

Ю.В.Сілкіна

Дніпропетровська державна медична академія

Ключові слова: провідна система, гістогенез, ембріональне серце.

Надійшла: 07.08.2010

Прийнята: 10.09.2010

УДК 616.12:611.018.835:611.89:611.013.395

ГІСТОГЕНЕТИЧНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ ПРОВІДНОЇ СИСТЕМИ СЕРЦЯ

Робота виконана у рамках науково-дослідної теми «Аналіз нормального й аномального гістогенезу тканинних компонентів серцево-судинної системи людини та експериментальних тварин» (номер державної реєстрації 0105U007831).

Резюме. Були досліджені серця ембріонів і плодів людини, а також серця ембріонів, новонароджених та зрілих щурів. Дослідження проводилося з використанням панелі антитіл (NF, α -SMA, MSA, neuregulin, Ki-67, bax, CD95), панелі лектинів (WGA, PNA, HPA, SBA, SNA), електронної мікроскопії. Було встановлено, що кардіоміоцити стінок передсердь та трабекул шлуночків ембріонального серця людини експресують антигенні детермінанти, які є специфічними для клітин дефінітивної провідної системи – NF та α -SMA, створюючи шляхи проведення імпульсів для скорочення в умовах відсутності ще дефінітивної провідної системи серця. Регресія протеїнів відбувається по мірі формування дефінітивної провідної системи, залишаючись на довгий час тільки у кардіоміоцитах її передсердного кінцевого відділу. Останні зберігають деякі ембріональні властивості і у зрілому серці. Розвиток всіх ланок провідної системи, за винятком кінцевих передсердного та шлуночкового її відділів, тісно пов'язаний із гістогенезом нервової системи, оскільки зростання відносного об'єму нервових волокон у складі структурних компонентів системи прямо корелює як зі ступенем ущільнення клітин вузлів та пучка, так і з швидкістю їхнього диференціювання. Ініціація апоптозу клітин у складі провідної системи серця відбувається за bax-залежним та Fas-рецепторним механізмом, спрямованим, у першому випадку, на контроль популяції провідних кардіоміоцитів, а у другому – на процеси заселення васкулогенних клітин на територію структурних компонентів системи. Апоптозні процеси у ділянках формування структур в цілому є малочисельними. Термін, коли провідна система має вигляд єдиної структури, припадає на 11 тиждень пренатального онтогенезу людини, однак процес диференціювання клітин провідної системи до цього періоду не завершується, і у першу чергу це стосується системи спеціалізованих міжклітинних з'єднань.

Морфологія. – 2010. – Т. IV, № 3. – С. 50-66.

© Ю.В.Сілкіна, 2010

Silkina Yu.V. Histogenetic transformations of conductive system of the heart.

Summary. Embryonic and fetal human hearts and also embryonic, newborn and mature rat hearts have been investigated. We used the panel of antibodies (NF, α -SMA, MSA, neuregulin, Ki-67, bax, CD95), panel of lectins (WGA, PNA, HPA, SBA, SNA) and electronic microscopy. It was established that atrial and ventricular cardiomyocytes in human embryonic heart express the same specific antigene determinants as in definitive conductive system - NF and α -SMA, forming ways for conducting impulses for contraction under the asence of mature conductive system. Regression of proteins occurs along with the process of formation of definitive conductive system, remaining for a long time only in cardiomyocytes of atrial terminal department. The last ones preserve embryonic properties also in mature heart. Development of all components of conductive system, except its terminal atrial and ventricular departments, is closely interconnected with histogenetic processes in nervous system, as the increase of relative volume of nervous fibres inside the structural components of the system directly correlates with the degree of compaction of cells of bundle and node, and with rate of their differentiation. Initiation of apoptosis in cells of conductive system occurs in bax-dependent and Fas-dependent mechanisms, in the first case – for controlling the cellular population, and in the second – for settling the territory of components of conductive system by vasculogenic cells. Apoptotic processes on territory of structural elements of conductive system are rare events. Term, at which the conductive system looks like uniform system, is near 11 week of human prenatal ontogenesis, however process of differentiation of cells of conductive system has not finished yet, and especially it refers to the system of specialized intercellular junctions.

Key words: conductive system, histogenesis, embryonic heart.

Вступ

Серцево-судинні захворювання – одна з найважливіших медико-біологічних та соціальних проблем в Україні. За даними МОЗ України вони посідають перше місце в структурі хвороб, зумовлюють майже дві третини всіх випадків

смерті та третину причин інвалідності. Серед причин загальної смертності новонароджених вроджені вади серця (ВВС) складають біля 15% (Волосовець О.П. та співавт., 2008; Мутаф'ян О.А., 2009). Частота ВВС складає 8-12 випадків на 1000 народжених дітей, займаючи 22% у зага-

льній структурі вроджених вад розвитку.

Вроджені вади серця часто супроводжуються порушеннями серцевого ритму, які не обов'язково маніфестуються одразу після народження, а можуть перебігати латентно (Егорова И.Ф. и соавт., 2001); при цьому 2/3 дітей із порушеннями серцевого ритму не мають важкої органічної патології з боку серця, що свідчить про поліетіологічність цієї патології, в якій далеко не останнє місце займають дизембріогенії провідної системи серця (ПСС).

За період вивчення провідної системи серця, який охоплює майже століття, зроблений ряд відкриттів в аспекті анатомічних трансформацій синусно-передсердного та передсердно-шлуночкового вузлів, передсердно-шлуночкового пучка і його ніжок, досліджена ультраструктура провідних кардіоміоцитів як у зрілому серці, так і на етапах кардіогенезу у різних об'єктів, встановлені генетичні фактори, які забезпечують розвиток ПСС. Однак існує низка питань, які не дозволяють поставити крапку і чітко охарактеризувати механізми розвитку системи. Серед них: питання походження провідних клітин у складі різних ланок ПСС, що тягне за собою питання клітинних реакцій, які реалізуються кардіоміоцитами – мігрують вони з позасерцевих джерел, або детермінуються із спільного зі скоротливими клітинами пулу; як вдається ембріональному серцю ритмічно скорочуватися в умовах відсутності сформованої провідної системи і так далі.

