русла, великих судин серця та їх клапанного апарату.

Досить важливим є той факт, що вплив гіпоксією на різних часових відрізках призводить до різних результатів. Ми реалізували задачу пошуку термінаційних періодів кардіогенезу для гіпоксії як фізичного чинника зовнішнього середовища. Вагомим результатом вважаємо, що виявлено період ембріонального розвитку, впродовж якого вплив гіпоксією призводив до формування вад розвитку серця не спонукаючи масової загибелі ембріонів. Таким періодом для ембріона щура є період 10-11 стадії ембріогенезу, що відповідає 9 добі розвитку. В цей час серцева трубка ще утримує досить значні залишки кардіогелю та починається процес септації і утворення камер і клапанного апарату.

Аналізуючи дані, отримані в експериментальній групі дослідних тварин, ми класифікували всі випадки аномалій розвитку. Серед вад розвитку серця після впливу гіпоксією на ембріони щурів найбільший відсоток складало потовщення МШП (38,3%) та формування міжшлуночкового отвору (33,4%). Вплив гіпоксії на процес утворення стінки серця ембріонів експериментальних тварин виявлявся не тільки у гіпертрофії міокарду, але й у збільшенні діаметру та кількості функціонуючих судин та в появі процесів гіперплазії ендотелію. Класифікація вад розвитку серця, що утворюються після впливу гіпоксією представлена на діаграмі (рис. 6.18). Всі порушення, що пов'язані з формуванням стінки ембріонального серця, були нами поєднані в одну групу,

хоча досить часто ми зустрічали комплексні вади розвитку серця, що ускладнювало класифікацію вад.

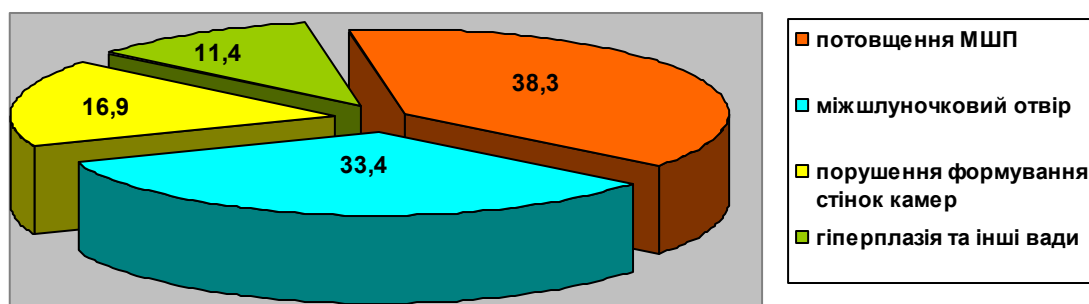


Рис. 6.18. Розподіл вад розвитку серця після впливу гіпоксією на ембріон щура (%)

Наприклад такі вади, потовщення МШП супроводжувались збільшенням діаметру, а іноді і кількості судин міокарду. Випадки гіперплазії поєднувались з гіпертрофією МШП та міокарду шлуночків, зміни в клапанному апараті серця виникали в серцях, де порушувались процеси формування внутрішнього рельєфу шлуночків.

Висновки за розділом.

Вплив гіпоксії на ембріогенез зародка щура проявляється, у першу чергу, у затримці ходу ембріогенезу, що виражається в невідповідності стадіям нормального розвитку та в достовірному зменшенні маси ембріонів в порівнянні з контрольною групою. Помітно виділялося порушення згинання й скручування ембріона, як у головному, так і у хвостовому відділах, що говорить про порушення ходу нормального ембріогенезу. Одною з відмінних ознак впливу гіпоксії на ранніх етапах розвитку виявилась зміна форми голови, що є показником порушення розвитку мозкових пухирів

Дослідження кардіофетального індексу показало, що маса серця достовірно збільшувалася в порівнянні з нормою, тобто гіпоксія провокувала гіпертрофію серця. Але процес збільшення маси серця протягом ембріогенезу був неоднозначним: достовірне збільшення маси серця спостерігалось лише до 15 доби ембріогенезу, а наприкінці розвитку показники майже не відрізнялись від норми.

Вплив гіпоксії на ранніх етапах ембріогенезу істотно змінює алгоритм формування перегородок серця. Зокрема, знижений вміст кисню приводив до патологічного осередкового потовщення міжшлуночкової перегородки у ембріонів щурів. Наші спостереження показали, що гіпоксія провокує гіпертрофію міокарду, що проявляється у збільшенні товщини компактного міокарду міжшлуночкової перегородки.

Вперше виявлено як наслідок дії тератогену гіперплазію ендокарду, як загальної, тобто для всіх відділків серця так і часткової. Ступінь гіперплазії відрізнявся у ембріонів різного віку та різних камер серця. Найчастіше зустрічалась гіперплазія передсердь.

В серці ембріонів експериментальної групи істотно підвищувалася кількість функціонуючих розгалужених судин та їх діаметрів.

Виявлено термінаційний період ембріонального розвитку, коли вплив гіпоксією призводив до формування широкого спектру вад розвитку серця не викликаючи масової загибелі ембріонів. Таким періодом для ембріона щура є період 10-11 стадії ембріогенезу, що відповідає 9 добі розвитку.

Результати дослідження за розділом представлені у публікаціях: 35, 40, 44, 46, 117, 118, 122, 123, 124, 125, 126.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

7.1. Виявлення термінаційних періодів кардіогенезу у ембріонів курки та щура

Визначивши, що можливий термінаційний період розвитку серця є етап септації, тобто етап розподілу первинної серцевої трубки на окремі камери, ми проводили вплив гіпоксією та гіпертермією на етапах розвитку, що передують септації, а саме на 8-9 добі вагітності самиці щура та 3-4добі ембріогенезу курки. Дослідження дії таких тератогенів як гіпоксія та гіпертермія на процеси загального розвитку ембріона та на хід кардіогенезу, визначався в першу чергу на підвищенні смертності ембріонів. Результати дослідження показали, що найбільша ембріональна смертність в експериментальній групі ембріонів курки 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 цього фізичного фактора на розвиток ембріону. В контрольній же групі смертність спочатку інкубації не спостерігалася, а, починаючи з 10-ї доби, зустрічалися поодинокі випадки, найбільша частка загиблих курячих ембріонів зустрічалася в самому кінці інкубації.

Дослідження вагових показників ембріонів курей та щурів в порівнянні з контрольною групою та в експерименті продемонстрували, що вплив фізичних факторів (гіпоксія та гіпертермія) призводить до стабільного відставання ваги, незалежно від чинника та виду тварин (рис.7.1.).

Аналіз дослідження зовнішніх вад розвитку цілого ембріона в експерименті продемонструвало деякі особливості впливу гіпоксії та гіпертермії на ембріони різних видів дослідних тварин. А саме: тільки після

впливу високими температурами виникали такі аномалії розвитку як ектопія серця у ембріона курки, в той час як у ембріонів щура ми спостерігали дану аномалію розвитку як після впливу високою температурою так і після гіпоксії. Можна навіть говорити, що гіпертермія раннього ембріогенезу ссавців впливає на формування ектопії в більшій мірі ніж гіпоксія.

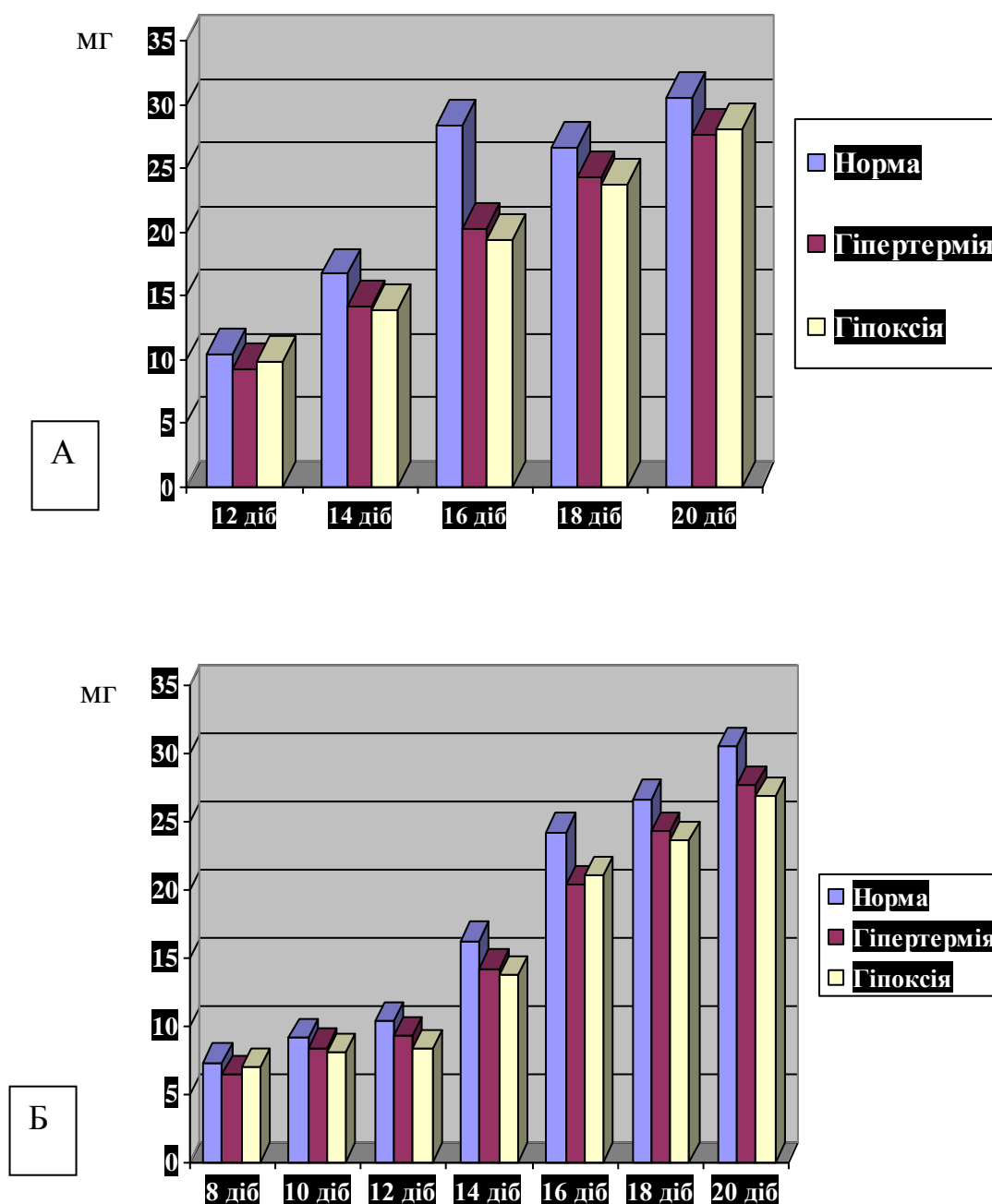


Рис.7.1. Динаміка зміни вагових показників ембріонів контрольної групи та в експерименті А – ембріони щура, Б – ембріони курки.

Порушення процесів септації ембріонального серця продемонструвало вплив гіпоксії та гіпертермії на формування стінок камер серця, формування міжпередсердної та міжшлуночкової перегородок, передсердно-шлуночкових клапанів та великих судин серця. Таким чином вплив гіпоксії та гіпертермії позначався на розвитку всіх компонентів серця.

Аналіз вад розвитку серця у обох видів дослідних тварин показав, що саме ці періоди ембріогенезу є найбільш вразливими для розвитку серця. Нами спостерігались як спільні для ембріонів курки та щура вади так і окремі, тобто видові. Серед видових вад слід зазначити гіперплазію ендокарду щурів після впливу гіпоксією, або придбання такої вади як ектопія серця у курки після впливу гіпертермією, в той час як дана вада спостерігалась у ембріонів щура незалежно від чинника.

Спектр вад розвитку серця був різноманітним, але порушення формування міжшлуночкової перегородки ми спостерігали як після впливу гіпоксією так і після впливу гіпертермією в обох експериментальних групах. Діапазон порушень МШП після дії обох чинників досить великий: від міжшлуночкового отвору до витончення середньої частини перегородки та розшарування її на окремі трабекули. Серед дефектів МШП часто спостерігалось не об'єднання м'язової та мезенхімної частин міжшлуночкової перегородки, тобто наявність отвору у верхній частині МШП, чого не зустрічалось у контрольній групі. Другим порушенням процесів септації було утворення перфорацій у міжшлуночкової перегородці. Такі перегородки нагадували окремі трабекули між якими зберігались отвори – перфорації і які не розділяли повністю порожнини шлуночків та мали вигляд розвинутих синусоїдів. Дослідники зустрічали такі розрізнені випадки формування зазначених аномалій [136, 168, 257], але не пов'язували їх виникнення з впливом гіпоксії або гіпертермії. Витончення перегородки хоча і не являло собою дефект розвитку, але не могло не впливати на гемодинамічну функцію серця. Це свідчить на користь того твердження, що даний період кардіогенезу є термінаційним періодом для формування серця загалом та міжшлуночкової

перегородки зокрема. Ми в наукових літературних джерелах не зустріли ніяких класифікацій дефектів уроджених вад міжшлуночкової перегородки в моделях та експериментах під впливом фізичних чинників, тому важко проводити порівняння. Якщо узагальнити вплив гіпертермії на обидві групи експериментальних тварин, то можна визначити, що загалом висока температура призводить більш до витончення стінок камер серця. В той час як вплив гіпоксії провокував загальне або локальне потовщення стінок передсердь, шлуночків та перегородок.

Використання імуногістохімічних маркерів дало змогу підтвердити визначені термінаційні періоди на тканинному рівні при гістологічних дослідженнях, тобто дослідити вплив зазначених чинників на хід базових гістогенетичних процесів та їх зміни. Використання цих чутливих методик виявлення відходів від норми на рівні тканини дозволило співставити процеси проліферації та апоптозу, процеси васкулогенезу з адаптаційними механізмами тканин. Проводячи порівняльний аналіз експресії антиапоптотичного білка bcl-2 та маркера проліферації клітин Ki-67 ми співставляли напрямок розвитку ділянки серця. Результати порівнянь впливу гіпоксії та гіпертермії на серце, що розвивається досить різні у різних груп тварин, але є і спільні риси. Аналіз накопичення маркера проліферації свідчить, що загалом гіпертермія знижує проліферативну активність клітин міокарду і в меншому ступені мезенхімних структур. Такі результати співпадають з даними вчених [168, 169, 176, 177], але протиречать дослідженням інших [189, 198, 199, 211, 212]. Тут можна говорити про період впливу на тканину та ступінь її диференціювання, але зазначені автори не ставили перед собою таких цілей, тому і результати протиречиві. Можливо, що вплив гіпоксії або високих температур на м'язову тканину буде іншим, якщо тканина вже високо диференційована, тобто вплив проводиться наприкінці ембріонального розвитку.

Аналізуючи вплив тератогенів на структури ембріонального атріовентрикулярного каналу, ми мали певні труднощі у співставленні

результатів через видові відмінності клапанного апарату серця птахів та ссавців, які визначені вище. Ендокардіальні подушки передсердно-шлуночкового отвору під впливом як гіпоксії так і гіпертермії змінювали свою форму та відставали на декілька стадій в розвитку. Нами спостерігались аномальні за формою і клітинним складом ендокардіальні подушки, незалежно від їх походження та терміну утворення. Майже завжди порушення клітинного складу ендокардіальних подушок було результатом порушень епітеліально-мезенхімних перетворень та редукцією кардіогелю. Такі дані співпадають з результатами закордонних вчених [213, 314, 295, 248, 260]. 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 має значення для аномального перебігу ЕМТ. У формуванні атріовентрикулярних подушок виділялася стадія, коли максимальна кількість клітин накопичувалася під ендокардом. Можливо, що це стадія характеризувалася меншою міграційною активністю клітин або особливостями складу матриксу в цій зоні. Лабільність форми АВ подушок у всіх нормальних зародків протягом другого періоду, на нашу думку, відіграє важливу роль в ефективному закритті просвіту АВК. 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 спостерігалося після дії гіпоксії та гіпертермії.

Зміна форми ендокардіальних подушок не може не впливати на скорочувальну функцію, бо відомо, що саме ці утворення первинного серця виконують роль презумптивних клапанів. Досліджуючи вплив таких тератогенних чинників гіпоксії та гіпертермії, ми спостерігали невластиве для нормального кардіогенезу порушення процесу делямінації міокарду атріовентрикулярного каналу утворення аномальних за формою ендокардіальних подушок. Під впливом гіпертермії делямінаційна пластинка не підлягала повній перфорації як то відбувається в нормі, а

залишалась часткою внутрішнього шару стінки шлуночків, утворюючи «двохшаровий» міокард. Так як процес делямінації відбувається на самих ранніх етапах кардіогенезу, то і вплив тератогенними чинниками саме в ці швидкоплинні періоди призводить до порушень як формування стінок камер серця так і похідних всього процесу делямінації: стулок передсердно-шлуночкових клапанів, соскоподібних м'язів та сухожилкових струн [137, 138]. Ми визначили, що термін впливу на кардіогенезу прямо залежить від часу, а саме: найбільший результат зсувів формування серця припадає на час, коли відбуваються ЕМТ, існує кардіогель, або його залишки та відбувається процес делямінації атріовентрикулярного каналу та міокарду шлуночків. Таких даних ми не зустрічали в наукових публікаціях, тому порівняння провести не представляється можливим. Після впливу гіпоксією ми спостерігали в обох групах тварин потовщення делямінаційної пластинки та порушення процесів трабекуляції. Таких процесів ми не спостерігали 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 передсердно-шлуночкових клапанів [47, 48, 49, 137].

Затримка редукції кардіогелю ендокардіальних подушок атріовентрикулярного каналу призводила до високої варіативності форм подушок, бо як відомо кардіогель редукується паралельно заселенню обсягу подушки мезенхімою. 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 ЕМТ ендокардіальних подушок та заповнення обсягу подушки мезенхімними клітинами, затримка формування зон ЕП та процесу їх міокардіолізації. Розрізнені дані щодо впливу тератогенних чинників на процес формування передсердно-шлуночкових клапанів ми зустрічали в світовій науковій

літературі [46, 66, 68, 82, 163, 199]. У зв'язку з тим, що в наших дослідженнях ми розглядаємо клапанний апарат як систему: стулка-сухожилкова струна-соскоподібний м'яз, яка розвивається з єдиної закладки та залежить від процесу делямінації, то і аналіз вад, що виникають в даній системі ми проводили обов'язково комплексно [44, 46, 61, 128, 137]. Таких робіт, що аналізують всю систему клапанного апарату ми не зустріли в науковій літературі.

Результати морфометричних досліджень вказують на негативний вплив гіпоксії та гіпертермії на хід формоутворюючих процесів атріовентрикулярного каналу та формування стулок передсердно-шлуночкових клапанів (рис. 7.2, 7.3).

Результати порівнянь вказують на загальний напрямок зменшення довжини стулок після впливу високими температурами. 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 менше виражений.