Отже, сукупність проблемних питань дозволяє стверджувати значну актуальність проблеми ембріогенезу провідної системи серця людини та потребує глибокого її вивчення в таких аспектах, як: встановлення морфологічних передумов для скоординованих скорочень ембріонального серця у період відсутності провідної системи, послідовність закладки структурних компонентів ПСС та встановлення між ними структурного зв'язку із формуванням спеціалізованої системи міжклітинних з'єднань, специфічність та характеристики експресії антигенних і вуглеводних детермінант провідними кардіоміоцитами протягом кардіогенезу, індивідуальні алгоритми реалізації клітинних реакцій кардіоміоцитами у складі різних ланок провідної системи серця.

Метою нашої роботи було вивчення гістогенетичних перетворень структурних ланок провідної системи серця протягом кардіогенезу.

Матеріали та методи

Були вивчені серця ембріонів і плодів людини на різних строках гестації (від 4 до 14 тижнів), а також серця щурів у період від 12 до 21 доби пренатального розвитку та у перші три місяці після народження. Була використана панель антитіл, яка включала: антитіла до білків триплету нейрофіламентів (NF, LabVision), антитіла до альфа-гладком'язового актину (α -SMA, DakoCytomation), антитіла до м'язовоспецифіч-

ного антигену (MSA, LabVision), маркер проліферації Ki-67 (LabVision), нейрегулін (neuregulin, LabVision), маркери апоптозу CD95 та bax (LabVision). Панель лектинів була наступною: лектин зародків пшениці (WGA), лектин арахіса (PNA), лектин виноградного слимака (HPA) (Лектинотест, Львів). Матеріал фіксували у нейтральному 10% забуференому формаліні. Ступінь експресії маркерів визначали шляхом оцінки інтенсивності реакції та підрахунку відносного об'єму (за оригінальною методикою) (деклараційний патент № у 2010 00615), мітотичну активність та активність апоптозу оцінювали шляхом підрахунку кількості Ki-67-позитивних ядер, CD95-позитивних та bax-позитивних клітин на 100 клітин. Для проведення електронної мікроскопії матеріал фіксували у 2% розчині чотириокису осмію на 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,36) та заливали в епон-аралдит. Визначення рівня міграційного та адгезійного потенціалу клітин ділянки, що досліджувалася, проводили за оригінальною методикою (деклараційний патент № у 2010 01471).

Результати та їх обговорення

Перші скорочення трубчастого серця людини спостерігаються вже на 3 тижні пренатального періоду розвитку людини (Gourdie R. et al., 2003). У цей час серцевий м'яз представлений декількома рядами малодиференційованих міоцитів – однорідних за гістоструктурою та функцією. Хвиля скорочення розповсюджується в напрямку від каудального відділу до краніального, а пейсмейкерна зона розташована у ділянці межі венозного синуса та примітивного передсердя (Šolc D., 2007). Поступово вона зміщується разом із передсердною камерою завдяки макротрансформаціям серцевої трубки, змінюючи форму вектору розповсюдження сигналу з лінійної на U-подібну.

У цей час провідна система як така відсутня, функцію ж проведення імпульсу від первинного кардіостимуляторного центру в напрямку випускного тракту беруть на себе кардіоміоцити, що складають міокард раннього серця. Отже, ембріональне серце розвивається за такою стратегією, яка дає можливість без зрілої системи проведення забезпечувати скоординовані скорочення камер. Швидке зростання об'єму та маси серця призводить до активної проліферації кардіоміоцитів, супроводжуючись звуженням зон локалізації біпотентних м'язових клітин та маніфестацією формування окремої системи розповсюдження сигналу для скорочення. Таким чином, на ранніх стадіях ембріогенезу, коли ПСС ще не є розвиненою, умови функціонування серця дозволяють поступово інтегрувати окремі компоненти, які сформують у подальшому повноцінну кондуктивну систему.

Кардіоміоцити раннього міокарда мають здатність експресувати специфічні антигенні де

термінанти, які властиві провідним клітинам сформованої ПСС, а також клітинам нервової системи і несерцевим міоцитам, завдяки чому вони можуть поєднувати функцію скорочення та проведення. Це узгоджується із даними про те, що у клітинах провідної системи відбувається коекспресія нейрональних та скелетних м'язових білків. Ми спостерігали експресію малодиференційованими кардіоміоцитами білків нейрофіла-

ментів (NF) вже на 4 тижні ембріонального розвитку людини на більшості території міокарда примітивних шлуночків та передсердь. У подальшому в клітинах виявлялася експресія низьковогового протеїну триплету нейрофіламентів, який розподілявся по цитоплазмі клітин у вигляді "посмугованості" (рис. 1).

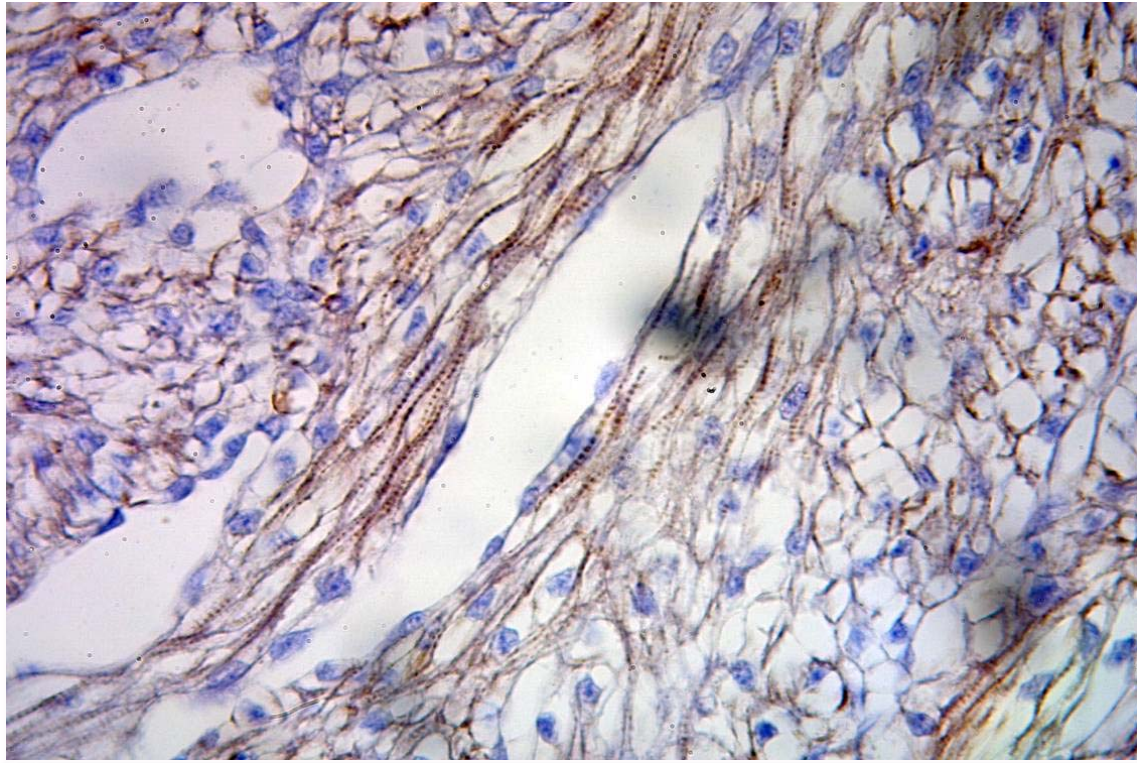


Рис. 1. Ділянка шлуночка серця людини на 7 тижні гестації. Обробка NF. $\times 1000$.

Згідно із дослідженням S.Carroll et al. (2001) малодиференційовані кардіоміоцити мають у примембранних ділянках аморфні Z-тілця, які безпосередньо беруть участь у міофібрилогенезі. Ми припускаємо, що накопичення нейроспецифічних протеїнів у цитоплазмі міоцитів відбувається саме у ділянках Z-тілець, оскільки "посмугованість" візуалізувалася у кортикальних зонах їхньої цитоплазми.

На 5 тижні ембріонального розвитку людини з'являлася позитивна реакція кардіоміоцитів із антитілами до α -гладком'язового актину (α -SMA), який, за даними літератури (Franco D., Icardo J., 2001), є маркером клітин провідної системи; зони накопичення α -SMA-позитивних клітин, на відміну від NF-позитивних, були обмеженими і відповідали: люменальним трабекулам шлуночків, кільцю клітин у складі випускного тракту, субендокардіальним ділянкам міокарда передсердь, а також міжпередсердній перегородці та частково структурі пограничного гребеня. Відносно обмежена територія високої експресії α -SMA створювала умови для звуження первин-

них "провідних шляхів", обмежуючи тим самим кількість клітин, здатних поєднувати функцію проведення та скорочення, і непрямо індукувала формування структур кінцевої провідної системи.

У подальшому – протягом 7-10 тижнів гестації – відбувалося стрімке зниження рівня експресії α -SMA у складі міокарда шлуночків, що свідчило про активні процеси диференціювання клітин шляхом "позбавлення" їх від ранніх ембріональних властивостей. Дещо інша динаміка спостерігалася у передсердях, де рівень експресії знижувався тільки після 10 тижня, а до цього терміну, навпаки, зростав, що свідчило про відставання у темпах набуття зрілості міоцитами передсердь, порівняно із шлуночковим міокардом. Крім того, мінімальний рівень експресії α -SMA зберігався в деяких ділянках передсердь та вушках навіть у зрілому серці, вказуючи на збереження ембріональних властивостей деякими кардіоміоцитами передсердного міокарда.

Таким чином, протягом онтогенезу функціонують дві системи проведення – первинна (емб-

ріональна) та вторинна (кінцева). Перша існує від початку скорочувальних рухів трубчастого серця до створення другої – дефінітивної – провідної системи серця. Первинна система поступово зникає шляхом регресії провідних властивостей кардіоміоцитів у вигляді поступової інгібіції експресії специфічних протеїнів при паралельному формуванні ланок вторинної провідної системи і початку її функціонування, починаючи з 10-11 тижнів гестації.

Однак, на наше переконання, повного зникнення провідних властивостей у деяких скоротливих клітин не відбувається, оскільки відомо, що в зрілому серці можуть виникати ектопічні джерела ритму у шлуночковому та, рідше, передсердному міокарді, і це може бути пов'язано із "ембріональною пам'яттю" скоротливих кардіоміоцитів та включенням при необхідності процесів експресії відповідних антигенних детермінант. На користь цього припущення щодо залишку здатностей проведення і, навіть, генерації сигналів можуть слугувати дані A. Moorman та V. Christoffels (2003), які свідчать, що приблизно на 20 добу розвитку ембріона людини хвиля скорочення виникає у середній (шлуночкової) частині серцевої трубки, формуючи функціональний градієнт збудження-скорочення саме у цій ділянці. Тільки починаючи з 25 доби, коли вже є сформованим венозний синус, центр збудження переміщується у ділянку межування примітивного передсердя та венозного синусу. Ці дані можуть також пояснювати здатність шлуночкового міокарда відігравати роль водія ритму при вимиканні пейсмеркерної функції нодальної частини ПСС.

Встановлено, що більшість гістологічно ідентифікованих додаткових шляхів проведення у атріовентрикулярній області представляють собою тяжі робочих кардіоміоцитів (Anderson R. et al., 1976); ці утворення мають більший діаметр в області фіброзного тіла та розгалужуються в шлуночкової частині у вигляді коренів дерева. Враховуючи результати наших досліджень щодо експресії ранніми кардіоміоцитами протеїнів провідного типу та їхньою інгібіцією на пізніх строках розвитку ПСС, слід припустити, що формування додаткових провідних пучків, які виявляються гістологічно, електрофізіологічно та клінічно, відбувається не шляхом патологічного розповсюдження клітин провідної системи, а завдяки недостатній регресії синтезу специфічних детермінант в клітинах робочого міокарда.