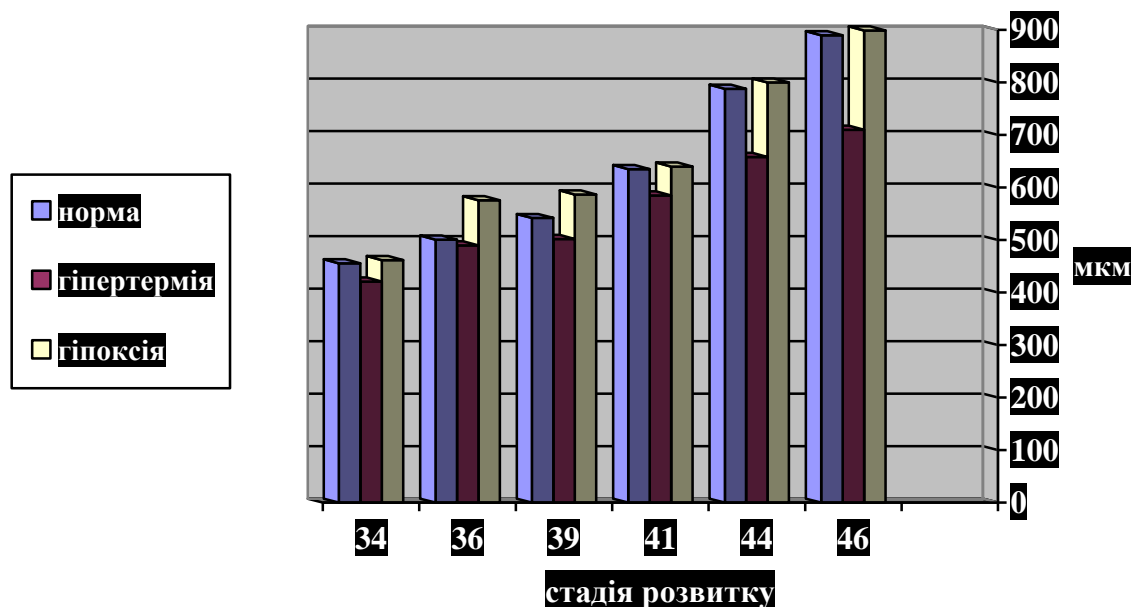


Рис. 7.2. Динаміка зростання довжини первинних стулок лівого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки протягом ембріогенезу в нормі і після впливу гіпертермією та гіпоксією (мкм).

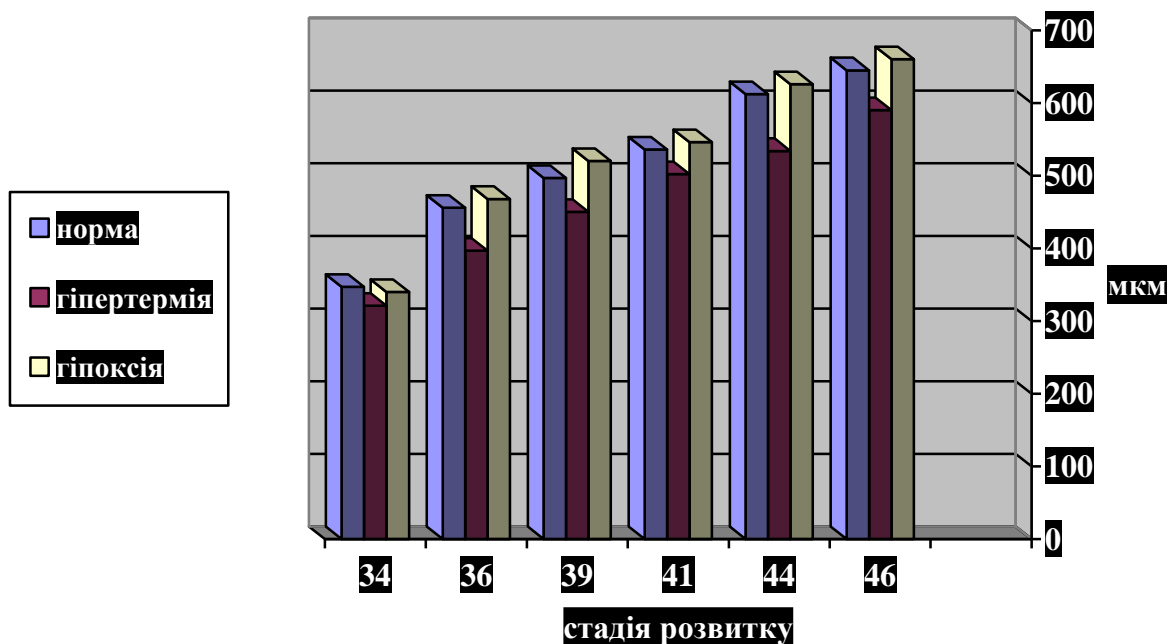


Рис.7.3. Динаміка зростання довжини стулки правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріона курки в нормі і після впливу гіпертермією та гіпоксією протягом ембріогенезу (мкм).

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 дозволяє робити певні екстраполяції на кардіогенез людини. Зміна клітинного складу стулок клапанів, порушення процесів міокардіолізації наглядно демонструється порушенням питомої площі стулок передсердно-шлуночкових клапанів (рис. 7.4, 7.5).

Дослідження змін в довжині та питомій площі стулок передсердно-шлуночкових клапанів продемонстрували, 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. Але у всіх випадках структури ембріонального серця, які утримували в собі кардіогель на період впливу гіпоксією чи гіпертермією, змінювались.

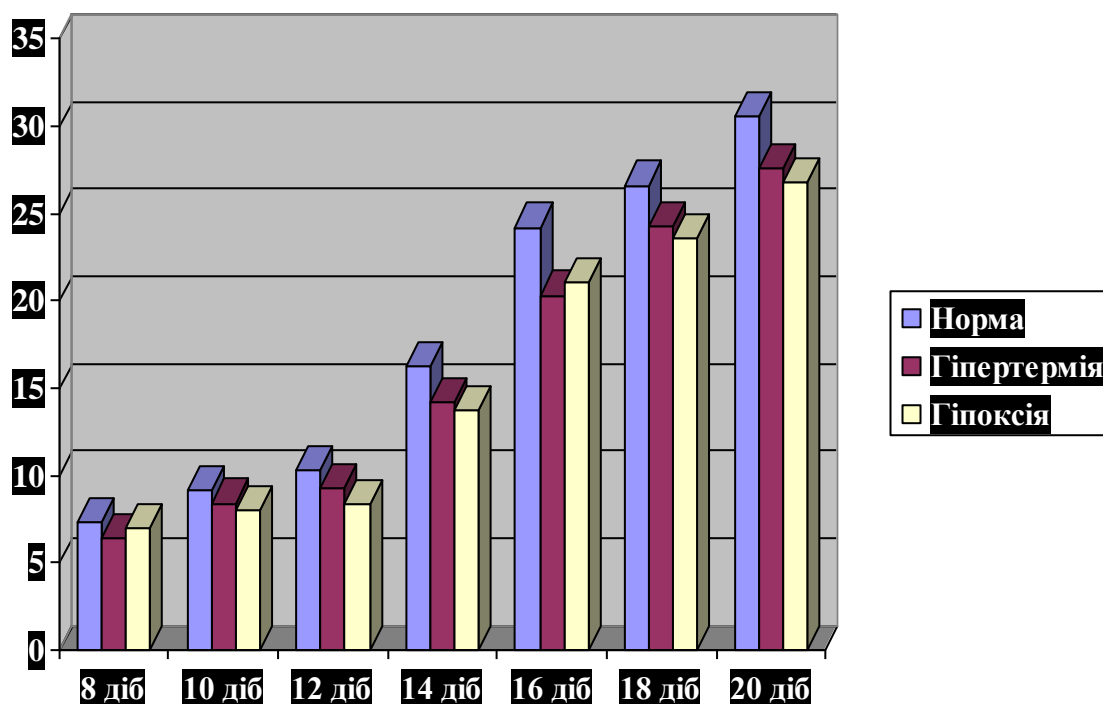


Рис. 7.4. Динаміка зміни питомої площі стулок лівого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріонів щура на етапах кардіогенезу в нормі та після впливу тератогенами.

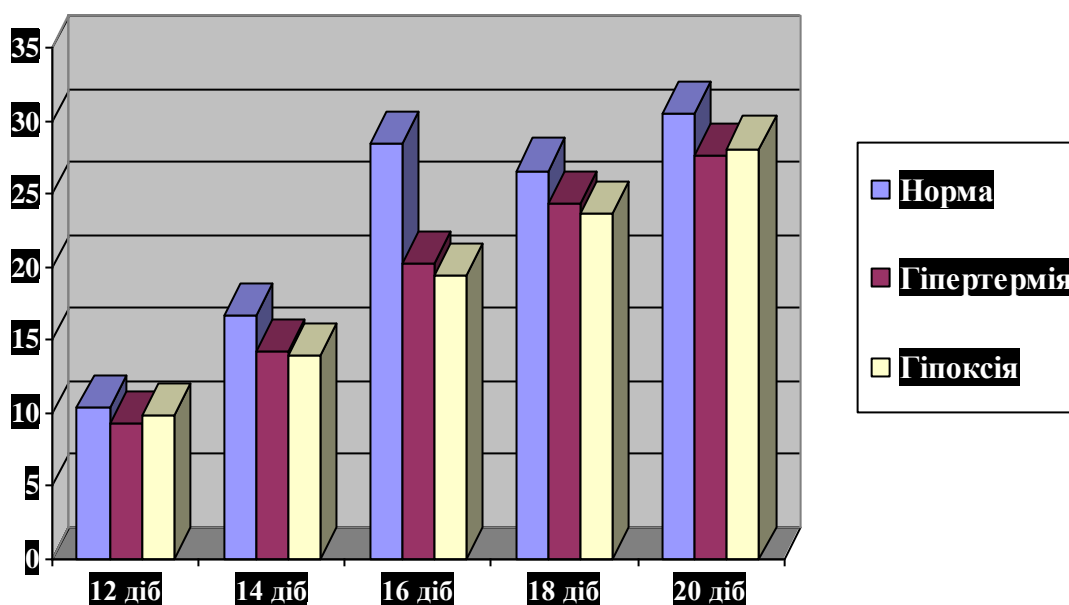


Рис. 7.5. Динаміка зміни питомої площі стулок правого передсердно-шлуночкового клапану серця ембріонів щура на етапах кардіогенезу в нормі та після впливу тератогенами.

Ми вважаємо, що 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 на форму, клітинний склад та довжину стулок передсердно-шлуночкових отворів ембріонів щура та курки.

Спектр вад розвитку міжшлуночкової перегородки, які виникають після впливу гіпоксії та гіпертермії досить широкий, але найбільшим дефектом, який ми спостерігали було збереження міжшлуночкового отвору. Даний дефект відбувався як результат порушення злиття мезенхімної та м'язової частин первинної міжшлуночкової перегородки та призводив до порушень процесу септації серця. Ми пов'язуємо наявність такого дефекту з впливом фізичних чинників на ембріональні структури, що утримують в собі на момент впливу кардіогель, або його залишки. Зміни ЕМТ, що виникають у наслідок впливу на структуру кардіогелю призводять до порушень утворення перегородки у вигляді отвору між шлуночками.

Вплив зазначених тератогенів відзначався на процесах септації також і в тих випадках, коли перегородки були сформовані в необхідний термін. Проте результати проведеного дослідження вказують на зміни морфологічних параметрів перегородок (рис.7.6). Як видно з діаграми вплив гіпоксією та гіпертермією призводить до різних напрямків порушень у формуванні міжшлуночкової перегородки. Якщо гіпоксія призводить до значного потовщення м'язових структур серця і перегородок в тому числі, то гіпертермія достовірно зменшує товщину.

В передсердях ембріонів експериментальної групи ми спостерігали іншу картину впливу на розвиток (рис.7.7). Після дії тератогенів визначався період, коли товщина стінок достовірно зменшувалась незалежно від фактору впливу,

а наприкінці ембріогенезу товщина перебільшувала норму. Неоднозначність впливу на передсердя та шлуночки ми пояснюємо різним походженням камер серця: передсердя є похідним венозного синусу, а шлуночок відразу формується як камера серця.

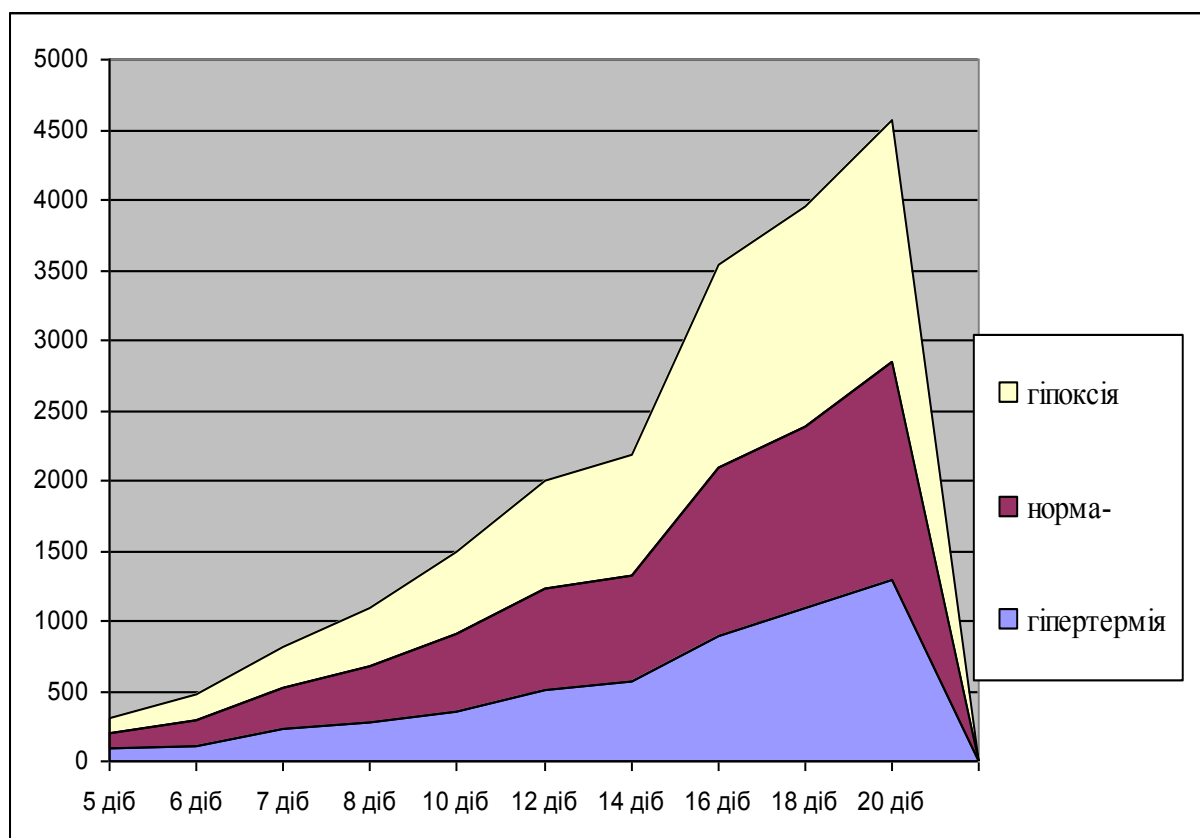


Рис. 7.6. Вплив гіпоксії та гіпертермії на товщину проміжної частини міжшлуночкової перегородки курячих ембріонів протягом ембріогенезу (мкм)

Щодо конусно-стовбурової частини, то наприкінці цього періоду відбувалося зменшення його довжини за рахунок апоптотичних процесів. Перед закінченням септації його довжина зменшувалась у нормальних зародків, в той час як в експериментальній групі збільшувались і довжини і ширина, що свідчить про порушення апоптозу під впливом гіпоксії та гіпертермії. Кількість апоптотичних клітин після злиття атріовентрикулярних

подушок за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж в експерименті. Апоптотичні клітини були добре помітні при використанні маркера 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 великих судин серця, міжшлуночкової перегородці), де виразність апоптозів, навпроти, посилювалася або мала нетипове положення.

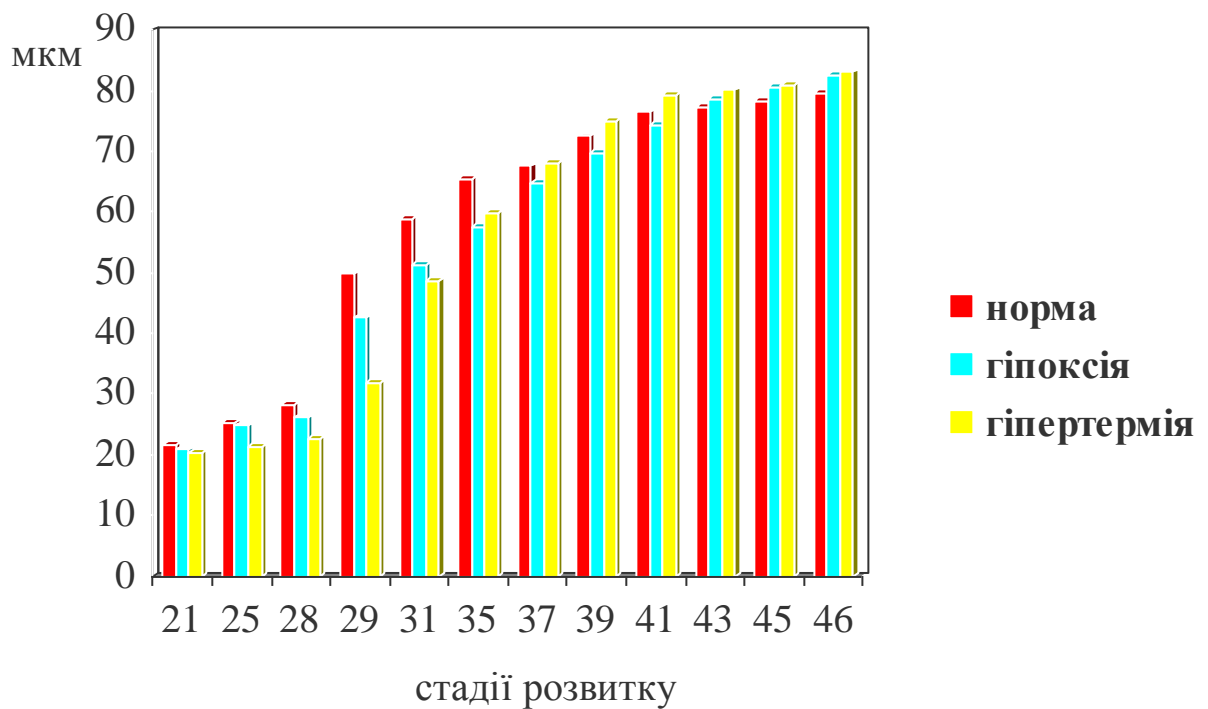


Рис. 7.7. Зміна товщини передсердь ембріонального серця курки під впливом гіпоксії та гіпертермії протягом ембріогенезу (мкм)

Аналізуючи вплив обох факторів на хід розвитку великих судин серця, ми визначали етапи: 1) відокремлення конотрункусу від трубчатого серця, 2)

розподіл загального конотрункусу на аорту та легеневий стовбур та 3) утворення клапанів аорти та легеневого стовбуру. Ми спостерігали в нормі на 7-8-й добі розвитку ембріону щура та 3-4-й добі ембріона курки, що 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. В 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 присутні в конотрункусі, мають таку ж саму форму та вміст, 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 невластиве для нормального кардіогенезу порушення процесу формування крупних 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. Це було підтверджено нашими дослідженнями і відповідає сучасним літературним даним [272, 277, 283, 302, 316]. В наших дослідженнях виявлено, що перед закінченням септації у нормальних зародків (контрольні групи обох видів тварин) довжина конотрункусу зменшувалась, в той час як в експериментальних групах збільшувались його і довжини і діаметр, що свідчить про порушення апоптозу під впливом гіпоксії та гіпертермії. Наслідком таких порушень було збільшення діаметру великих судин серця як у ембріонів курки так і у ембріонів щура незалежно від чинника. Серед

досить великого діапазону вад розвитку найчастіше визначали збільшення діаметру аорти та легеневого стовбуру та на другому місці - вади розвитку стулок півмісяцевих заслінок крупних судин. Ці дані було підтверджено імуногістохімічними дослідженнями на ембріона щура, що теж відповідаю сучасним даним з наукових джерел [156, 171, 193, 198, 200, 215, 217].