Початком формування вторинної провідної системи можна вважати 5 тижень ембріонального розвитку людини, оскільки у цей термін відбувалася закладка синусно-передсердного вузла та провідного стовбура, яка слугувала джерелом розвитку передсердно-шлуночкового вузла та частини передсердно-шлуночкового пучка. Розвиток інших ланок ПСС починався пізніше, що подовжувало термін функціонування елемен-

тів первинної провідної системи. Пізніше за синусно-передсердний вузол починали розвиток передсердно-шлуночкові вузол та пучок, які тільки з 6 тижня диференціювалися як окремі структурні одиниці (після сепарації загального примордію – провідного стовбура). Тільки після цього починалося утворення шлуночкового кінцевого відділу – наприкінці 7 початку 8 тижня гестації.

Термін початку гістогенезу передсердної кінцевої частини ПСС виділити важко, оскільки утворюється вона шляхом рекрутизації клітин із загального зі скоротливими кардіоміоцитами передсердь пулу, які входять спочатку до складу первинної провідної системи, зберігаючи протягом тривалого періоду ембріональні властивості, а у подальшому залишаються у складі вторинної ПСС. Підтвердженням того, що скоротливі кардіоміоцити стінок передсердь мають особливості, які відрізняють їх від інших ділянок серця, є дані дослідження J. Pachón et al. (2006), які за допомогою методики спектрального картування міокарда встановили, що м'язова оболонка стінки передсердь представляє собою суміш так званого компактного та фібрилярного типів міокарда. Вони відрізняються між собою здатністю до збудження та розподіленням міжклітинних контактів та мають у нормі стале співвідношення, яке, наприклад, у хворих із фібриляцією передсердь змінене у бік другого типу, що призводить до значних високочастотних перепадів електричної активності та виникнення загальної електричної нестабільності передсердь.

Після утворення всіх частин провідної системи, встановлення між ними зв'язку та початку їхнього функціонування відбувалася помітна негресія антигенних властивостей в клітинах первинної ПСС (рис. 2А, 2Б), що було критерієм активного диференціювання вторинних кондуктивних шляхів.

Тривалість оформлення вторинної провідної системи у загальному вигляді становила біля 5 тижнів – від початку її гістогенезу до повноцінного функціонування, що, однак, не свідчило про завершення процесів внутрішньосистемного та клітинного диференціювання. Останній активно триває навіть після народження у вигляді змін кількісно-якісних характеристик міжклітинних контактів. Тим не менш, в процесі дослідження для кожного підрозділу провідної системи нами були встановлені терміни, коли в них завершуються основні гістогенетичні трансформації і структура має вже ту форму, топографію та набір клітинних елементів, які притаманні їм у дефінітивному стані. Для синусно-передсердного вузла цей термін відповідав 9 тижню гестації, всі ж інші ланки досягали описаних характеристик пізніше: для передсердно-шлуночкового пучка ця хронологічна точка співпадала із 10 тижнем розвитку, інші структури до 11 тижня завершу-

вали формування свого кінцевого вигляду.

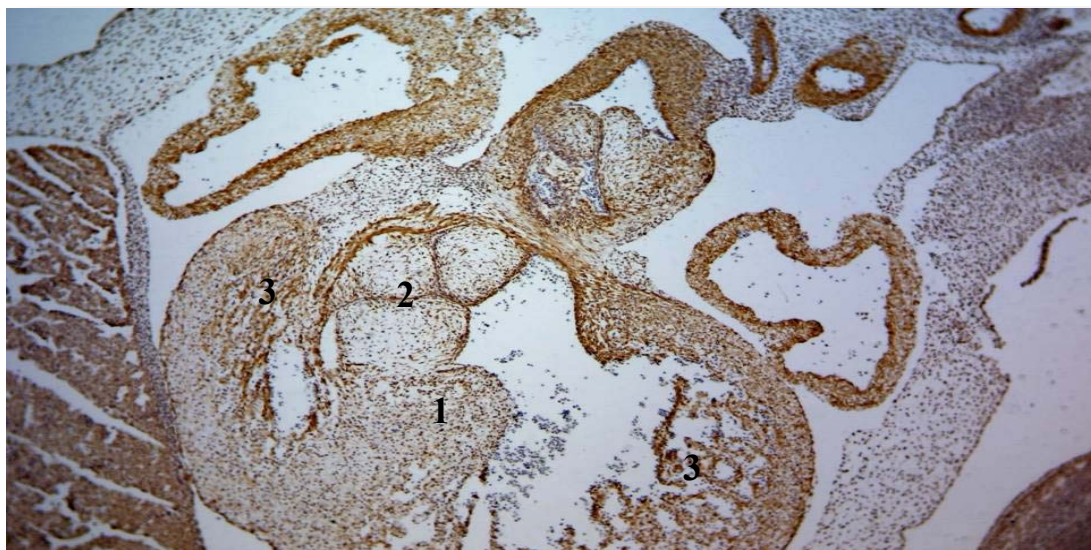


Рис. 2А. Серце людини на 5 тижні ембріогенезу. Обробка α -SMA. $\times 200$. 1 – гребінь міжшлуночкової перегородки; 2 – ендокардіальні подушки; 3 – трабекули шлуночків.

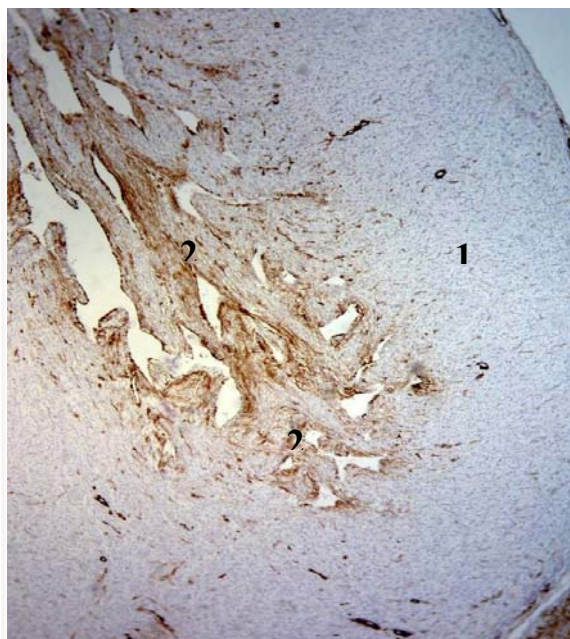


Рис. 2Б. Серце людини на 12 тижні гестації. Обробка α -SMA. $\times 200$. 1 – вільна стінка лівого шлуночка; 2 – люменальні трабекули.

Таким чином, хронологія розвитку провідної системи мала наступний вигляд: на 5 тижні можна було спостерігати тільки примордій синусно-передсердного вузла; 6 тиждень характеризувався сепарацією провідного стовбура та утворенням зачатків передсердно-шлуночкового вузла і передсердної частини однойменного пучка, а також елементів шлуночкової його ділянки; на 7 тижні виявлялися провідні клітини кінцевого

передсердного та шлуночкового відділів; 11 тиждень відповідав строку, коли всі структурні компоненти утворювали єдину, структурно оформлену провідну систему, формуючи зв'язки між собою та із скоротливим міокардом.

Згідно даних О.В.Волкової та М.И.Пекарського (1976), цілісну провідну систему можливо спостерігати вже у плодів на стадії 16 см ТКД (17-18 тижнів гестації), оскільки найважливіший функціональний показник роботи провідної системи – електрокардіограма – нагадує таку у дорослої людини. Наші результати, які вказують на те, що сформовану в основних рисах ПСС можна спостерігати набагато раніше, не суперечать, а скоріше уточнюють ці дані, оскільки на таких ранніх строках не тільки встановити параметри електрокардіограми плода, але і встановити факт серцебиття майже не можливо.

Синусно-передсердний вузол (СПВ), який спочатку мав вигляд півмісяця та майже одразу займав своє кінцеве положення, впродовж 5 тижнів змінював форму на подовжену з утворенням центральної та периферійної частин, остання з яких без чіткої межі переходила у скоротливий міокард правого передсердя. Передсердно-шлуночковий вузол (ПШВ), розвиваючись із декстралатерально розташованих клітин провідного стовбура, також протягом 5 тижнів змінював форму з округлої на видовжену, незначно зміщувався з центрального у нижній частині МПП положення вправо з утворенням щільного "ядра" та більш пухкої периферійної частини, пов'язаної із клітинами пересердно-шлуночкового пучка (рис. 3).

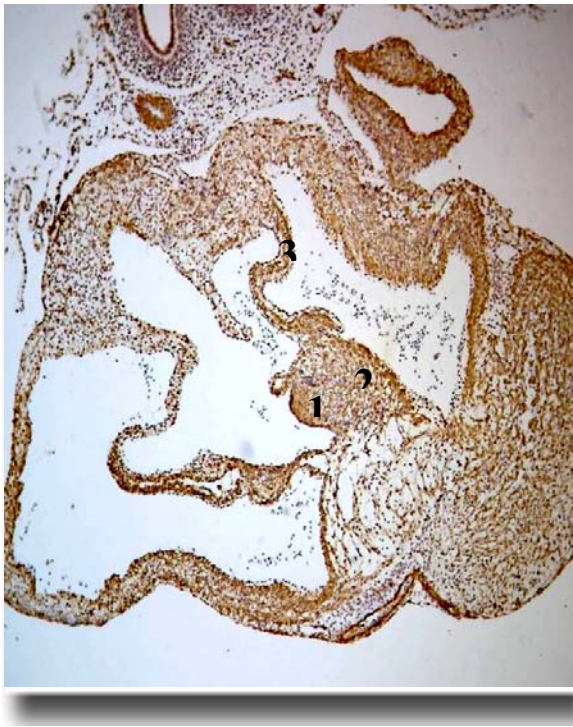


Рис. 3. Серце людини на 6 тижні гестації. Обробка α -SMA. $\times 100$. 1 – «ядро» передсердно-шлуночкового вузла; 2 – периферійна частина вузла; 3 – міжпередсердна перегородка.

Останній протягом 6-11 тижня утворювався шляхом злиття двох окремих частин – проксимальної та дистальної, закладка яких відбувалася окремо, з подальшим злиттям на рівні сполучної тканини передсердно-шлуночкової борозни в єдиний тракт та розгалуженням дистальної частини. Кінцеві відділи ПСС у складі міокарда передсердь та шлуночків формувалися найдовше, однак вже на 11 тижні мали зв'язок із вищелокалізованою ланкою системи з одного боку та із скоротливими кардіоміоцитами з іншого.

Встановлення зв'язку між ланками системи відбувалося у терміни, які відповідали, поперше, умовам для об'єднання, а по-друге – структурній готовності клітин для створення безперервних шляхів. Синусно-передсердний та передсердно-шлуночковий вузли з'єднувалися вже на ранніх строках декількома міжnodальними шляхами, роль яких відігравали, за нашими даними, міжпередсердна перегородка (МПП) та пограничний гребінь, клітини яких на ранніх строках мали імуногістохімічні властивості подібні до таких у кардіоміоцитах первинної провідної системи, а на більш пізніх – накопичували антигенні детермінанти подібно до клітин передсердно-шлуночкового пучка та волокон у складі перегородкових стулок передсердно-шлуночкових клапанів. Термін, на якому ми спостерігали безперервне кільце тканини, яка різко позитивно мітилася α -SMA і охоплювала повністю стінку правого передсердя разом із МПП, пограничним гребенем та відповідною ділянкою передсердно-

шлуночкової борозни, припадав на 5-7 тиждень, після чого експресія маркера регресувала у більшості перелічених структур, залишаючись ще впродовж декількох тижнів у складі пограничного гребеня, міжпередсердної перегородки та частини борозни, включаючи периферійні відділи СПВ та ПШВ.