Класифікуючи вади формування крупних судин серця та їх клапанного апарату ми визначили основні напрямки аномалій розвитку, що безумовно, призводило до порушення гемодинаміки серця (рис. 7.8). Дані аномалії розвитку зустрічались 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, що ускладнювало класифікацію вад розвитку аорти та легеневого стовбуру.

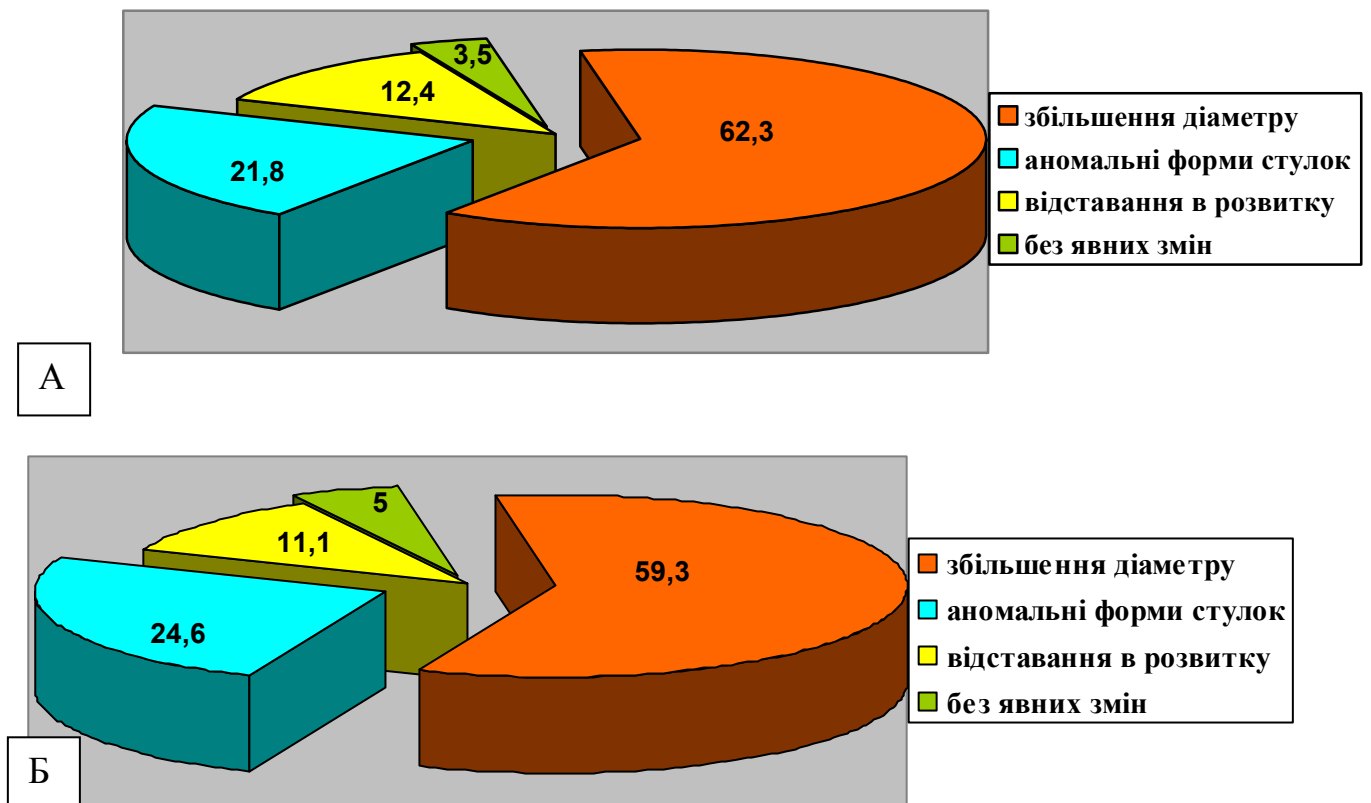


Рис. 7.8. Співвідношення відсотків вад розвитку крупних судин серця ембріонів щура (А) та курки (Б) в експерименті під впливом гіпоксії (%).

Дослідження ранніх етапів формування стулок півмісяцевих заслінок аорти та легеневого стовбуру в нормі та після впливу гіпоксії і гіпертермії показало, що поряд з порушенням формоутворюючих процесів аорти та легеневого стовбуру (збільшення діаметру та довжини) в період ембріогенезу відбувається також зсув співвідношення апоптоз-проліферація, що призводить до формування аномальних за формою стулок заслінок судин.

Досліджуючи вплив гіпоксії та гіпертермії на розвиток всіх структур ембріонального серця ми визначили, що лише у формуванні епікарду та субепікардіальних структур патологічних відхилень майже не зустрічалось. Те аномальні відставання від міокарду або розростання епікарду, що зустрічалися в незначній кількості на ранніх етапах, ми не зустрічали на пізніх стадіях розвитку.

В результаті порівнянь кардіогенезу птахів та щурів, ми винайшли певні етапи розвитку серця, які є обов'язковими та єдиними для цих різних видів тварин. Тобто, можна провести паралелі не за часом розвитку, а за етапами формоутворюючих процесів різних ділянок серця. Цими періодами є наступні етапи раннього кардіогенезу: утворення атріовентрикулярного каналу; закладка та формування ендокардіальних подушок; заселення ЕП мезенхімними клітинами внаслідок епітеліально-мезенхімних трансформацій; делямінація міокарду АВК та шлуночків; злиття закладок МПП та МШП. Аналіз та співставлення за обраними ознаками етапів розвитку серця у щурів та курей показали, що у птахів формування МПП значно випереджає утворення МШП, у щурів різниця у часі утворення не така велика, складає одну добу (табл. 7.1). Таким чином, ми виявили основні не лише часові пункти формоутворюючих процесів раннього ембріонального серця, а й визначили етапи, що є ключовими моментами у ході кардіогенезу. Спільною структурою, що присутня в зазначених структурах на даних етапах розвитку є кардіогель. Саме ця безклітинна речовина, що існує в трубчастому серці досить короткий проміжок часу, є гарантом нормального розвитку серця.

Кардіогель продукується кардіоміоцитами на стадії злиття ендотеліальних трубок та формування трубчастого серця і міститься в ЕП та ендокардіальних гребенях КСВ. Збереження кардіогелю в цих ділянках серцевої стінки сприяє наступним процесам трансформації. Його редукція відбувається при ЕМТ паралельно з утворенням мезенхімних клітин. Всі порушення, що стосуються формування перегородок серця та клапанного апарату, відокремлення аорти та легеневого стовбуру і формування півмісяцевих заслінок відбуваються за участю кардіогелю, або його залишків та мезенхімних клітин. Порушення утворення або редукції цієї речовини призводить до необоротних змін у ході кардіогенезу та формує вади серця.

Таблиця 7.1.

Співставлення основних етапів раннього кардіогенезу піддослідних тварин

Етапи розвитку серця		Ембріони птахів (термін розвитку)	Ембріони щурів (термін розвитку)
Формування ендокардіальних подушок АВК		2 доба інкубації	10 доба ембріогенезу
Заселення ЕП мезенхімними клітинами		3 доба інкубації	12,5 доба ембріогенезу
Початок делямінації АВК та шлуночків		3 доба інкубації	11 доба ембріогенезу
Формування МПП		4,5-5 доба інкубації	11 доба ембріогенезу
Формування МПП	первинна	2-3 доба інкубації	11 доба ембріогенезу
	вторинна	відсутня	12 доба ембріогенезу

Проведене співставлення та визначені паралелі у ході кардіогенезу різних видів піддослідних тварин дозволяють виявити період розвитку серця,

що є критичним моментом для формування більшості структур. Наші дослідження по впливу гіпоксії та гіпертермії підтвердили значущість саме цих ключових моментів розвитку серця. Для визначення механізмів формування вад розвитку серця після впливу гіпоксією і гіпертермією, на ембріонах щура проводили імуногістохімічні дослідження. Для виконання поставленої задачі досліджували більш детально тільки ті структури серця, що утримують кардіогель та підлягають в подальшому трансформації.

7.2. Дослідження критичних періодів в кардіогенезі щура за допомогою методів імуногістохімії

Одним з сучасних методів дослідження, що не набув достатньо широкого використання в медичній ембріології є використання імуногістохімічних методів дослідження основних гістогенетичних процесів. 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 та загибелі. Ми проводили аналіз даних як після впливу гіпертермією так і гіпоксією, що дало можливість співставити результати для визначення терміну найбільшого впливу та порушень основних гістогенетичних процесів.

Однією з важливих проблем біології та медицини є питання про те, як клітини реагують на стрес. Використання маркеру HSP дозволило відстежити накопичення захисного білкового компоненту у тканинах серця. Підвищення температури призводить до змін експресії генів, що індукує 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 [228, 233, 235, 256].

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 [226, 227]. 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 [235, 256].

В наших дослідженнях рівень накопичення маркеру HSP був різним на різних етапах розвитку серця та після впливу фізичними факторами (гіпоксія, гіпертермія). Інтенсивність накопичення маркеру в тканинах раннього ембріонального серця щура (12 діб) після впливу гіпоксією або гіпертермією майже не відрізнялась (рис. 7.9). Ці дані відповідають таким при аналогічних дослідженнях закордонних вчених [227, 228, 233, 247, 256 263, 280].

На цьому етапі розвитку реакція серцевих тканин на зовнішній вплив відбувається однаково, тому, що диференціювання клітин активно протікає і експресія білка регулюється у вигляді загальної відповіді органу.

Наші дослідження показали, що стінка передсердя, шлуночку та атріовентрикулярного каналу накопичувала маркер виразно рівномірно. Відсутність маркеру спостерігалась нами лише в області атріовентрикулярних подушок в тих частинах, де зберігався кардіогель.

На більш пізніх етапах розвитку серця накопичення маркеру було виразно нерівномірним після впливу гіпоксією та гіпертермією. Використання маркеру HSP в серцях ембріонів 17,5 діб 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.

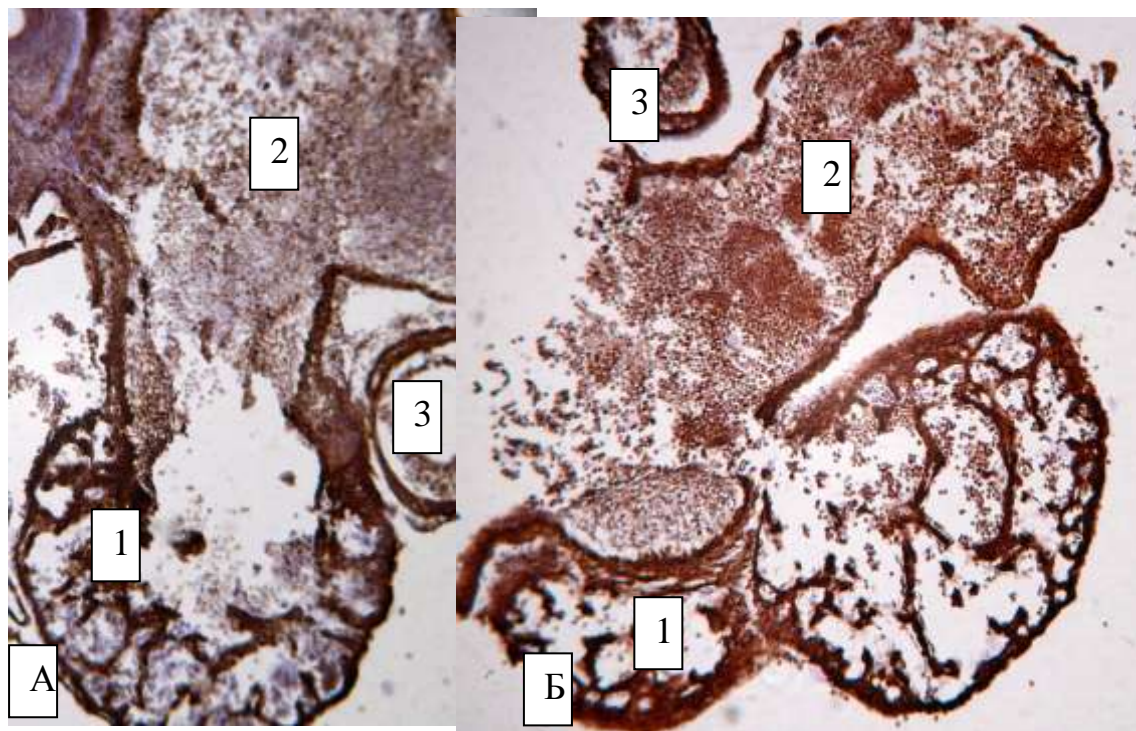


Рис.7.9. Серце ембріона щура 11,5 діб розвитку після впливу гіпоксією (А) та гіпертермією (Б). Накопичення маркеру HSP-70 (коричневий колір). Збільшення: ок.10 X об.10.

Позначення: 1 – шлуночок;

2 – передсердя;

3 – конотрункус.

Використання імуногістохімічного маркеру α -sma, що є маркером гладенької м'язової тканини 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. Ми спостерігали виражено нерівномірне накопичення маркеру у різних відділах серця та його судин в нормі та після впливу тератогенних чинників. В нормі найбільша кількість маркеру α -sma спостерігалась звісно у стінках великих судин серця - аорті та в легеневому стовбурі (рис. 7.30). Цікавим є той факт, що накопичення цього маркеру також продемонструвало, що півмісяцеві заслінки на 17,5 добі розвитку вже мають гладенькі м'язові волокна.



Рис. 7.10. Серце ембріона щура 17,5 діб розвитку після впливу гіпоксією. Накопичення маркеру α -sma (коричневий колір). Збільшення: ок.8 X об.10. Позначення:

- 1 – шлуночок;
- 2 – передсердя;
- 3 – аорта.

Дослідження зрізів у двох взаємно перпендикулярних площинах показало, що заселення ендокардіальних гребенів та півмісяцевих заслінок великих судин серця гладенькими м'язовими волокнами відбувається не хаотично, а таким чином, що утворюється немовби контрактурні тяжі в основі заслінки (рис. 7.11). Гістологічне диференціювання напівмісячних заслінок великих судин у часі випереджає формування стулок передсердно-шлуночкових клапанів, де не спостерігалось накопичення маркера.

Стінка ембріонального передсердя посідає друге місце у накопиченні цього маркера так як саме передсердя є за своїм 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 інтенсивне або менш інтенсивне накопичення маркера (коричневий колір) лише говорить про ступінь диференціювання стінки даної судини.

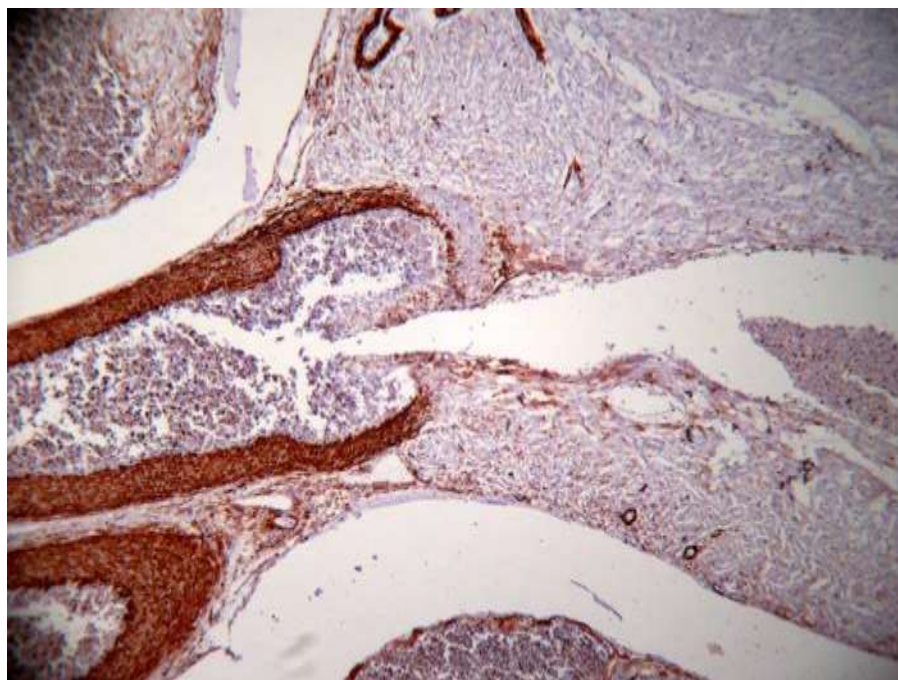


Рис.7.11. Півмісяцеві заслінки аорти серця ембріону щура 17,5 дів розвитку після впливу гіпоксією. Накопичення маркера α -sma має вигляд тяжів в стулках, що формуються (коричневий колір). Збільшення: ок.10 x об.10.

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. Використання маркера α -sma показало, що гіпоксія не тільки підвищує кількість діючих кровоносних судин, але й призводить до раннього диференціювання стінок судин (рис.7.12, 7.13). В міокарді сердець, які перенесли гіпертермію кількість судин та їх ступінь диференціювання істотно не відрізнявся від норми. Ці ж самі висновки підтверджує і накопичення маркера 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 маркера CD34, спостерігалось від 16 до 19 доби пренатального розвитку у компактному та інтратрабекулярному міокарді цей показник збільшувався за цей період у середньому в 3 рази.

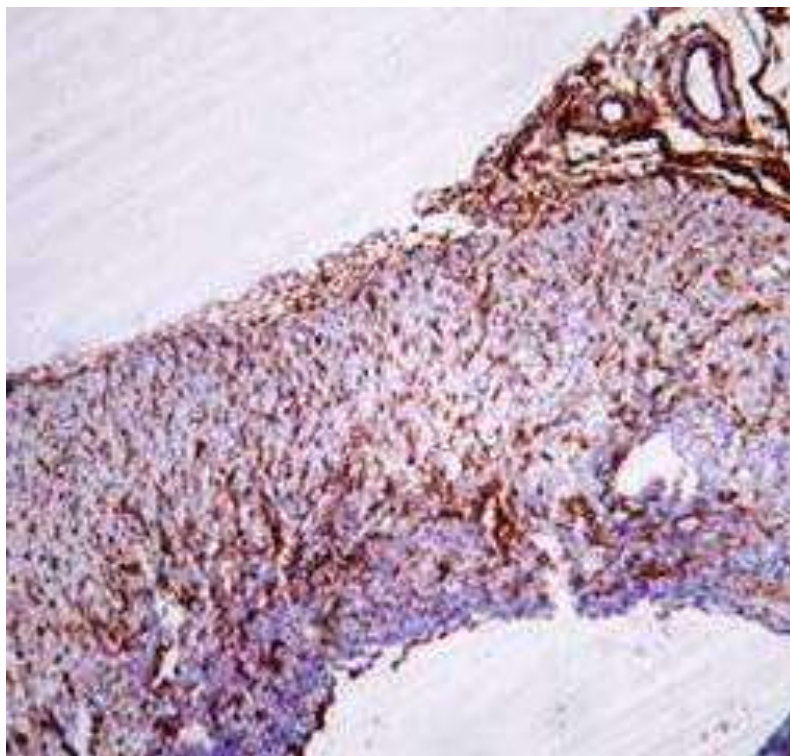


Рис.7.12. Судини стінки лівого шлуночку серця ембріону щура 16,5 діб розвитку після впливу гіпоксією. Збільшення кількості функціонуючих судин. Коричневим кольором (накопиченням маркера CD34) забарвлено ендотелій судин, що формуються. Збільшення: ок.4 X об.10.

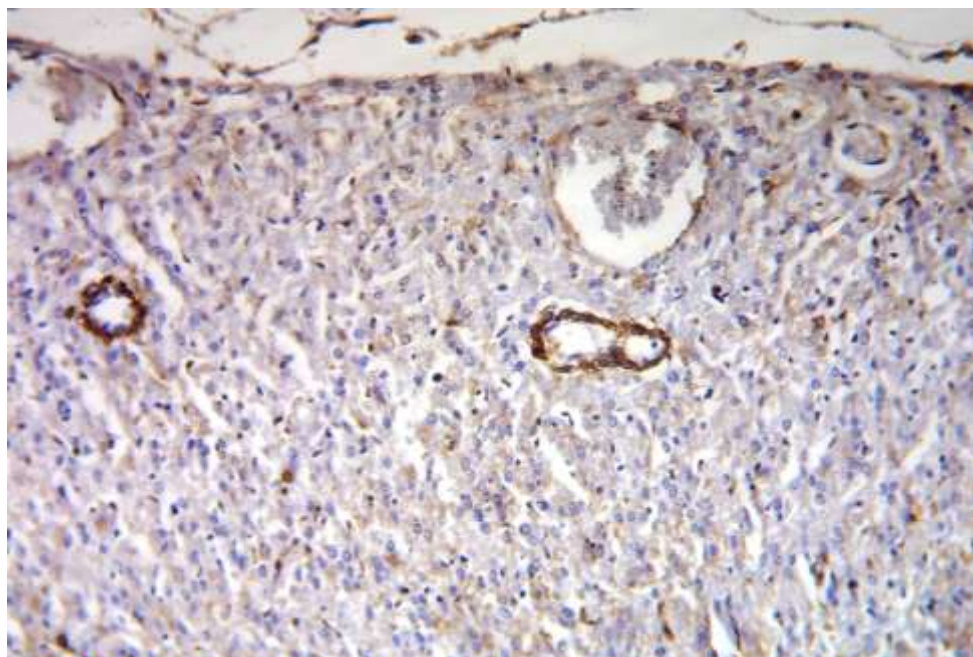


Рис.7.13. Диференціювання стінок судин шлуночку серця ембріону щура 17 діб розвитку після впливу гіпоксією. Коричневим кольором (накопиченням маркера α -sma) забарвлено м'язова частина стінки судин. Збільшення: ок.10 X об.10.

В окремих м'язових структурах шлуночків, таких як трабекули, соскоподібні м'язи, первинні сухожилкові нитки формування судин відбувалось пізніше у порівнянні з судинами компактного міокарду. Ці структури отримують живлення з порожнини шлуночку і потреба в судинах виникає лише при збільшенні обсягу. Утворення судин в трабекулярному шарі та соскоподібних м'язах, як показали наші спостереження, відбувається одночасно і досить рівномірно (7.14). Так як ангиогенез у трабекулах відбувається пізніше ніж у стінках шлуночків, то і вплив гіпоксії і гіпертермії на розвиток судин цих структур не визначався. Таким чином, формування

судин трабекул та соскоподібних м'язів майже не відходило від норми, в той час як судини компактного міокарду реагували на вплив тератогенного чинника.

На початку септації зберігалася істотна різниця у накопиченні маркеру гладком'язової тканини. У ділянках, де атріо-вентрикулярна борозна не була добре розвинена ми спостерігали контакт шлуночкового та передсердного міокарду, що мали різний рівень експресії α -sma .

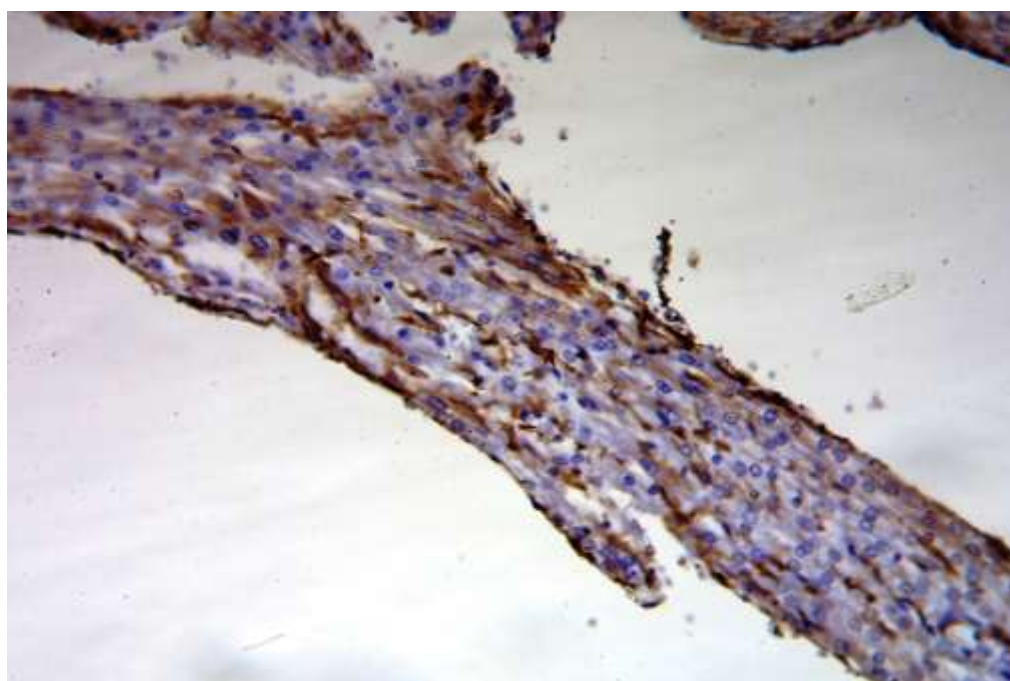


Рис.7.14. Судини трабекули лівого шлуночку серця ембріону щура 17 доби розвитку після впливу гіпоксією. Коричневим кольором (накопиченням маркеру CD34) забарвлено ендотелій судин, що формуються та ендокард. Збільшення: ок.8 X об.10.

Використання маркеру α -sma дозволило простежити деякі особливості формування провідної системи серця. Як, відомо на момент формування трубчастого серця, коли ще відсутня провідна система, функцію передачі імпульсу виконують первинні кардіоміоцити. На етапах септації і

формування передсердно-шлуночкової борозни та розділення міокарду шлуночків та передсердь відбувається закладка гангліїв та пучків провідної системи серця. До періоду утворення цієї системи як єдиного цілого, міокард продовжує виконувати її функцію. Маркер α -sma на ранніх етапах кардіогенезу накопичується в клітинах, які утримують в собі первинні нейрофіламенти. Такі клітини, як і гладенькі м'язові клітини стінки судин помічаються коричневим кольором. Наші дослідження показали, що субепікардіальний шар міокарду шлуночків, трабекулярний шар міокарду та похідні делямінаційної пластинки накопичують даний маркер, а це вказує на наявність в даних структурах нейрофіламентів (рис. 7. 15).

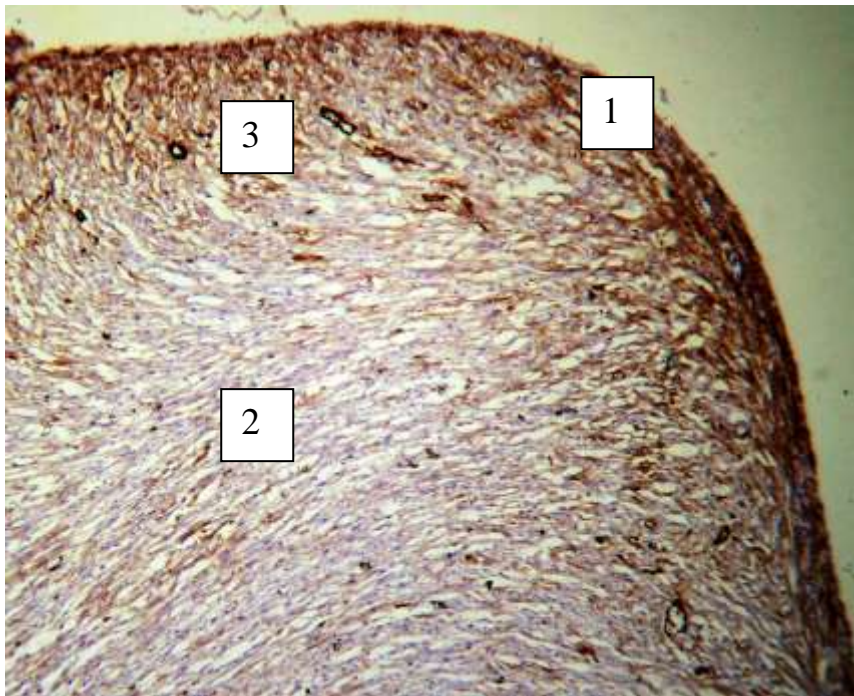


Рис.7.15. Накопичення маркеру α -sma (коричневий колір) в субепікардіальній зоні міокарду верхівки лівого шлуночку та в судинах міокарду серця ембріону щура 17 доби розвитку після впливу гіпоксією. Збільшення: ок.8 X об.10. Позначення:

- 1 – міокард субепікардіальної зони;
- 2 – компактний міокард;
- 3 – судини міокарду.

Накопичення маркера спостерігалось також в трабекулярному міокарді шлуночків. Це свідчить про участь субепікардіального та трабекулярного міокарду у проведенні імпульсу в шлуночках (рис. 7.16). Компактний міокард не приймає участі у передачі імпульсу, а виконує скорочувальну лише функцію.

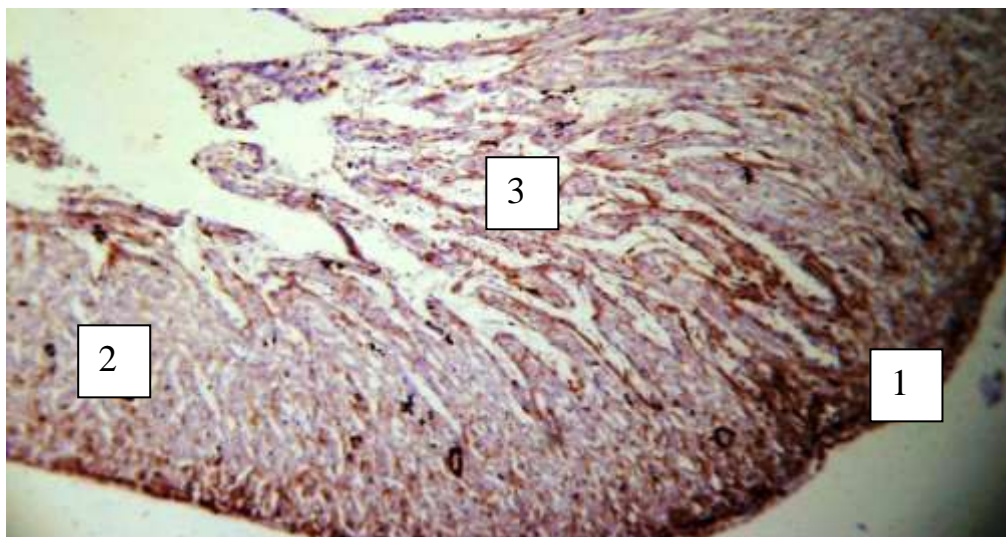


Рис.7.16. Градієнт накопичення маркера α -sma (коричневий колір) в субепікардіальній зоні міокарду лівого шлуночку серця ембріону щура 17 доби розвитку після впливу гіпоксією. Збільшення: ок.8 X об.10.

Позначення:

- 1 – міокард субепікардіальної зони;
- 2 – компактний міокард;
- 3 – трабекулярний міокард.

Внаслідок впливу гіпоксією на ембріонів щура ми спостерігали посилення накопичення маркера α -sma в субепікардіальному та трабекулярному шарах міокарду шлуночків. Вплив гіпертермією не мав таких явних наслідків. Даних в науковій літературі для порівняння цього феномену ми не знайшли.

Завдяки використанню маркера bcl-2 ми досліджували клітинну загибель ембріонального серця щура на ранніх етапах кардіогенезу. Апоптоз -

запрограмована загибель клітин у відповідь на зовнішні або внутрішні сигнали. Апоптоз відбувається під час нормального розвитку, але може бути результатом раку, ВІЛ, відповідною реакцією на зовнішній вплив

Ми реалізували задачу провести порівняльний аналіз експресії антиапоптотичного білка bcl-2 та маркера проліферації клітин Ki-67, що надає змогу вірно трактувати напрямки основних гістогенетичних процесів, які відбуваються в ембріональному серці. Кількість апоптотичних клітин після злиття атріовентрикулярних подушок за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж в експериментах з впливом гіпоксії. Апоптотичні клітини були добре помітні при використанні маркера 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 формуванні 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 з зменшенням кількості апоптозів в експериментальних групах, ми спостерігали в наших дослідженнях неоднозначне розміщення проліферативних центрів. Ядерний маркер Ki67 забарвлював ядра клітин, що знаходяться на різних фазах мітозу у коричневий колір. Мітотичний індекс міокарду був підвищений як після гіпоксії так і після гіпертермії, але локалізація клітин, що поділяються суттєво відрізнялась навіть в рамках експерименту та стадії розвитку.

Чисельність апоптотичних клітин атріовентрикулярних подушок за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж в експерименті з гіпертермією. Вплив гіпоксією призводив до загального зменшення апоптозів міокарду та стінок судин, а вплив високими температурами, навпроти,

призводив до збільшення апоптозу ембріонального серця, що знайшло відображення в роботах [170, 181].

Поряд зі змінами кількості апоптозів в експериментальних групах, ми спостерігали в наших дослідженнях неоднозначне розміщення проліферативних центрів. Використання ядерного маркера Ki67, що мітить клітини на всіх стадіях мітозу показав, що мітотичний індекс міокарду був підвищений після гіпоксії, а після гіпертермії загалом зменшувався, проте локалізація клітин, що поділяються суттєво відрізнялась навіть в рамках одного експерименту та стадії розвитку. Для більш загальної характеристики перебігу 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 достовірно збільшений як в передсердях так і в шлуночках, а після впливу підвищеною температурою – знижений у порівнянні з нормою.

Для дослідження васкулогенезу міокарду, що формується, соскоподібних м'язів, сухожилкових струн серця використовували цитоспецифічний маркер CD-34, внутрішнім контролем постановочних реакцій було накопичення маркера в ендокарді ембріонального серця. Результати дослідження показали, що 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 таких структур клапанного апарату серця, як сухожилкових струн. Виявилось, що процеси ангиогенезу відрізняються в різних частинах делямінаційної пластинки, яка основою для формування первинного соскоподібного м'язу, сухожилкової струни та стулок передсердно-шлуночкових клапанів. В тій частині делямінаційної пластинки, яка кріпиться до стулки передсердно-шлуночкового клапану, накопичення зазначених маркерів майже не відбувалося (рис. 7.17)

Це призводило до погіршення розвитку зазначеної ділянки, її витончення і переходу до стану первинної сухожилкової струни серця. В експериментальних групах обох видів піддослідних тварин незалежно від агенту впливу накопичення цих маркерів майже не відрізнялось від норми. Таке спостереження не суперечить роботам вчених інших держав [270, 281, 287, 294].

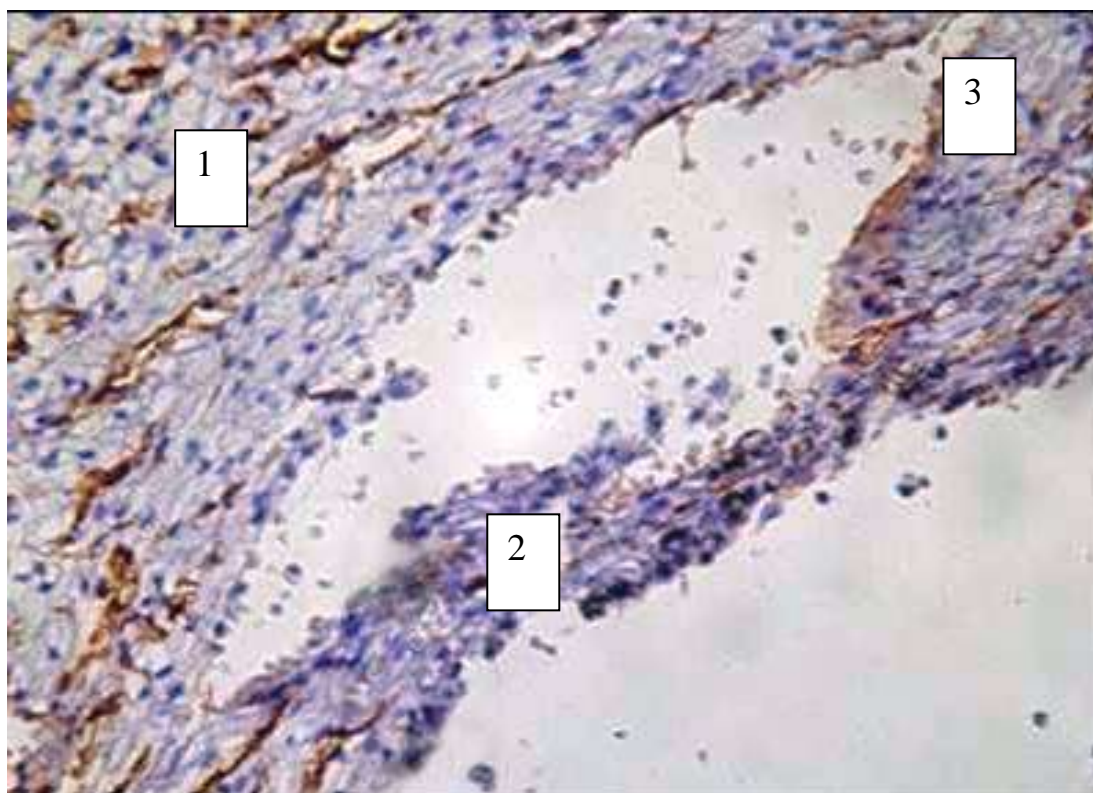


Рис.7.17. Закладка судин в делямінаційній пластині лівого шлуночку серця ембріону щура 16 доби розвитку після впливу гіпоксією. Коричневим кольором (накопиченням маркеру CD34) забарвлено ендотелій судин, що формуються та ендокард. Збільшення: ок.8 X об.10.