Ці дані деяким чином доповнюють результати дослідження Л.Б.Мітрофанової та співавторів (2008), у якому йдеться про присутність у субендокардіальному шарі овальної ямки та під нею у 91% досліджених померлих віком від 23 до 80 років провідних кардіоміоцитів, які виявлялися за специфічними гістоморфологічними ознаками. Крім цього у пацієнтів із пароксизмальною фібриляцією передсердь було проведено електрофізіологічне дослідження цієї ділянки, яке вказало на неоднорідність та затримку проведення через зону МПП, а у деяких пацієнтів діагностувалася локальна блокада проведення. Отже, ми додержуємося думки, що з ранніх етапів розвитку серця МПП входить до складу первинної системи передачі сигналу, залишаючись у подальшому частиною вторинної ПСС у якості міжnodального тракту.

Навіть більше, ніж попереднє посилення, цю нашу думку підтверджують дослідження R.Trueх et al. (1978), які свідчать про те, що після багаточисельних досліджень клітин міокарда передсердь ссавців він не зміг виділити специфічних провідних шляхів, але дійшов висновку про забезпечення міжnodального зв'язку волокнами, які складаються з типових кардіоміоцитів передсердь. Це твердження і на сьогодні є дискусійним, однак наші дослідження довели факт участі МПП та клітин пограничного гребеня у функціонуванні первинної і вторинної ПСС в ембріональний період та експресію кардіоміоцитами у їхньому складі специфічних антигенних детермінант у плодovому періоді, що додає аргументів у припущеннях щодо ролі цих структур в забезпеченні міжnodального зв'язку.

Т. James (2001), базуючись на дослідженнях напівсерійних зрізів та препарування різних передсердних м'язових пучків, описав "спеціалізовані шляхи" – передній, середній та задній, – які сполучають синусно-передсердний та передсердно-шлуночковий вузли. Однак група вчених (Platonov P. et al., 2002), що також досліджували внутрішньопередсердні провідні шляхи, вказали на те, що Т. James фактично описав весь міокард міжпередсердної перегородки та пограничного гребеня.

Найбільш специфічним виявився процес з'єднання передсердних та шлуночкових провідних шляхів через злиття проксимальної та дистальної частин передсердно-шлуночкового пучка у процесі формування фіброзного тіла. Він припадав на 7 тиждень ембріонального розвитку людини, коли створювалися умови для просування

волокон обох кінців тракту в ущільнену мезенхіму передсердно-шлуночкової борозни. Паралельно з цим від латеральних ділянок передсердно-шлуночкового пучка відходили гілки, що просувалися у напрямку перегородкових стулок правого та лівого передсердно-шлуночкових клапанів, спускаючись навіть до їхніх вільних кінців. Таким чином, впродовж 7 тижня утворювався єдиний пучок, який складався із передсердної частини, пов'язаної із периферійною ділянкою ПШВ, проникаючої, яка проходила крізь фіброзне тіло у напрямку міжшлуночкової перегородки (МШП) та шлуночкової, яка розгалужувалася на

ніжки та мала стулкові гілки.

Слід зазначити, що розгалуження пучка на території м'язового гребеня міжшлуночкової перегородки мали не дихотомічний характер (на праву та ліву ніжки), а характеризувалися більшою кількістю гілок, з яких права та ліва (найбільш представницькі) об'єднувалися, формуючи відповідні ніжки; найбільш латеральні відгалуження відходили майже під прямим кутом до вісі МШП у напрямку перегородкових стулок передсердно-шлуночкових клапанів, а центральні не мали продовження, закінчуючись у верхній третині міжшлуночкової перегородки сліпо (рис. 4).

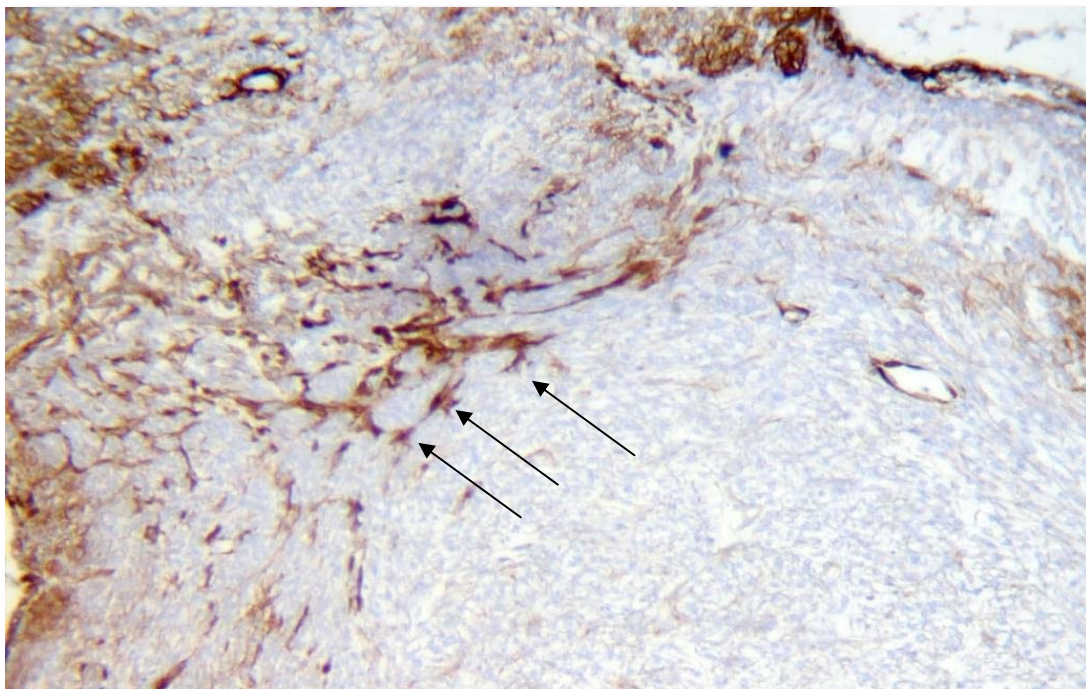


Рис. 4. Ділянка розгалуження передсердно-шлуночкового вузла на гребені м'язової частини міжшлуночкової перегородки серця людини на 8 тижні гестації. Обробка α -SMA. Стрілками вказані розгалуження, які не мають продовження вглиб перегородки («сліпі»). $\times 400$.