Позначення:

- 1 – накопичення маркеру в судинах стінки шлуночку;
- 2 - накопичення маркеру в судинах первинного соскоподібного м'яза;
- 3 - зменшення накопичення маркеру у первинній сухожилковій струні.

Дослідження процесів ангиогенезу та васкулогенезу міокарду камер серця продемонструвало, що перші судини формуються в міокарді шлуночків, а диференціювання клітин відбувається швидше у компактному міокарді [261, 268]. Вплив фізичних факторів на хід кардіогенезу викликав збільшення кількості діючих судин міокарду шлуночків та збільшення діаметру цих судин. Ці дані були підтверджені використанням маркерів α -SMA та CD-34.

Таким чином, використовуючи імуногістохімічні маркери α -SMA, CD-34, Ki67, bcl-2 ми дослідили перебіг основних гістогенетичних процесів серця ембріона щура в нормі та після впливу фізичними факторами у фазі розвитку, що передуює септації і виявили наявність термінаційного періоду кардіогенезу, протягом якого вплив гіпоксії і гіпертермії на хід кардіогенезу максимальний. 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 впливав на формування судин міокарду і викликав вади розвитку великих судин серця. Проліферативно-апоптотичний індекс після впливу гіпоксії достовірно збільшений як в передсердях так і в шлуночках, а після впливу підвищеною температурою – знижений у порівнянні з нормою.

Інтенсивність накопичення маркеру HSP в тканинах раннього ембріонального серця щура продемонструвала, що на стадії раннього диференціювання клітин експресія білка майже не відрізняється в експериментах з гіпоксією та гіпертермією. Відсутність маркеру в області атріовентрикулярних подушок довела, що кардіогель не містить цього білка. Після 12 доби розвитку ембріону накопичення маркеру відрізнялось в різних відділах серця в залежності від діючого агента, що призводило до формування тих чи інших вад серця.

Нерівномірність накопичення маркеру α -sma продемонструвала, що найбільшого ступеню диференціювання сягають судини компактного

міокарду. Гіпоксія не тільки підвищує діаметр та 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.

У зв'язку з тим, що накопичення маркерів проліферації та клітинної загибелі відрізнялися не лише в різні періоди кардіогенезу, але й в різних ділянках серця, ми визначали співвідношення клітин, що знаходяться в будь-якій стадії мітозу до клітин, що накопичують маркер апоптозу. Таке співвідношення характеризувало перевагу проліферації чи загибелі клітин, тобто можна було говорити про напрямок розвитку ділянки. Індекс проліферації (використання маркеру Ki67) та накопичення маркеру bcl-2, а також співвідношення цих показників свідчать про найвищу активність морфогенетичних перетворень в стінках серця на терміні розвитку 9-9,5 доби (10-11 стадія нормального розвитку щура) і істотно відрізняються в різних експериментальних групах. Ми визначили загальний напрямок змін гістогенетичних процесів: вплив гіпертермією посилював апоптотичні процеси, а після впливу гіпоксії збільшувалась інтенсивність проліферативних процесів.

Використання імуногістохімічних маркерів підтвердило, що термінаційним періодом для кардіогенезу щура є 10-11 стадія ембріогенезу. Саме в цей час в ембріональному серці спостерігається установа балансу між основними гістогенетичними процесами: проліферація-апоптоз; васкулогенез-диференціювання, епітеліально-мезенхімні трансформації та процеси септації, а вплив гіпоксією і гіпертермією призводить до порушень цього балансу. Як наслідок цих порушень виникають вади розвитку серця.

Результати дослідження за розділом представлені у публікаціях: 35, 39, 40, 116, 117, 118, 120, 123, 126.

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 та курки ми виділили наступні паралельні етапи формування: закладка міокарду трубчастого серця; утворення ендокардіальних подушок та епітеліально-мезенхімні трансформації; делямінація міокарду шлуночків і атріовентрикулярного каналу та наступна септація; 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 міжшлуночкової перегородки - після впливу гіпертермією, 43,5% після впливу гіпоксією; у ембріона щура – 33,4% дефект міжшлуночкової перегородки 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 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 (11,4%).

4. Всі структури ембріонального серця, що на ранніх етапах кардіогенезу утримують залишки кардіогелю, в наступних стадіях розвитку підлягають виразним морфогенетичним змінам: утворюють стулки клапанів, трабекули міокарду, перегородки серця. Гіпертермія викликала пригнічення проліферації усіх типів клітин, а також порушення розподілу кардіального гелю в атріовентрикулярному каналі, шлуночках і конусностовбуровому відділі та клапанному апараті серця. Одним з механізмів тератогенної дії фізичних факторів є ушкодження міжклітинних контактів ендотелію, що призводить до крововиливів у мезенхімні структури серця та в субендокардіальний простір та порушує базовий процес формування клапанного апарату – ЕМТ. 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 терміні розвитку 9-9,5 доби (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 дозволив виявити термінаційні періоди кардіогенезу, коли спостерігається пряма залежність процесів септації та морфогенезу серця 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 дають змогу удосконалити ембріологічні методичні підходи до вивчення кардіогенезу.
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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абдул-Огли Л.В. Зміна лінійних розмірів серця і структурні особливості серцевої стінки людини в онтогенезі/ Л.В. Абдул-Огли // Вісник морфології. – Вінниця. – 2003. – № 2. – С. 464-468.
2. Абдул-Огли Л. В. Особливості розвитку і будови міжпередсердної та міжшлуночкової перегородок серця людини у віковому аспекті / Л. В. Абдул-Огли // Вісник морфології. — 2004. — № 1. — С. 60—63.
3. Антипов В.Н. Аномалии клапанов и отделов оттока желудочков сердца при желудочково-артериальной дискордантности / В.Н. Антипов, А.Ф. Синев, Г.С. Кирьякулов, Н.В. Антипов // Вісник морфології. - 2007. – Т.13, №2.-С. 330-332.
4. Анатомические особенности аномальных клапанов аорты и легочного ствола в сочетании с пороками камер сердца / В.Н. Антипов, Г.С. Кирьякулов, Н.В. Антипов, М.Г. Руденко, Л.М. Дугадко, А.Ф. Синев // Вісник проблем морфології і медицини. – 2006. – В. 2. – С. 172-174.
5. Автандилов Г. Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Автандилов Г. Г. — М. : Медицина, 1980. — 216 с.
6. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия : руководство / Автандилов Г. Г. — М. : Медицина, 1990. — 384 с.
7. Автандилов Г. Г. Системный стереометрический анализ ультраструктур клеток / Автандилов Г. Г., Невзоров В. П., Невзорова О. Ф. — Кишинев : Штиинца, 1984. — 186 с.
8. Ахтемійчук Ю. Т. Нариси ембріотопографії / Ахтемійчук Ю. Т. – Чернівці : Букрест, 2008. – 200 с.
9. Анатомия сложных врожденных пороков сердца / [Г. С. Кирьякулов, В. А. Васильев, Т. В. Бородий и др.]. — Донецк : КИТИС, 2000. — 330 с.

10. Анатомия сосочковых мышц и сухожильных нитей у плодов / В. А. Козлов, Г. В. Довгаль, В. Ф. Шаторная [и др.] // IV международный конгресс по интегративной антропологии. — Санкт-петербург. — 2002. — С. 171-172.
11. Антипов В.Н. Кровоснабжение проводящей системы при сложных врожденных пороках сердца /В.Н. Антипов, Г.С. Кирьякулов, Н.В. Антипов // Таврический медико-биологический вестник.-2008.- т. 11. - №3, Ч. 2. - С. 59-61.
12. Арчакова Л.И. Морфо-функциональные механизмы реакций симпатических ганглиев на действие температурного фактора и пирогенов / Л.И.Арчакова, И.В.Екимова, В.Н. Гурин // Морфология. -1998.- Т.114, № 6.- С. 31-38.
13. Болезни сельскохозяйственных птиц: Справочник /Сост. А.А. Лимаренко, И.С. Дубов, А.А. Таймасуков и др.- СПб.: Из-во «Лань», 2005.-448с.
14. Белоконь Н. А., Подзолков В. П. Врожденные пороки сердца / Н. А. Белоконь, В. П. Подзолков. — М. : Медицина, 1990. — 352 с.
15. Волянский Ю. Л. Молекулярные механизмы программированной клеточной гибели / Ю. Л. Волянский, Т. Ю. Колотова, Н. В. Васильев // Успехи современной биологии. — 1994. — Т. 114, № 6. — С. 679—682.
16. Гатауллин Н. Г. Наш опыт хирургического лечения дефектов межпредсердной перегородки / Н. Г. Гатауллин, В. Л. Плечев, Т. К. Ильтерьяков // Сердечно-сосудистые заболевания. — Бюлл. НЦССХ им. А. Н. Бакулева. — 2001. — Т. 2, № 6. — С. 17.
17. Горелова Н. И. Иммуногистохимическая характеристика раннего кардиомиогенеза человека / Н. И. Горелова // Вісник морфології. — 2004. — Т. 10, № 2. — С. 242—245.
18. Горелова Н. И. Методы иммуноморфологии в изучении гистогенетических процессов раннего кардиогенеза / Н. И. Горелова, Ю. В. Силкина // Карповські читання : I наук. конф. : тези доп. — Дніпропетровськ, 2004. — С. 15—17.

19. Горелова Н. І. Васкулогенез у міжшлуночкової перегородці на етапах раннього кардіогенезу людини / Горелова Н. І. // Гістологія на сучасному етапі розвитку : науково-практична конференція: тези доп. — Тернопіль, 2004. — С. 18—19.
20. Горелова Н. І. Гістогенетичні механізми септації передсердь у курки / Н. І. Горелова // Весна наукова : 75-ї підсумкова наук. конф. : тези доп. — Дніпропетровськ, 2004. — С. 22—23.
21. Горелова Н. І. Гістогенетичні механізми септації серця у птахів / Н. І. Горелова // Медичні перспективи. — 2004. — Т. ІХ, № 3. — С. 33—35.
22. Горелова Н. І. Иммуногистохимическая характеристика раннего кардиомиогенеза человека / Н. І. Горелова // Вісник морфології. — 2004. — Т. 10, № 2. — С. 242—245.
23. Дони́на Ж.А. Влияние интервальной гипоксической тренировки на ортостатические реакции кардиореспираторной системы / Дони́на Ж.А., Лаврова И.Н., Тихонов М.А. // Бюл.экспер. биол. и мед. 2008.-Т.145, №6.- С.604-607.
24. Дубровская Н.М. Влияние пренатальной гипоксии на развитие крыс в постнатальном онтогенезе / Дубровская Н.М., .Потапов Д.О, Туманова Н.Л.//Вестник молодых ученых.-2002.-Т.4 .-СЕРИЯ: Науки о жизни. С.9—15.
25. Знаменська О.С. Деякі клініко-експериментальні аспекти патогенезу, діагностики і лікування перинатальних асфіксій у новонароджених / О.С.Знаменська, В.І.Похилько, О.М. Ковальова // Онтогенез.- №7.- 2007.- с.47-58.
26. Дядичкина Л. Ф. Пособие по биологическому контролю при инкубации яиц с.-х. птицы / Дядичкина Л. Ф., Познякова Н. С., Главатских О. В. — МНПО «Племптица», ВНИТИП.- Сергиев Посад, 2004. — 83 с.
27. Закладка папиллярных мышц и сухожильных нитей сердца в раннем эмбриогенезе / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторная, Г. В. Довгаль [и др.] //

- Україна наукова : Перша Всеукр. наук.-практич. конф. : тези доп. — Дніпропетровськ, 2001. — С. 17—18.
28. Жаріков М.Ю. Особливості впливу експериментальної коарктації аорти на стан міокарда і секреторних компонентів серця щурів / М.Ю. Жаріков, В.В.Кошарний, О.Г. Козловська // Таврический медико-биологический вестник.- 2006.- Т. 9, № 3, Ч 1.- С. 58 - 60.
29. Инкубация яиц сельскохозяйственной птицы : методические рекомендации / Фисинин В. И., Дядичкина Л. Ф., Голдин Ю. С. ; под общ. ред. В.И. Фисинина; ВНИТИП. — Сергиев Посад. — 2005. — 120 с.
30. Інкубація яєць сільськогосподарської птиці: методичний посібник / [В.О.Бреславець та ін.]. — Харків, 2001. — 92с.
31. Иваницкая Н.Ф. Методика получения разных стадий гемической гипоксии у крыс введением нитрита натрия / Н.Ф. Иваницкая // Патол. физиол. и exper. терапия. —1976. —№3. —С. 69-71.
32. Караськов А. М. Хирургические технологии при врожденном двухстворчатом аортальном клапане / А. М. Караськов, С. И. Железнев, А. Л. Чернявский // Сердечно-сосудистые заболевания. — Бюлл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. — 2001. — Т. 2, № 6. — С. 10.
33. Кирьякулов Г. С. Клиническая анатомия сердца детей в норме и при врожденных дефектах межжелудочковой перегородки / Г. С. Кирьякулов, В. А. Васильев. — Донецк, 1997. — 235 с.
34. Кирьякулов Г. С. Морфометрия сердца в норме / Кирьякулов Г. С., Яблучанский Н. И., Шляховер В. Е. — К. : Вища школа, 1990. — 152 с.
35. Клинико-морфологические параллели в развитии сердца в пренатальном онтогенезе / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторная, Л. В. Абдул-Огли, Е. А. Савенкова // Таврический медико-биологический вестник : IV Національний конгрес АГЕТ України : тези доп. — Сімферополь. — 2006. — Т. 9, № 3. — С. 87—90.

36. Копнин Б.П. Механизмы действия онкогенов и опухолевых супрессоров / Б.П. Копнин // НИИ канцерогенеза: Российский онкологический научный журнал (РАМ).- 2002.- № 4.- С. 123-145.
37. Клінічна анатомія сухожилкових струн серця / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна, В. Г. Дзяк, О. О. Шевченко // Вісник морфології. — Вінниця. — 2004, № 1. — с. 80—83.
38. Козлов В. А. Анатомия сосочковых мышц и сухожильных нитей у плодов / В. А. Козлов, Г. В. Довгаль, В. Ф. Шаторная // Мат-лы IV Междунар. конгр. по интегративной антропологии.- С.-П., 2002.- С.171-172.
39. Козлов В. А. К вопросу происхождения сухожильных нитей сердца / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. - Полтава. — 2002. — № 3. — С. 71—73.
40. Козлов В. А. Особенности развития отдельных структур сердца в пренатальном онтогенезе / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. — Полтава. — 2003, № 3. — С. 82—84.
41. 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.
42. Козлов В. А. Развитие сердца в пренатальном онтогенезе / В. А. Козлов, Т. В. Кулемзина, В. Ф. Шаторная // Актуальные проблемы медицины. Днепропетровск, 2002. — С. 8—9.
43. Козлов В. О. Морфогенез зовнішньої та внутрішньої будови серця протягом філо- та онтогенезу / В. О. Козлов, С. Б. Крамар, В. Ф. Шаторна // Карповські читання : I Всеукраїнська наукова конференція, 18-21 травня 2004 р. : тези доп. — Дніпропетровськ, 2004. — С. 26—30.
44. Козлов В. О. Морфогенез клапанного апарату серця / Козлов В. О., Шаторна В. Ф. // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики : науково-практ. конференція морфологів, 19-20 вер. 2003 р. : тези доп. — Запоріжжя, 2003. — Вип. ІХ. — С. 251—256.

45. Козлов В. О. Папілярно-трабекулярний апарат серця ембріона людини / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. — 2004. — № 4. — С. 89—91.
46. Козлов В. О. Сухожилкові струни серця : навчально-методичний посібник / В. О. Козлов, В. Г. Дзяк. — Дніпропетровськ : Ліра. — 2006. — 128 с.
47. Козлов В. О. Формоутворення структурних компонентів серця в нормі та при моделюванні вад розвитку / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна, О. О. Савенкова // Вісник наукових досліджень. — 2006. — № 3. — С. 106—108.
48. 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.
49. 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. — С. 282—284.
50. Костиленко Ю. П. Форма и рельеф внутренней поверхности камер сердца человека в гемодинамическом аспекте / Ю. П. Костиленко, А. Ю. Костиленко, Е. А. Девяткин // Российские морфологические ведомости. — 2000. — № 1—2. — С. 212—214.
51. Крутов А. О. Опыт лечения новорожденных детей 1-го года жизни с атрезией легочной артерии и интактной межжелудочковой перегородкой / А. О. Крутов, В. В. Чечнева, О. Н. Ильина // Сердечно-сосудистые заболевания. — Бюлл. НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. — 2001. — Т. 2, № 6. — С. 10.
52. Круцяк В. М. Значення ембріологічних досліджень на сучасному етапі розвитку морфологічної науки / В. М. Круцяк, В. І. Проняєв, Ю. Т. Ахтемійчук // Буковинський медичний вісник. — 1998. — Т. 2, № 1. — С. 3—7.
53. Круцяк В. Н. Эмбриотопографические приемы в исследовании врожденной патологии / В. Н. Круцяк, В. П. Пишак, Б. Г. Макар // Тез. докл. IX съезда анат., гистол., эмбриол.- Полтава, 1992.- С. 123.

54. Кудряшов В. П. Сравнительно-анатомическая характеристика клапанного аппарата сердца человека и некоторых животных / В. П. Кудряшов, Н. Н. Белов, И. А. Раменский // Морфологические науки – практической медицине и биологии : науч. конф. : тез. докл. — Омск. — 1986. — С. 53—54.
55. Кузьмина Н.Б., Городкова А.Ю. Морфометрия сердца. // Сборник докл. — М. — 1996. — С 45-46.
56. Кульчицкий К. И. Клапаны сердца / Кульчицкий К. И., Соколов В. В., Марущенко Г. Н. — К. : Здоров'я, 1990. — 182 с.
57. Лакин Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов [4-е изд., переработанное и дополненное] / Лакин Г. Ф. — М. : Высшая школа, 1990. — 352 с.
58. Леонтюк А. С. Информационный анализ в морфологических исследованиях / Леонтюк А. С., Леонтюк Л. А., Сыкало А. И. — Минск : Наука и техника, 1981. — 159 с.
59. Леонтюк А. С. Информационный анализ как метод исследования структуры биологических объектов / А. С. Леонтюк, Е. В. Барковский, Б. В. Лысый // Теория информации в медицине. — 1974. — С. 77—97.
60. Машталір М. А. Роль вітаміна А і його производних в формуванні вроджених пороков серця / М. А. Машталір // Вісник морфології. — 2000. — Т. 6, № 2. — С. 350—354.
61. Машталір М. А. Перебудова атріовентрикулярного каналу у курячого зародка у нормі та при порушеннях розвитку серця під впливом етанолу / М. А. Машталір // Медичні перспективи. — 2004. — Т. IX, № 3. — С. 20—23.
62. Машталір М. А. Ранні зміни у формуванні серця курячого зародка під впливом етанолу / М. А. Машталір, Ю. В. Сілкіна, І. В. Твердохліб // Медичні перспективи. — 2002. — Т. 7, № 2. — С. 30—33.

63. Машталір М. А. Розвиток конусно-стовбурового відділу серця у зародка миші у нормі та під впливом етанолу / М. А. Машталір // Медичні перспективи. — 2005. — Т. X, № 3. — С. 6—10.
64. Машталір М. А. Розвиток передсердно-шлуночкового з'єднання при порушенні розвитку серця курячого зародку дією етанолу // Актульні питання морфології: Наукові праці III національного конгресу анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України. Київ, 21-23 жовтня 2002 р. / Під ред. Ю.Б.Чайковського.- Тернопіль: Укрмедкнига, 2002.- С. 204-205.
65. Машталір М. А. Розвиток шлуночків серця курей в нормі і при порушеннях розвитку під впливом етанолу / М. А. Машталір // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2004. — № 2. — С. 23—25.
66. Машталір М. А. Формоутворення атріовентрикулярних подушок у курей у нормі і при дії ретиноєвої кислоти / М. А. Машталір // Медичні перспективи. — 2004. — Т. IX, № 4. — С. 17—21.
67. Машталір М. А. Розвиток серця мишачих та курячих зародків на кінцевих етапах септації після впливу етанолу / Карповські читання : III Всеукраїнська морфол. наук. конф., 11-14 квітня 2006 р. тези доп. — Дніпропетровськ, 2006. — С. 40—41.
68. Машталір М. А. Формування атріовентрикулярного каналу курячого зародка під впливом ретиноєвої кислоти / М. А. Машталір // Роль імунної, ендокринної та нервової систем в процесах морфогенезу та регенерації : наук.-практ. конф. морфологів, 19-20 вер. 2003 р. : тези доп. — Запоріжжя, 2003. — С. 276—283.
69. Машталір М. А. Формування епікарда курячого зародка в нормі і при порушенні кардіогенезу дією етанолу / М. А. Машталір, В. Ф. Шаторна, І. В. Твердохліб // Медичні перспективи. — Дніпропетровськ, 2003. — Т. VIII, № 1. — С. 43—46.

70. Машталір М. А. Формування конусно-стовбурового відділу серця у мишачих та курячих зародків під впливом ретиноевої кислоти / М. А. Машталір // Медичні перспективи. — 2006. — № 1. — С. 8—12.
71. Морфологическое исследование сердца у плодов с хромосомными болезнями, абортированных после пренатальной диагностики в 1 триместре беременности / И. В. Новикова, Г. И. Лазюк, О. В. Прибушения [и др.] // Пренатальная диагностика. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 197—201.
72. Мутафьян О. А. Врожденные пороки сердца у детей / Мутафьян О. А. — Санкт-Петербург, 2002. — 210 с.
73. Непомнящих Л. М. Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце / Непомнящих Л. М. — Новосибирск : Наука, 1991. — 314 с.
74. Нормальний кардіогенез та вплив деяких тератогенних факторів на розвиток серця: електронний науковий журнал Всеукраїнської громадської організації «Наукове товариство анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України» [Електронний ресурс] / В. О. Козлов, В. Ф. Шаторна, М. А. Машталір // Морфологія — 2007. — Том I. — № 3. — С. 7—15.
75. Нуджент Э. В. Врожденные пороки сердца / Э. В. Нуджент // Клиническая кардиология. — 2000. — С. 259—286.
76. Объекты биологии развития / [под ред. Б. Л. Астаурова]. — М. : Наука, 1975. — 580 с.
77. Орлов М. В. Биологический контроль в инкубации : под общ. ред. И. П. Кривопишина. — [3-е изд., перераб. и доп.] / Орлов М. В. — М. : Россельхозиздат, 1997. — 123 с.
78. Особенности строения клапанного аппарата сердца / В. А. Козлов, В. Ф. Шаторная, Е. С. Зозуля, А. А. Козловская // Вісник морфології. — Вінниця. — 2003. — Т. 9. — № 3. — С. 163—165.
79. Особенности строения трабекулярного отдела желудочковых камер в норме и при врожденных пороках сердца / В. А. Васильев, Н. В. Житинева,

- Л. В. Васильева, Г. С. Кирьякулов // Актуальні питання морфології : III національний конгрес анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України, 21-23 жовтня 2002 р : тези доп. — Тернопіль, 2002. — С. 46—47.
80. Особливості будови серця з єдиним передсердям у плода людини / Б. Г. Макар, Т. В. Хмара, Ф. Д. Марчук, Г. М. Халатурник // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 23—25.
81. Особливості будови серця з єдиним передсердям у плода людини / Б. Г. Макар, Т. В. Хмара, Ф. Д. Марчук, Г. М. Халатурник // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 23—25.
82. Открытый предсердно-желудочковый канал / [Гусак В. К., Васильева Л. В., Кирьякулов Г. С. и др.]. — Донецк : ООО "Лебедь", 2001. — 184 с.
83. Отрыганьев Г. К. Болезни эмбрионов птиц / Отрыганьев Г. К., Бессарабов Г. К., Исаев Ю. В. — М. : Россельхозиздат, 1981. — 136 с.
84. Отрыганьев Г. К. Рекомендации по диагностике причин эмбриональной смертности сельскохозяйственной птицы / Отрыганьев Г. К., Исаев Ю. А., Дядичкина Л. Ф. — ВНИТИП. — Загорск, 1982. — 34с.
85. Папиллярно-трабекулярный аппарат при отсутствии межжелудочковой перегородки / С. А. Чередник, Г. С. Кирьякулов, Е. В. Жданов [и др.] // Буковинський медичний вісник. — 2001. — Т. 5, № 3—4. — С. 105—107.
86. Пластическая коррекция недостаточности атриовентрикулярного клапана, сопутствующей ДМЖП у грудных детей / Ильин В. Н., Виноградов А. В., Вершивши Д. О., Ильина О. Н. // Сердечно-сосудистые заболевания. — Бюлл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. — 2001. — Т. 2, № 6. — С. 9.
87. Плохинский Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский — М. : Наука, 1970. — 368 с.
88. Потоцкая О. Ю. Локализация процессов апоптоза в сердце куриного эмбриона на 4-5-е сутки инкубации / О. Ю. Потоцкая // Карповські читання : II Всеукраїнська морфол. наук. конф., 12-15 квітня 2005 р. : тези доп. — Дніпропетровськ, 2005 — С. 44—45.

89. Пастухов Ю.Ф. Основной белок стресса обладает пирогенным действием / Ю.Ф.Пастухов, И.В. Екимова, И.В. Гужова // ДАН. 2003. Т. 388. № 6. С. 837-841.
90. Пастухов Ю.Ф. Адаптация к холоду и условиям Субарктики: проблемы термофизиологии. / Ю.Ф.Пастухов, А.Л.Максимов, В.В. Хаскин // Т.1. Магадан: СВНЦ ДВО РАН. -2003.- 373 с.
91. Прокудина Н. А. Методы биологического контроля в инкубации / Прокудина Н. А., Артеменко А. Б., Огурцова Н. С. ; под общ. ред. Ю. А. Рябокопя. — Борки, 2006. — 107с.
92. Пастухов Ю.Ф. Явление сезонного гипометаболизма млекопитающих / Ю.Ф. Пастухов // Термофизиология. -Вып.2. Минск.- 1991.- С. 7-18.
93. Пастухов Ю.Ф. Классификация организмов по типу терморегуляции. Эволюция представлений /Ю.Ф. Пастухов // Термофизиология. - Вып.3.- Минск.- 1994.- С. 6-17.
94. Піскун Р.П. Стан судинного русла головного мозку при експериментальній дисліпопротеїдемії / Р.П. Піскун, С.М. Горбатюк // Вісник Вінницького національного медичного університету. - 2005. - №2. - С.360 - 361.
95. Сілкіна Ю. В. Гістогенетичні процеси в ранньому кардіогенезі людини / Ю. В. Сілкіна // Вісник проблем біології і медицини. — 2004. — № 4. — С. 78—84.
96. Слоним А.Д. Физиология животных в различных физико-географических зонах. /А.Д.Слоним, В.П. Галанцев, А.Ф.Давыдов, Ю.Ф. Пастухов и др. // Экологическая физиология животных. Ч. 3. Л.: Наука. 1982.- 504 с.
97. Сілкіна Ю. В. Порівняльна характеристика перетворень архітектури міокарду в ранньому серці у представників хребетних / Ю. В. Сілкіна // Карповські читання : II Всеукраїнська морфол. наук. конф., 12-15 квітня 2005 р. тези доп. — Дніпропетровськ, 2005. — С. 55—57.
98. Седунова Е.В. Влияние температуры окружающей среды на суточные ритмы температуры тела и двигательной активности у снегирей / Е.В. Седунова, А.Ф. Давыдов // Орнитология.- 1998. -Т. 24. -С. 54-58.

99. Сілкіна Ю. В. Вплив ендогенних патологічних чинників на гістогенетичні процеси в міокарді / Ю. В. Сілкіна, Н.І. Горелова // Карповські читання : III Всеукраїнська морфол. наук. конф., 11-14 квітня 2006 р. тези доп. — Дніпропетровськ, 2006. — С. 45—47.
100. Скрипников Н. С. О современных методических подходах к планированию научных исследований по изучению воздействия неблагоприятных факторов внешней среды на организм человека / Н. С. Скрипников // Научно-техн. прогресс, окруж. среды, фундам. пробл. мед. и биол. : обл. науч.-практ. конф. : тезисы докл. — Полтава, 1988. — С. 31—32.
101. Ташкэ К. Введение в количественную цитогистологическую морфологию / Ташкэ К. — Изд. академии социалистической республики Румынии, 1980. — 192 с.
102. Сухова Г.К. Неонатальная интермиттирующая гипоксия ускоряет развитие возрастных нарушений барорефлекторной чувствительности и variability сердечного ритма / Г.К.Сухова, А.Д. Ноздрачев // Докл. АН.- 2008. - Т.420, № 3. – С.421-423.
103. Твердохлеб И. В. Данные ультраструктурной стереометрии о развитии сократительного аппарата кардиомиоцитов в аспекте периодизации пренатального онтогенеза человека / И. В. Твердохлеб // Вестник проблем современной медицины. — 1996. — Вып. 8. — С. 135—138.
104. Твердохлеб И. В. Математические аспекты анализа гетероморфии И. В. Твердохлеб // Вестник проблем современной медицины. — 1994. — № 5. — С. 37—45.
105. Топографо-анатомические особенности строения проводящей системы сердца собаки / Н.В.Антипов, М.Г.Руденко, Л.М. Дугадко [и др.] // Российские морфологические ведомости. - 2000. -№ 1-2. - С. 171-173.
106. Твердохлеб И. В. Прикладная биометрия для морфолога / Твердохлеб И. В., Шпонька И. С., Машталир М. А. — Днепропетровск, 1996. — 226 с.

107. Рыбникова Е.А. Перспективы использования гипоксического прекондиционирования для профилактики и лечения постстрессовых патологий / Е.А.Рыбникова, В.И.Миронова, М.О. Самойлов // Физиологическое общество им.И.П.Павлова.Съезд XX,4-8 июня 2007 г. - .,Москва:Тезисы докл.-М.:Издат.дом"Русский врач".- 2007.-С.81.
108. Рыбникова Е.А. Возможности использования гипоксического прекондиционирования для профилактики постстрессовых депрессивных эпизодов / Е.А.Рыбникова, М.О.Самойлов, В.И.Миронова и др. // Журн. неврол.и психиатрии.2007.-Т.107,№7.- С.43-48.
109. Тератология человека / [под ред. Г. И. Лазюка]. — М. : Медицина, 1991. — 232 с.
110. Тятенкова Н. Н. Периодизация пренатального онтогенеза млекопитающих / Н. Н. Тятенкова // Российские морфологические ведомости. — 2000. — № 1—2. — С. 137—141.
111. Федосеев В. А. Морфологические показатели различных слоев миокарда крыс в ранние сроки становления гипертрофии миокарда / В. А. Федосеев, Е. Б. Лошакина, И. А. Ионина // Бюлл. exper. биол. — 1992. — № 2. — С. 210—211.
112. Формирование пространственной структуры эмбрионального миокарда млекопитающих / С. Б. Крамарь, В. Ф. Шаторная, М. А. Машталир [и др.] // Актуальні питання морфології. — 1998. — С. 148—150.
113. Хилькин А. М. Моделирование поражений сердца и сосудов в эксперименте / А. М. Хилькин, В. Л. Светлов. — М. : Медицина, 1979. — 424 с.
114. Хирургическое лечение пороков аортального и митрального клапанов у детей / Дюжиков А. А. , Кислицкий А. И. , Устинова И. О. , Живова Л. В. // Мат-лы II съезда кардиологов Южного федерального округа. - Ростов-на-Дону. – 2002. – С. 182-183.

115. Хлопонин П. А. Процессы кардиогенеза в зародышевом периоде развития человека / П. А. Хлопонин, О. Ю. Панченко // Морфология. — 2003. — № 1. — С. 50—54.
116. 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. 135—139.
117. Шаторна В.Ф. Вплив гіпоксії та гіпертермії на розвиток передсердно-шлуночкових клапанів / В.Ф.Шаторна // Загальна патологія та паталогічна фізіологія.- 2008.-вип.4.- С. 86-91.
118. 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. 156—159.
119. 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. — 2006, Вип. 8. — С. 239.
120. 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. — № 2. — С. 130—136.
121. Шаторна В. Ф. Гіпоксія як тератогенний фактор кардіогенезу курки / В. Ф. Шаторна // Карповські читання : III Всеукраїнська наук. конф., 12-14 квітня 2006 р. — Дніпропетровськ. — 2006. — С. 74—75.
122. Шаторна В. Ф. Критичні періоди кардіогенезу щура / В. Ф. Шаторна, В. В. Кошарний // Вісник наукових проблем. — 2008. — Вип. 3. — С. 123—127.
123. 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. — № 10. — С. 143—145.
124. 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 травня 2007р., Тернопіль. — 2007. — С. 89—91.
125. 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—241.
126. Шаторна В. Ф. Результати впливу гіпертермії та гіпоксії на морфогенез ембріонів курки та щура / В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. — 2008. — Вип. 4. — С. 135—139.
127. 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—118.
128. Шаторна В. Ф. Формування папілярно-трабекулярного апарату серця в ранньому ембріогенезі людини / В. Ф. Шаторна // Карповські читання : II Всеукраїнська наук. конф., 12-15 квітня 2005 р. : тези доп. — Дніпропетровськ, 2005. — С. 75—77.
129. Шаторна В. Ф. Формування папілярно-трабекулярного апарату серця в ембріогенезі курей / В. Ф. Шаторна, В. О. Козлов, М. А. Машталір // Український морфологічний альманах. — 2003. — Т. 1, № 2. — С. 39—41.
130. Шаторная В. Ф. Влияние гипертермии на морфогенез куриных эмбрионов / В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. — 2005. — Вип. 3. — С. 135—140.
131. Шаторная В. Ф. Влияние гипертермии на морфогенез эмбриона крысы / В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. — 2008. — Вип. 1. — С. 179—182.
132. 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. 146—149.
133. Шаторная В. Ф. Влияние гипертермии на ход эмбриогенеза крысы / В. Ф. Шаторная // Сучасні проблеми патологічної анатомії : VIII міжнародний конгрес патологів України : тези доп. — Полтава. — 2008. — С. 47.

134. Шаторная В. Ф. Влияние гипоксии и гипертермии на морфогенез куриного эмбриона / В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. — 2005. — № 4. — С. 156—161.
135. Шаторная В. Ф. Вплив гіпоксії на кардіогенез курячого зародка / В. Ф. Шаторная // Вісник проблем біології і медицини. — 2006. — № 1. — С. 136—142.
136. Шаторная В. Ф. Формирование клапана в правом предсердно-желудочковом отверстии сердца в эмбриогенезе кур / В. Ф. Шаторная // Вісник морфології. — 2002. — № 1. — С. 119—120.
137. Шаторная В. Ф. Формирование предсердно-желудочковых клапанов сердца в кардиогенезе птиц / В. Ф. Шаторная, С. Б. Крамарь // Актуальные проблемы медицины. — 2002. — С. 22—23.
138. Шаторная В. Ф. Формирование эндокардиальных подушек сердца на этапах раннего эмбриогенеза птиц / В. Ф. Шаторная // Буковинський медичний вісник. — 2002. — № 2. — С. 132—134.
139. Шевчук Ю.Г. Вплив загальної вертикальної вібрації на морфологію серця інтактних і вагітних щурів та їх потомство : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.01 „Нормальна анатомія” / Ю. Г. Шевчук. — Х., 2000. — 19 с.
140. Шорманов С. В. Миокард и венечное артериальное русло у детей с врожденными пороками сердца / С. В. Шорманов // Педиатрия. — 1996. — № 3. — С. 26—29.
141. Шпонька И. С. Гистогенетические механизмы и динамика процесса гибели кардиомиоцитов в нормальном кардиомиогенезе млекопитающих / И. С. Шпонька // Вестник проблем современной медицины. — 1996. — Вып. 11. — С. 115—118.
142. Шпонька И. С. Гистогенетические процессы в развивающемся миокарде млекопитающих / Шпонька И. С. — Днепропетровск : Пороги, 1996. — 228 с.

143. Шпонька И. С. Динамика изменений некоторых параметров соединительнотканного компонента сердца человека в постнатальном онтогенезе / И. С. Шпонька // Вестник проблем современной медицины. — 1996. — Вып. 8. — С. 139—143.
144. Шпонька И. С. Количественные аспекты гистогенетического ("истинного") и адаптивного роста кардиомиоцитов млекопитающих / И. С. Шпонька // Вестник проблем современной медицины. — 1996. — Вып. 11. — С. 38—41.
145. Шпонька И. С. Механизмы становления сократительного аппарата в миокарде млекопитающих в раннем онтогенезе / И. С. Шпонька // Морфология сердца и сосудистой системы. — 1994. — С. 16—20.
146. Шпонька И. С. Перестройки актомиозинового комплекса сократительных кардиомиоцитов в кардиогенезе человека / И. С. Шпонька // Актуальные вопросы морфологии сердца. — 1996. — С. 140—145.
147. Шпонька И. С. Структурные механизмы формирования сократительной функции миокарда / И. С. Шпонька // Вестник проблем современной медицины. — 1994. — Вып. 5. — С. 67—73.
148. Шпонька И.С. Морфология гемомикроциркуляторного русла в связи с преобразованием миокарда в пре- и раннем постнатальном онтогенезе: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.01 „Нормальна анатомія” / И. С. Шпонька. — Днепропетровск, 1991. — 23 с.
149. Шпонька И.С. Структурно-функциональная характеристика гистогенетических процессов в миокарде млекопитающих на этапах раннего онтогенеза: дис. ... доктора мед. наук : 14.03.01. / Ігор Станиславович Шпонька. — Днепропетровск, 1996. — 420с.
150. Экспериментальное моделирование врожденных пороков сердца и магистральных сосудов / [под ред. Кирьякулова С. Г.]. — Київ : Вища школа, 1994. — 157 с.