Відносно присутності провідних клітин у складі передсердно-шлуночкових клапанів існують різні думки – від таких, що заперечують їхнє існування, до таких, що беззаперечно свідчать про існування провідних шляхів у складі фіброзних кілець клапанів, заслонок синусів у правому передсерді, стінок легених судин та аортального конусу і так далі, тобто у ділянках, "не властивих" для розміщення провідних клітин. Так, R.Anderson et al. (1999) вказували на те, що у період пренатального розвитку людини перегородкове фіброзне кільце містить багаточисельні тяжі спеціалізованої провідної тканини, які сполучають вузло-пучкову вісь та гребінь м'язової частини міжшлуночкової перегородки. При народженні фіброзна тканина в ділянці передсердно-шлуночкового з'єднання розвинута краще, але у більшості випадків у її складі спостерігаються

тонкі пучки провідної тканини, які проходять через центральне фіброзне тіло таким чином, що утворюється анатомічний зв'язок між компактною частиною вузла та проникаючою частиною пучка з одного боку та міокардом шлуночків з іншого, оминаючи основний передсердно-шлуночковий пучок. Автори, однак, зазначають, що подальша доля цих шляхів систематично не вивчалася у дітей та молодих людей, однак прямі вузло-шлуночкові та пучково-шлуночкові зв'язки часто зустрічаються у нормально розвинутих серцях дітей та підлітків. Це певним чином підтверджує наші дані, які свідчать про наявність у серцях ембріонів та плодів людини "нехарактерних" провідних шляхів, у тому числі в складі перегородкових стулок передсердно-шлуночкових клапанів.

Підтвердженням наших спостережень про

характер розгалужень передсердно-шлуночкового пучка по виході із фіброзного тіла є не тільки вищеописані дані, але і результати дослідження M.Suárez-Mier та B.Aguilera (1998), які вказують на те, що у новонароджених безпосереднім продовженням осі вузол-пучок є "тупиковий тракт", який закінчується сліпо. Отже, існують шляхи у передсердному міокарді, які не мають продовження у шлуночкову частину провідної системи та шлуночковий міокард.

Утворення зв'язків між клітинами кінцевого відділу провідної системи шлуночків та кардіоміоцитами у складі передсердно-шлуночкового пучка відбувалося в останню чергу, що пояснюється пізньою появою клітин Пуркінє у складі субендокардіального шару шлуночкового міокарда – на 7 тижні ембріогенезу. У цей час нижня третина міжшлуночкової перегородки вже містила провідні кардіоміоцити передсердно-шлуночковий пучок (ПШП), однак розповсюдженість клітин Пуркінє у шлуночках була ще мінімальною. Протягом наступних двох тижнів ми спостерігали утворення груп провідних кардіоміоцитів кінцевого відділу ПСС та встановлення ними сполучань із клітинами пучка, про що свідчила наявність вже на 11 тижні безперервних провідних шляхів, які визначалися за експресією специфічних антигенних детермінант.

Встановити терміни формування зв'язків кардіоміоцитів передсердного кінцевого відділу провідної системи із попередньою ланкою, якою слугували як периферійна частина синусно-передсердного вузла, так і клітини у складі міжнодалних шляхів, нам вдалося лише на ультроструктурному рівні у серці щура, оскільки передсердний міокард, в якому тривало експресуються маркери ембріональної провідної системи, маскує утворення вторинної ПСС. Так, поява перших зон контактів між провідними кардіоміоцитами периферійної частини СПВ та клітинами кінцевого відділу ПСС спостерігалася в серці щура на 16 добі ембріонального розвитку, що відповідає 8 тижню гестації людини. Цей термін ми вважали за строк встановлення зв'язку між ланками різних рівнів провідної системи, а 18 доба розвитку щура (10 тиждень гестації людини) характеризувалася значною кількістю нексусів між означеними кардіоміоцитами, що ми приймали за критерій можливості передачі імпульсів у необхідному напрямку.

Враховуючи те, що периферійна частина синусно-передсердного вузла містила перехідного типу кардіоміоцити, які ми знаходили також у складі, в тому числі, передсердно-шлуночкового пучка, ми припускаємо, що вони при аналізі вектору розповсюдження сигналів в напрямку стінок передсердь певною мірою відіграють роль пучка Гіса, передаючи імпульс від пейсмейкерів до провідних клітин, пов'язаних із скоротливими кардіоміоцитами. При дослідженні синусно-

передсердного вузла у миші (Sallee D. et al. 2001) із використанням імуногістохімічної мітки Cx43, яка маркує один із білків у складі нексусів, було встановлено клітини СПВ у вигляді інтердигітацій врастають у атріальний міокард, а тяжі атріальних клітин проростають у синусно-передсердний вузол. Це підтверджує дані стосовно зв'язку кардіоміоцитів СПВ із клітинами у складі міокарда передсердь.

Процес утворення вторинної провідної системи залежить від багатьох факторів і не тільки генетичних, але і морфологічних, роль яких беруть на себе клітинні клони, що створюють у серці власну систему, впливаючи на розвиток та подальше функціонування серця. Такими клітинами є, безперечно, нервові та ендотеліальні, які паракринним шляхом впливають на розвиток сусідніх із ними мікрорегіонів.

Використання при дослідженні антитіл до низьковогового протеїну триплету нейрофіламентів дозволяло ідентифікувати не тільки провідні кардіоміоцити, які до нього тропні, але, у першу чергу, нервові елементи, що мали найбільшу інтенсивність реакції із маркером. У термін, який ми вважали початком розвитку вторинної ПСС, найбільш насичена нервовими елементами була зона стулок венозного синусу, де відбувалося входження гілки блукаючого нерва у товщу стінки передсердя. Саме у цій ділянці відбувалася закладка синусно-передсердного вузла, що був першим ідентифікуємим елементом вторинної провідної системи. Якщо дослідити хронологію та вектор внутрішньосерцевого розповсюдження нервових волокон, з'ясується, що вони певною мірою співпадають із послідовністю закладки ланок ПСС – від синусного вузла до шлуночкового міокарда вздовж перегородок камер серця.