151. Ямщиков Н. В. Гибель кардиомиоцитов и разрушение их структур в эмбриональном гистогенезе / Н. В. Ямщиков // *Арх. анат.* — 1985. — Т. 88, № 3. — С. 79—84.
152. Ярцев В.Н. Возможный механизм терморегуляции при адаптации к холоду, связанный с восстанавливающим действием норадреналина на сниженную нейрогенную вазореактивность / В.Н. Ярцев, О.В. Караченцева // *Гормональные механизмы адаптации: Программа и тезисы Всероссийского симпозиума с международным участием «Гормональные механизмы адаптации»* .- С.-Петербург, 3-5 окт. 2007 г .- СПб.: Ин-т физиологии им.И.П.Павлова.- 2007.- С.101.
153. Abu-Issa R. Heart fields: one, two or more? / R.Abu-Issa , K. Waldo, M. L. Kirby // *Dev. Biol.* — 2004. — Vol. 272, № 2. — P. 281—283.
154. Acute oxygen-sensing mechanisms / E. K. Weir, J. Lopez-Barneo, K. J. Buckler, S. L. Archer // *J. Med.* — 2005. — Vol. 353. — P. 2042—2055.
155. Altimiras J. Lack of physiological plasticity in the early chicken embryo exposed to acute hypoxia / J. Altimiras, L. Phu // *Exp Zool.* — 2000. — Vol. 5, № 286. — P. 450—456.
156. An apoptic defect in lens differentiation caused by human p53 is rescued by a mutant allele / T. Nakamura, J. G. Pichel, L. Williams-Simons, H. Westphal // *J. proc. natl. acad. sci. U.S.A.* — 1995. — Vol. 92. — P. 6142—6146.
157. Anderson R. H. "Specialized" conducting cells in the pulmonary veins / R. H. Anderson , S. Y. Ho // *J. Cardiovasc. electrophysiol.* — 2004. — Vol. 15, № 1. — P. 121—123.
158. Anderson R. H. Anatomy of the human atrioventricular junctions revisited / R. H. Anderson, S. Y. Ho, A. E. Becker // *Anat. rec.* — 2000. — Vol. 260. — P. 81—91.
159. Anderson R. H. Clinical anatomy of the atrial septum with reference to its developmental components / R. H. Anderson, S. Webb, N. A. Brown // *Clin. anat.* — 1999. — Vol. 12, № 5. — P. 362—374.

160. Anderson R. H. Definition of the atrioventricular node / R. H. Anderson // *J. Cardiovasc. electrophysiol.* — 2002. — Vol. 13, № 8. — P. 841.
161. Anderson R. H. Development and structure of the atrial septum / R. H. Anderson, N. A. Brown, S. Webb // *Heart.* — 2002. — Vol. 88. — P. 104—110.
162. Anderson R. H. Double outlet right ventricle / R. H. Anderson // *Eur. J. Cardiothorac. surg.* — 2002. — Vol. 22, № 5. — P. 853.
163. Anderson R. H. Morphology of the functionally univentricular heart / R. H. Anderson, A. C. Cook // *Cardiol. young.* — 2004. — Vol. 14, № 1. — P. 3—12.
164. Anderson R. H. Tension apparatus the mitral valve / R. H. Anderson // *J. Heart valve dis.* — 2002. — Vol. 11, № 6. — P. 891—893.
165. Anderson R. H. The conduction tissues in congenitally corrected transposition / R. H. Anderson // *Ann Thorac. surg.* — 2004. — Vol. 77, № 6. — P. 1881—1882.
166. Anderson R. H. The morphology of the cardiac conduction system / R. H. Anderson, S. Y. Ho // *Novartis found symp.* — 2003. — Vol. 250. — P. 6—17.
167. Anderson R. H. Understanding the structure of the unicuspid and unicommissural aortic valve / R. H. Anderson // *J. Heart valve dis.* — 2003. — Vol. 12, № 6. — P. 670—673.
168. Anversa P. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart / P. Anversa, J. Kajstura // *Circ. res.* — 1998. — Vol. 83. — P. 1—14.
169. Atrial development in the human heart: an immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues / A. Wessels, R. H. Anderson, R. Markwald [et al.] // *Anat. rec.* — 2000. — Vol. 259, № 3. — P. 288—300.
170. Balsoni G. Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells / G. Balsoni, R. Spanguolo, E. Dejana // *Vasc. biol.* — 2000. — Vol. 27. — P. 1443—1451.

171. Barry M. A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anti-cancer drugs, toxins and hyperthermia / M. A. Barry, C. A. Behnke, A. // Eastman biochem pharmacol. — 1990. — Vol. 40. — P. 2353—2362.
172. Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations / A. C. Gittenberger-de Groot, M. M. Bartelings, M. C. Deruiter, R. E. Poelmann // *Pediatr. res.* — 2005. — Vol. 57, № 2. — P. 169—176.
173. Benjamin J. I. Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells / I. J. Benjamin, B. Krogert, R. Sanders Willams // *J. Biochemistry.* — 1990. — Vol. 87. — P. 6263—6267.
174. Bolaris S. In utero radiation-induced apoptosis and p53 gene expression in the developing rat brain / S. Bolaris, E. Bozas, A. Benekou [et al.] // *J. Radiat. biol.* — 2001. — Vol. 77. — P. 71—81.
175. BRUNEAU B. G. THE DEVELOPING HEART AND CONGENITAL HEART DEFECTS: A MAKE OR BREAK SITUATION / B. G. BRUNEAU // *J. CLIN.GENET.* — 2003. — № 4. — P. 252—261.
176. Cardiac output distribution in response to hypoxia in the chick embryo in the second half of the incubation time / A. L. Mulder, J. C. van Golde, F. W. Prinzen, C. E. Blanco // *Physiol.* — 1998. — Vol. 1, № 508. — P. 281—287.
177. Cardiac output distribution in response to hypoxia in the chick embryo in the second half of the incubation time / A. L. Mulder, J. C. van Golde, F. W. Prinzen, C. E. Blanco // *J. Cardiovasc. pharmacol.* — 1998. — V. 31, № 2. — P. 195—202.
178. Cefalo R. C. The effects of maternal hyperthermia on maternal and fetal cardiovascular and respiratory function / R. C. Cefalo, A. E. Hellegers // *Obstet gynecol.* — 1988. — Vol. 6, № 131. — P. 687—694.
179. Cell proliferation in the growing human heart: MIB-1 immunostaining in preterm and term infants at autopsy / Y. Huttenbach, M. L. Ostrowski, D. Thaller, H. S. Kim // *Cardiovasc. pathol.* — 2001. — Vol. 10, № 3. — P. 119—123.

180. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart / V. M. Christoffels, P. E. Habets, D. Franco [et al.] // *J. Dev. Biol.* — 2000. — Vol. 223, № 2. — P. 266—278.
181. Chan T. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*) / T. Chan, W. Burggren // *J. Respir. Physiol. Neurobiol.* — 2005. — Vol. 145, № 2—3. — P. 251—263.
182. Characterization of MEC 14.7, new monoclonal antibody recognizing mouse CD34: a useful reagent for identifying and characterizing blood vessels and hematopoietic precursors / C. Garlanda, R. Berthier, J. Garin [et al.] // *Eur. J. Cell. Biol.* — 1997. — Vol. 73. — P. 368—377.
183. Chronic hypoxia stimulates periarterial sympathetic nerve development in chicken embryo / K. Ruijtenbeek, F. A. le Noble, G. M. Janssen [et al.] // *J. Circulation.* — 2000. — Vol. 102. — P. 2892—2897.
184. Chronic in ovo hypoxia decreases pulmonary arterial contractile reactivity and induces biventricular cardiac enlargement in the chicken embryo / E. Villamor, C. G. Kessels, K. Ruijtenbeek [et al.] // *J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2004. — Vol. 287. — P. 642—651.
185. Chronic moderate hypoxia and protein malnutrition both induce growth retardation, but have distinct effects on arterial endothelium-dependent reactivity in the chicken embryo / K. Ruijtenbeek, L. C. Kessels, J. G. De Mey, C. E. Blanco // *J. Pediatr. Res.* — 2003. — Vol. 53. — P. 573—579.
186. Chronic moderate hypoxia during in ovo development alters arterial reactivity in chickens / K. Ruijtenbeek, C. G. Kessels, B. J. Janssen [et al.] // *J. Pflügers Arch.* — 2003. — Vol. 447. — P. 158—167.
187. Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105 / K. Yasuda, A. Nakai, T. Hatayama, K. Nagata // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 29718—29723.
188. Clyman R. I. Mechanisms regulating the ductus arteriosus / R. I. Clyman // *J. Biol. Neonate.* — 2006. — Vol. 89. — P. 330—335.

189. Coceani F. The response of the lamb ductus arteriosus to endothelin: developmental changes and influence of light / F. Coceani, L. Kelsey, E. Seidlitz // *J. Life sci.* — 2002. — Vol. 71. — P. 1209—1217.
190. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart / R. W. Dettman, W. J. Denetclaw, C. P. Ordahl [et al.] // *Devel. biol.* — 1998. — Vol. 193, № 2. — P. 169—181.
191. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos / J. M. Perez-Pomares, D. Macias, L. Garcia-Garrido [et al.] // *Devel. dynamics.* — 1997. — Vol. 210, № 2. — P. 96—105.
192. Coronary artery and orifice development is associated with proper timing of epicardial outgrowth and correlated fas ligand associated apoptosis patterns / I. Eralp, H. Lie-Venema, M. C. DeRuiter [et al.] // *Circ res.* — 2005. — Vol. 96, № 5. — P. 526—534.
193. Coronary vascularization during development in the rat and it's relationship to basic fibroblast growth factor / R. J. Tomanek, L. Haung, P. R. Suvarna [et al.] // *Cardiovasc. res.* — 1996. — Vol. 31, № 5. — P. 116—126.
194. Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation / M. Tamamori-Adachi, H. Ito, P. Sumrejkanchanakij [et al.] // *Circ. res.* — 2003. — Vol. 92, № 1. — P. 12—19.
195. Cyclo-oxygenase 2 tissue distribution and developmental pattern of expression in the chicken / M. Mathonnet, F. Lalloue, E. Danty [et al.] // *J. clin exp pharmacol physiol.* — 2001. — Vol. 28. — P. 425—432.
196. DeMeester S. Heat shock induces I κ B- α and prevents stress-induced endothelial cell apoptosis / S. DeMeester, T. Buchman, Y. Qiu // *Arch. Surg.* — 1997. — Vol. 132. — P. 1283—1287.
197. Development of the coronary vasculature and its implications for coronary abnormalities in general and specifically in pulmonary atresia without ventricular septal defect / A. C. Gittenberger-de Groot, I. Eralp, H. Lie-Venema [et al.] // *Acta Paediatr.* — 2004. — Vol. 93. — P. 13—19.

198. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks / A. Moorman , S. Webb, N. A. Brown [et al.] // *Heart*. — 2003. — Vol. 89, № 7. — P. 806—814.
199. Development of the heart: (2) Septation of the atriums and ventricles / R. H. Anderson , S. Webb, N. A. Brown [et al.] // *Heart*. — 2003. — Vol. 89, № 8. — P. 949—958.
200. Development of the heart: (3) formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks / R. H. Anderson, S. Webb, N. A. Brown [et al.] // *Heart*. — 2003. — Vol. 89, № 9. — P. 1110—1118.
201. Development of the heart: Formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks / Robert H. Anderson, Sandra Webb, Nigel A. Brown [et al.] // *J. Heart*. — 2003. — Vol. 89. — P. 1110—1118.
202. Development of the myocardium of the atrioventricular canal and the vestibular spine in the human heart / J. S. Kim, S. Viragh, A. F. Moorman [et al.] // *Circ res*. — 2001. — Vol. 88, № 4. — P. 395—402.
203. Development of the papillary muscles of the mitral valve: morphogenetic background of parachute-like asymmetric mitral valves and other mitral valve anomalies / P. W. Oosthoek, A. C. Wenink, L. J. Wisse, A. C. Gittenberger-de Groot // *Journal of thoracic & cardiovascular surgery*. — 1998. — Vol. 116, № 1. — P. 36—46.
204. Developmental changes in the myocardial architecture of the chick / D. Sedmera, T. Pexieder, N. Hu, E. B. Clark // *Anat. rec*. — 1997. — Vol. 248. — P. 421—432.
205. Developmental patterning of the myocardium / D. Sedmera, T. Pexieder, M. Vulliemin [et al.] // *Anat. rec*. — 2000. — Vol. 258. — 319—337.
206. Differential effects of hypoxia with age on the chick embryonic heart. Changes in membrane potential, intracellular K and Na, K efflux and glycogen / A. Vleugels, E. Carmeliet, S. Bosteels, M. Zaman // *J. Pflugers arch*. — 1976. — Vol. 2—3, № 365. — P. 159—166.

207. Distribution patterns of PCNA and ANP in perinatal stages of the developing rat heart / S. Cayli, L. Ustunel, C. Celik-Ozenci [et al.] // *Acta histochem.* — 2002. — Vol. 104, № 3. — P. 271—277.
208. Ectopic pacing at physiological rate improves postanoxic recovery of the developing heart / A. Rosa, J. P. Maury, J. Terrand [et al.] // *J. physiol heart circ physiol.* — 2003. — Vol. 284, № 6. — P. 2384—2392.
209. Edwards M. J. Hyperthermia, teratogenesis and the heat shock response in mammalian embryos in culture / M. J. Edwards, D. A. Walsh, Z. Li // *J. Dev. biol.* — 1997. — Vol. 41. — P. 345—358.
210. Edwards M. J. The experimental production of clubfoot in guinea-pigs by maternal hyperthermia during gestation / M. J. Edwards // *J. Pathol.* — 1991. — Vol. 103. — P. 49—53.
211. Effects of chronic hypoxia and protein malnutrition on growth in the developing chick / S. L. Miller, L. R. Green, D. M. Peebles [et al.] // *J. obstet gynecol.* — 2002. — Vol. 186. — P. 261—267.
212. Effects of environmental hyperthermia on cardiovascular function in the rat embryo / M. Nakazawa, S. T. Miyagawa, M. Morishima [et al.] // *Pediatr. res.* — 1991. — Vol. 30, № 6. — P. 505—508.
213. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions / A. C. Gittenberger-de Groot, M. F. Vrancken Peeters, M. M. Mentink [et al.] // *J. Circ. res.* — 1998. — Vol. 82. — P. 1043—1052.
214. Ewing J. F. Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: Heme oxygenase 2 is not a heat shock protein / J. F. Ewing, M. D. Maines // *Medical sciences.* — 1991. — Vol. 88. — P. 5364—5368.
215. Fesus L. P. Apoptosis: Molecular mechanisms in programmed cell death / L. P. Fesus, J. A. Davies, M. Piacentini // *Europ. J. cell biol.* — 1991. — Vol. 747. — P. 195—204.

216. Figueira R. R. Development of the pars membranacea septi interventricularis of the human heart / R. R. Figueira, J. C. Prates, H. Hayashi // Arch. ital. anat. embryol. — 1991. — V. 96, № 4. — P. 303—307.
217. Fisher S. A. Apoptosis during cardiovascular development / S. A. Fisher, B. L. Langille, D. Srivastava // J. Circ. res. — 2000. — Vol. 87. — P. 856.
218. **Formation of the atrioventricular septal structures in the normal mouse / S. Webb, N. A. Brown, R. H. Anderson [et al.] // Circ. res. — 1998. — Vol. 82. — P. 645—656.**
219. Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis / M. Rallu, M. T. Loones, Y. Lallemand [et al.] // Developmental biology. — 1997. — Vol. 94. — P. 2392—2397.
220. Function of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the ductus arteriosus from foetal lamb: differential development and change by oxygen and endotoxin / F. Coceani, C. Ackerley, E. Seidlitz, L. Kelsey // J. Pharmacol. — 2001. — Vol. 132. — P. 241—251.
221. Goldbarg S. H. In utero indomethacin alters O₂ delivery to the fetal ductus arteriosus: implications for postnatal patency / S. H. Goldbarg, Y. Takahashi, C. Cruz // J. Physiol regul integr comp physiol . — 2002. — Vol. 282. — P. 184—190.
222. Graham J. M. Teratogen update: Gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illness and resultant patterns of defects in humans / J. M. Graham, M. J. Edwards, M. J. Edwards // J. Teratology. — 1998. — Vol. 58. — P. 209—221.
223. Hainaut P. Temperature sensitivity for conformation is an intrinsic property of wild-type p53 / P. Hainaut, S. Butcher, J. Milner // J. Cancer. — 1995. — Vol. 71. — P. 227—231.
224. Haworth S. G. Lung development—the effects of chronic hypoxia / S. G. Haworth, A. A. Hislop // J. Neonatol. — 2003. — Vol. 8. — P. 1—8.
225. Heart rate responses to altered ambient oxygen in early (days 3-9) chick embryos in the intact egg / R. Akiyama, H. Mitsubayashi, H. Tazawa, W. W. Burggren //

- J. Comp physiol . — 1999. — Vol. 169, № 2. — P. 85—92.
226. Heat shock and thermotolerance during early rat embryo development / D. A. Walsh, N. W. Klein, L. E. Hightower, M. J. Edwards // J. Teratology. — 1997. — Vol. 36. — P. 181—191.
227. Heat shock during rat embryo development in vitro results in decreased mitosis and abundant cell death / J. G. Breen, T. W. Claggett, G. L. Kimmel, C. A. Kimmel // J. Rep. toxicol. — 1999. — Vol. 13. — P. 31—39.
228. Heat shock protein induction in rat hearts / T. J. Donnelly, R. E. Sievers, F. L. Vissern [et al.] // Circulation. — 1992. — Vol. 85. — P. 769—778.
229. Hemodynamic alteration by fetal surgery accelerates myocyte proliferation in fetal guinea pig hearts / Y. Saiki, A. Konig, J. Waddell, I. M. Rebeyka // Surgery. — 1997. — Vol. 122, № 2. — P. 412—419.
230. Hemodynamic effects of environmental hyperthermia in stage 18, 21, and 24 chick embryos // Nakazawa M., Miyagawa S., Takao A., Clark E.B., Hu N. / *Pediatr Res.* 1986.- №20 (12).-P.1213-1215.
231. Hoever M. Overexpression of wild-type p53 interferes with normal development in xenopus laevis embryos / M. Hoever, J. H. Clement, D. Wedlich // J. Oncogene. — 1994. — Vol. 9. — P. 109—120.
232. Hoff van den M. J. Myocardialization of the cardiac outflow tract / M. J. Hoff van den, A. F. M. Moorman, J. M. Ruijter // Dev. Biol. — 1999. — Vol. 212. — P. 477—490.
233. HSP90, HSP90 β , and p53 Expression following in vitro hyperthermia exposure in gestation day 10 rat embryos / Raviprakash R. Dugyala, Thomas W. Claggett, Gary L. Kimmel, Carole A. Kimmel // J. toxicological sciences . — 2002, Vol. 69. — P. 183—190.
234. Huhta J. C. Embryonic cardiac Doppler / J. C. Huhta, T. Khowsathit, Z. Y. Tian [et al.] // J. Pediatr res. — 1993. — Vol. 33. — P. 22.
235. Hyperthermia in the chick embryo: HSP and possible mechanisms of developmental defects / D. Buckiova, L. Kubinova, A. Soukup [et al.] / Dev Biol. — 1998. — Vol. 42, № 5. — P. 737—740.

236. Hypoxia induced apoptosis with enhanced expression of fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes / Tanaco Masato, Ito Hiroshi, Adachi Susumu [et al.] // *Jurnal of the American heart association*. — 2006. — Vol. 10, № 3. — P. 426—433.
237. Hypoxia induces aortic hypertrophic growth, left ventricular dysfunction, and sympathetic hyperinnervation of peripheral arteries in the chick embryo / E. V. Rouwet, A. N. Tintu, M. W. Schellings [et al.] // *Circulation*. — 2002. — V. 11, № 105. — P. 2791—2796.
238. Hypoxia induces aortic hypertrophic growth, left ventricular dysfunction, and sympathetic hyperinnervation of peripheral arteries in the chick embryo / E. V. Rouwet, A. N. Tintu, M. W. Schellings [et al.] // *J. Circulation*. — 2002. — Vol. 105, № 23. — P. 2791—2796.
239. Hypoxia-inducible Factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia / Patty J. Lee, Bing-Hua Jiang, Beek Yoke Chin [et al.] // *Biological chemistry*. — 1997. — Vol. 272, № 9. — P. 5375—5381.
240. Hypoxia-responsive signaling regulates the apoptosis-dependent remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract / Y. Sugishita, D. W. Leifer, F. Agani [et al.] // *J. Dev. Biol.* — 2004. — Vol. 273, № 2. — P. 285—296.
241. Impact of hypoxia on early chick embryo growth and cardiovascular function / S. K. Sharma , J. L. Lucitti , C. Nordman [et al.] // *Pediatr res*. — 2006. — Vol. 59, № 1. — P. 116—120.
242. Induction of thermotolerance in early postimplantation rat embryos is associated with increased resistance to hyperthermia-induced apoptosis / P. E. Mirkes, L. M. Cornel, H. W. Park, M. L. Cunningham // *J. Teratology*. — 1997. — Vol. 56. — P. 210—219.
243. Intracardiac flow patterns related to the yolk sac circulation of the chick embryo / B. Hogers, M. C. de Ruiten, A. M. Baasten [et al.] // *Circ. res*. — 1995. — Vol. 76. — P. 871—877.

244. Kabelitz D. Role of apoptosis in cardiac allograft vasculopathy / D. Kabelitz // *Z. Kardiol.* — 2000. — Vol. 89, Suppl. 9. — P. 21—23.
245. Kajino H. Tissue hypoxia inhibits prostaglandin and nitric oxide production and prevents ductus arteriosus reopening / H. Kajino, Y. Q. Chen, S. Chemtob // *J. Physiol regul integr comp physiol.* — 2000. — Vol. 279. — P. 278—286.
246. Kanani M. The anatomy of the mitral valve: a retrospective analysis of yesterday's future / M. Kanani, R. H. Anderson // *J. Heart valve dis.* — 2003. — Vol. 12, № 5. — P. 543—547.
247. Kapron-Bras C. M. Heat-shock induced tolerance to the embryotoxic effects of hyperthermia and cadmium in mouse embryos in vitro / C. M. Kapron-Bras, B. F. Hales // *J. Teratology.* — 1991. — Vol. 43. — P. 83—94.
248. Keyes W. M. Regulation of apoptosis in the endocardial cushions of the developing chick heart / W. M. Keyes, E. J. Sanders // *J. Physiol. cell physiol.* — 2002. — Vol. 282. — P. 1348—1360.
249. Kim W. K. Alterations in mitochondrial morphology are associated with hyperthermia-induced apoptosis in early postimplantation mouse embryos / W. K. Kim, P. E. Mirkes // *J. Clin. Mol. Teratol.* — 2003. — Vol. 67, № 11. — P. 929—940.
250. Kimimasa T. Right and left ventricular wall deformation patterns in normal and left heart hypoplasia chick embryos / T. Kimimasa, B. Bradley // *J. Cardiovascular development.* — 2002. — Vol. 279. — P. 959—969.
251. Kirby M. L. Molecular embryogenesis of the heart / M. L. Kirby // *Pediatr. dev. pathol.* — 2002. — Vol. 5, № 6. — P. 516—543.
252. Lamers W. H. Cardiac septation: a late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis / W. H. Lamers, A. F. Moorman // *Circ. res.* — 2002. — Vol. 91, № 2. — P. 93—103.
253. Lentiviral expression of retinal guanylate cyclase-1 (RetGC1) restores vision in an avian model of childhood blindness / M. L. Williams, J. E. Coleman, S. E. Haire [et al.] // *J. PLoS Med.* — 2006. — Vol. 3. — P. 201—206.

254. Levin M. ATP depletion and cell death in the neonatal lamb ductus arteriosus / M. Levin, S. Goldbarg, A. Lindqvist // *J. Pediatr. res.* — 2005. — Vol. 57. — P. 801—805.
255. Local and regional variations in myofibrillar patterns in looping rat hearts / R. L. Price, C. Chintanowonges, I. Shiraishi [et al.] // *Anat. rec.* — 1996. — Vol. 245. — P. 83—93.
256. Lutsch G. Abundance and Location of the Small Heat Shock Proteins HSP25 and B-Crystallin in Rat and Human Heart / G. Lutsch, R. Vetter, U. Offhauss // *Circulation.* — 1997, Vol. 96. — P. 3466—3476.
257. Mandarin-de-Lacerda C. A. An update of the stereology of the myocyte of the baboon's heart: analysis of the crista terminalis, interatrial and interventricular septa, and atrioventricular bundle / C. A. Mandarin-de-Lacerda, W. S. Costa // *Ann. Anat.* — 1993. — Vol. 175. — P. 65—70.
258. Manner J. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process / J. Manner // *J. Anat. rec.* — 2000. — Vol. 259, № 3. — P. 248—262.
259. McKay R. The aorto-ventricular tunnels / R. McKay, R. H. Anderson, A. C. Cook // *Cardiol. young.* — 2002. — Vol. 12, № 6. — P. 563—580.
260. Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP) / Y. Nakajima, T. Yamagishi, S. Hokari, H. Nakamura // *J. Anat. rec.* — 2000. — Vol. 258. — № 2. — P. 119—127.
261. Michael P. Vascular reactivity and baroreflex function during hyperthermia in conscious rats / P. Michael, O. Massett, J. Stephen // *J. appl. physio.* — 2002. — Vol. 92. — P. 789—794.
262. Mirkes P. E. Effects of acute exposure to elevated temperatures on rat embryo growth and development in vitro / P. E. Mirkes // *J. Teratology.* — 1985. — Vol. 32. — P. 259—266.

263. Mirkes P. E. Hyperthermia-induced heat shock response and thermotolerance in postimplantation rat embryos / P. E. Mirkes // *J. dev. biol.* — 1997. — Vol. 119. — P. 115—122.
264. Mirkes P.E. 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development // *Teratology.*- 2002.-Vol.65, № 5.- P.228-239.
265. Momma K. Inhibition of in vivo constriction of fetal ductus arteriosus by endothelin receptor blockade in rats / K. Momma, T. Nakanishi, S. Imamura // *J. Pediatr. res.* — 2003. — Vol. 53. — P. 479—485.
266. Multiple p53 protein isoforms and formation of oligomeric complexes with heat shock proteins HSP70 and HSP90 in the human mammary tumor, T47D, cell line / J. K. Selkirk, B. A. Merrick, B. L. Stackhouse, C. He // *J. appl. theor. electrophor.* — 1994. — Vol. 4. — P. 11—18.
267. Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origins / S. K. Moore, C. Kozak, E. A. Robinson [et al.] // *J. Biol. chem.* — 1989. — Vol. 264. — P. 5343—5351.
268. Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium-derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization / H.Lie-Venema , I. Eralp, S.Maas [et al.] // *Anat. rec.* — 2005. — Vol. 282, № 2. — P. 120—129.
269. Myocardial volume and organization are changed by failure of addition of secondary heart field myocardium to the cardiac outflow tract / T. M. Yelbuz, K. L. Waldo, X. Zhang [et al.] // *J. dev. dyn.* — 2003. — Vol. 228, № 2. — P. 152—160.
270. Nilsen N. O. Vascular abnormalities due to hyperthermia in chick embryos / N. O. Nilsen // *J. Teratology.* — 1994. — Vol. 30. — P. 237—251.
271. Normal endothelium-dependent relaxation in pulmonary arteries of chicken embryos prone to pulmonary hypertension / E. Villamor, C. G. Kessels, A. Vereijken [et al.] // *J. Pediatr. res.* — 2002. — Vol. 52. — P. 132—139.
272. Ontogeny of chicken ductus arteriosus response to oxygen and vasoconstrictors /

- P. Agren, A. L. Cogolludo, C. G. Kessels [et al.] // *J. Physiol regul integr comp physiol.* — 2007. — V. 292. — P. 485—496.
273. Organ growth in hyperoxic and hypoxic chick embryos / I. E. McCutcheon, J. Metcalfe, A. B. Metzzenberg, T. Ettinger // *J. Respir. physiol.* — 1992. — Vol. 50, № 2. — P. 153—163.
274. Ostadal B. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects / B. Ostadal, I. Ostadalova, N. S. Dhalla // *J. Physiol. rev.* — 1999. — Vol. 79, № 3. — P. 635—659.
275. Phaneuf S. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age / S. Phaneuf, C. Leeuwenburgh // *J. physiol. regul. integr. comp. physiol.* — 2002. — Vol. 282, № 2. — P. 423—430.
276. Poelmann R. E. A Subpopulation of apoptosis-prone cardiac neural crest cells targets to the venous pole: multiple functions in heart development? / R. E. Poelmann, A. C. Gittenberger-de Groot // *J. Dev. biol.* — 1999. — Vol. 207. — P. 271—286.
277. Poelmann R. E. Apoptosis as an instrument in cardiovascular development / R. E. Poelmann, A. C. Gittenberger-de Groot // *J. birth. defects res. c. embryo today.* — 2005. — Vol. 75, № 4. — P. 305—313.
278. Predictors of residual defects following closure of defects in the oval fossa using the Amplatzer device: echocardiography recapitulates morphometry / D. Balaguru, R. H. Anderson, G. L. Rosenthal [et al.] // *Cardiol. young.* — 2003. — Vol. 13, № 4. — P. 352—360.
279. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart / J. Kajstura, M. Mansukhani, W. Cheng [et al.] // *Exp. cell. res.* — 1995. — Vol. 219, № 1. — P. 110—121.
280. Randy McMillan D. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis / D. Randy McMillan, Xiao Xianzhong, Shao Lei // *J. Biochemistry.* — 1997. — Vol. 3. — P. 75235—8573.

281. Ratajska A. Embryonic development of coronary vasculature in rats: corrosion casting studies / A. Ratajska, B. Ciszek, A. Sowinska // *Anat. rec.* — 2003. — Vol. 270, № 2. — P. 109—116.
282. Rate of coronary vascularization during embryonic chicken development is influenced by the rate of myocardial growth / R. J. Tomanek, N. Hu, B. Phan, E. B. Clark // *Cardiovasc. res.* — 1999. — Vol. 41, № 3. — P. 663—671.
283. Response of chicken embryo ductus arteriosus to NO/cyclic GMP- and cyclic AMP-mediated relaxation / P. Agren, M. Van der Weerden, C. G. Kessels [et al.] // *J. Pediatr Res.* — 2005. — V. 58. — P. 354—358.
284. Richards M. P. Effects of brief hypoxia and hyperoxia on tissue trace element levels in the developing chick embryo / M. P. Richards, M. K. Stock, J. Metcalfe // *J. magnes trace elem.* — 1992, Vol. 10, № 5—6. — P. 305—320.
285. Rybnikova E.A. Antidepressant-like effects of hypoxic preconditioning / Mironova V.I., Nalivaeva N.N., Turner A.J.// Гипоксическое , ишемическое прекондиционирование мозга : Российско - Польский рабочий симп ., посв .50- летнему юбилею сотрудничества Польской и Российской Академии Наук в рамках Дней Польской науки в России ; Санкт - Петербург - Колтуши, 11-14 декабря 2008 г . : Материалы симп .- СПб .,2008.- С .78-83.
286. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart / K. L. Waldo, M. R. Hutson, C. C. Ward [et al.] // *J. dev. biol.* — 2005. — Vol. 281, № 1. — P. 78—90.
287. Septation and separation within the outflow tract of the developing heart / S. Webb , S. R. Quayyum , R. H. Anderson [et al.] // *J. Anat.* — 2003. — Vol. 202, № 4. — P. 327—342.
288. Sharratt G. P. The vestibular defect: an interatrial communication due to a deficiency in the atrial septal component derived from the vestibular spine / G. P. Sharratt // *Cardiol. Young.* — 2003. — Vol. 13, № 2. — P. 184—190.
289. Spatiotemporal analysis of programmed cell death during mouse cardiac septation / P. R. Sharma, R. H. Anderson, A. J. Copp, D. J. Henderson // *Anat. rec.* — 2004. — Vol. 277, № 2. — P. 355—369.

290. Stock M. K. Prenatal oxidative stress: I. Malondialdehyde in hypoxic and hyperoxic chick embryos / M. K. Stock, K. K. Silvernail, J. Metcalfe // *J. free radic biol med.* — 1990. — Vol. 8, № 4. — P. 313—318.
291. Strasser A. Bcl-2 and termotolerance cooperate in cell survival / A. Strasser, R. L. Anderson // *Cell growth differ.* — 1995. — Vol. 6. — P. 799—805.
292. Sugishita Y. Role of myocardial hypoxia in the remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract / Y. Sugishita, M. Watanabe, S. A. Fisher // *J. Dev biol.* — 2004. — Vol. 267, № 2. — P. 294—308.
293. Sugishita Y. The development of the embryonic outflow tract provides novel insights into cardiac differentiation and remodeling / Y. Sugishita, M. Watanabe, S Fisher // *J. Trends cardiovasc. med.* — 2004. — Vol. 14, № 6. — P. 235—241.
294. Sympathetic control of the cardiovascular response to acute hypoxemia in the chick embryo / A. L. Mulder, A. Miedema, J. G. De Mey [et al.] // *J. physiol regul integr comp physiol.* — 2002. — Vol. 282, № 4. — P. 1156—1163.
295. Temporal and distinct TGFbeta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis / T. D. Camenisch, D. G. Molin, A. Person [et al.] // *J. Dev. biol.* — 2002. — Vol. 248, № 1. — P. 170—181.
296. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and bcl-2 proteins / L. Rao, M. Debbas, P. Sabbanti // *Prok. natl. acad sci. U S A.* — 1992. — Vol. 89. — P. 7742—7746.
297. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen / F. R. Watanabe, C. I. Bannan, N. Itoh [et al.] // *J Immunol.* — 1992. — Vol. 148. — P. 1274—1279.
298. The effect of graded hypoxia on the embryonic chick heart / R. N. Ruckman, G. C. Rosenquist, D. A. Rademaker [et al.] // *J. Teratology.* — 1985. — Vol. 32, № 3. — P. 463—472.
299. The evolutionary origin of cardiac chambers / M. S. Simoes-Costa, M. Vasconcelos, A. C. Sampaio [et al.] // *J. Dev. biol.* — 2005. — Vol. 277, № 1. — P. 1—15.

300. The forces generated within the musculature of the left ventricular wall / P. P. Lunkenheimer, K. Redmann, J. Florek [et al.] // *Heart*. — 2004. — Vol. 90, № 2. — P. 200—207.
301. The oncoproteins c-erb-B2, c-fos and the tumour suppressor protein p53 in human embryos and fetuses / N. Miosge, W. Schneider, W. Gotz, R. Herken // *Anat. embryol.* — 1997. — Vol. 195, № 4. — P. 345—352.
302. The role of endothelin in oxygen-induced contraction of the ductus arteriosus in rabbit and rat fetuses / J. Shen, T. Nakanishi, H. K. Gu [et al.] // *J. Heart vessels*. — 2002. — Vol. 16. — P. 181—188.
303. The Structure of the mouse heart in late fetal stages / S. Webb, N. A. Brown, R. H. Anderson [et al.] // *Anat. embryol.* — 1996. — Vol. 194, № 1. — P. 37—47.
304. Ultrastructural analysis of development of myocardium in calreticulin-deficient mice / M. D. Lozyk, S. Papp, X. Zhang [et al.] // *J. developmental biology*. — 2006. Vol. 54. — P. 1186—1271.
305. Upfold J. B. Interference with neural crest migration by maternal hyperthermia as a cause of embryonic death due to heart failure / J. B. Upfold, M. S. Smith, M. J. Edwards // *Med. Hypotheses*. — 1991. — Vol. 3, № 35. — P. 244—246.
306. Van Golde J. Changes in mean chorioallantoic artery blood flow and heart rate produced by hypoxia in the developing chick embryo / J. Van Golde, T. Mulder, C. E. Blanco // *J. Pediatr. res.* — 1997. — Vol. 42, № 3. — P. 293—298.
307. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis / R. J. Tomanek, A. Ratajska, G. T. Kitten [et al.] // *Dev. dyn.* — 1999. — Vol. 215, № 1. — P. 54—61.
308. Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide / P. Maury, A. Sarre, J. Terrand [et al.] // *J. mol cell biochem.* — 2004. — Vol. 265, № 1—2. — P. 141—149.
309. Vuillemin M. Normal stages of cardiac organogenesis in the mouse: 1. Development of the external shape of the heart / M. Vuillemin, T. Pexieder // *Am. J. anat.* — 1989. — Vol. 184, № 2. — P. 101—113.

310. Vuillemin M. Normal stages of cardiae organogenesis in the mouse: 2. Development of the internal relief of the heart / M. Vuillemin, T. Pexieder // *Am. J. anat.* — 1989. — Vol. 184, № 2. — P. 114—128.
311. Webb S. Development of the human pulmonary vein and its incorporation in the morphologically left atrium / S. Webb, M. Kanani, R. Anderson // *Cardiol. young.* — 2001. — Vol. 11. — P. 632—642.
312. Webb S. Development of the murine pulmonary vein and its relationship to the embryonic venous sinus / S. Webb, N. A. Brown, A. Wessels // *Anat. rec.* — 1998. — Vol. 250. — P. 325—334.
313. Whole body structural vascular adaptation to prolonged hypoxia in chick embryos / T. H. Adair, A. C. Guyton, J. P. Montani [et al.] // *J. Physiol heart circ. physiol.* — 1997. — V. 252. — P. 1228—1234.
314. Wikenheiser J. Differential levels of tissue hypoxia in the developing chicken heart / J. Wikenheiser, Y.-Q. Doughman, S. A. Fisher, M. Watanabe // *J. Developmental dynamics.* — 1998. — V. 235, № 1. — P. 115—123.
315. Wulfsohn D. Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat / D. Wulfsohn, J. R. Nyengaard, Y. Tang // *Anat. rec.* — 2004. — Vol. 277, № 1. — P. 236—247.
316. Yelbuz T. M. Studies on morphogenesis and visualization of the early embryonic heart with regard to the development of conotruncal heart defects / T. M. Yelbuz, A. Wessel, M. L. Kirby // *J. Kardiol.* — 2004. — Vol. 93, № 8. — P. 583—594.
317. Yutzey K. E. Wherefore heart thou? Embryonic origins of cardiogenic mesoderm / K. E. Yutzey, M. L. Kirby // *Dev. Dyn.* — 2002. — Vol. 223, № 3. — P. 307—320.

ДОДАТКИ