Отже, розповсюдження відростків нейронів відбувалося спочатку вздовж міжпередсердної перегородки, нижня частина якої була місцем утворення передсердно-шлуночкового вузла та передсердної частини однойменного пучка. Ми припускаємо, що не тільки формування хрестовини серця, вертикальна складова якої утворена МПП та МШП, а горизонтальна – передсердно-шлуночковою борозною, що є критерієм стабілізації ділянки передсердно-шлуночкової борозни, але і поява у цій ділянці нервових волокон потенціює сепарацію провідного стовбура і впливає на швидкість реалізації гістогенетичної програми провідними кардіоміоцитами у його складі, оскільки у зоні локалізації точкоподібних нервових волокон спостерігалася пухке розташування кардіоміоцитів, а після появи виразних нервових елементів відбувалося зменшення відносного об'єму міжклітинного простору та прискорення проліферативних процесів. Однак, слід зазначити, що процеси ущільнення центральної частини передсердно-шлуночкового вузла відбувалися раніше появи у її складі нервових волокон, що

пов'язано, на наш погляд, із низькою тут активністю проліферації – "ядро" вузла формується не шляхом збільшення кількості клітин, а шляхом декстралатерального переміщення клітин відповідної частини провідного стовбура із паралельним збільшенням діаметру кардіоміоцитів.

Передсердна та шлуночкова частини ПШП диференціювалися несиметрично із відставанням другої внаслідок більшої насиченості нервовими елементами передсердної частини. Наприклад, на 7 тижні гестації людини в ділянці шлуночкової частини пучка спостерігалися лише поодинокі NF-позитивні структури, тому клітини кінцевого шлуночкового відділу провідної системи, які у цей період були у незначній кількості, повільно розповсюджувалися та залишалися недиференційованими. На 9 тижні нервові волокна вузла та пучка були чітко взаємопов'язані через сполучення у фіброзній тканині та утворювали зону, що вже мала посилену іннервацію, охоплюючи ділянку передсердно-шлуночкового вузла, передсердну частину пучка, центральну ділянку фіброзного тіла, а також верхівку м'язової частини МШП. Якщо через означені ділянки умовно провести лінію, то вона має хід зверху-вниз та справа-наліво, співпадаючи із напрямком вектору розповсюдження передсердно-шлуночкових провідних шляхів.

Крім цього, у структурі синусно-передсердного та, у меншій мірі, передсердно-шлуночкового вузлів спостерігався тип клітин, які ми відносили до пейсмеркерів, що характеризувався тісним зв'язком із тонкими гілками нервових розгалужень, які формували густу сітку навкруги груп таких клітин, прямо впливаючи на їхнє диференціювання – збільшення ступеня іннервації і, відповідно, розгалужень у структурі груп корелювало із ступенем ущільненості клітин вузла та їхньої зрілості.

Відповідь на питання: "Яким чином нервові волокна впливають на розвиток провідних шляхів?" може бути пов'язана із присутністю в іннервованих ділянках нейронних молекул адгезії (NCAM) та полісialьованих молекул адгезії (PSA-NCAM), роль яких у формуванні нервової системи широко вивчена. За даними M.Watanabe (1998) при вивченні *in vitro* було встановлено, що NCAM забезпечують контакт нервового закінчення із кардіоміоцитом. Автори зробили припущення, що PSA-NCAM впливає на процес розповсюдження тяжів провідних клітин внаслідок того, що сіалові кислоти запобігають утворенню контактів із латерально розташованими скоротливими міоцитами, забезпечуючи тим самим утворення відносно ізольованих пучків, які не мають за мету передачу імпульсу на скоротливий міокард. Таким чином, процеси розвитку нервової та провідної систем в серці безперечно пов'язані в аспекті впливу ступеня розповсюдженості нервових волокон на послідовність та темпи

утворення різних ланок ПСС.

Підтвердженням впливу нервової системи серця на розвиток ПСС є низка досліджень, які стосувалися вивчення вроджених вад у дітей. Так, було встановлено, що порушення розвитку синусно-передсердного вузла спряжене із кардіонейропатією у дітей (Динов Б.А., Белозеров Ю.М., 2006). Раніше Т.П.Клюшник зі співавторами (1988) було визначено, що одним з механізмів розвитку прогресуючої дисфункції провідної системи серця та формування електричної нестабільності міокарда шлуночків у дитячому віці є порушення в системі фактора росту нервів, а саме утворення аутоантитіл, які зв'язують цей нейропептид, перетворюючи його в інертний комплекс.

Іншим фактором, який паракринним чином впливає на розвиток провідної системи шляхом регуляції процесів у мікросередовищі, яке оточує кондуктивні клітини, є нейрегулін, що синтезується ендотеліоцитами ендокарду. На високому рівні він виявлявся нами у ранньому серці в нижній частині конотрункуса, стінках передсердно-шлуночкового каналу, в люменальних трабекулах обох шлуночків та ендотелії, який вкривав ендокардіальні подушки. Крім того, його активно накопичували клітини Пуркінє на початку розвитку шлуночкового кінцевого відділу ПСС. Проведені S.Rentschler et al. (2002) дослідження на мишах з використанням методу виключення гену, що відповідає за експресію нейрегуліну, показали виразне порушення формування трабекулярного міокарда та системи волокон Пуркінє, що доповнює наші дані щодо зв'язку процесу формування волокон Пуркінє та рівнем експресії нейрегуліну.

Виконання гістогенетичної програми тим чи іншим типом клітин залежить від генетичних, геннорегуляторних факторів, умов мікросередовища, у якому вони розвиваються, та потребує від клітин адекватної відповіді на різномірні командні сигнали у вигляді, наприклад, зміни поверхневої глікокарти, яка є не тільки клітинною візитівкою, але і може слугувати маркером того чи іншого процесу, у якому задіяна клітина. Крім того, експресія специфічних антигенних детермінант також може відображати напрямок клітинного процесу та мати динаміку протягом онтогенезу. Основні гістогенетичні процеси (міграція, адгезія, проліферація, диференціювання та клітинна загибель), які реалізували клітини провідної системи у складі різних її ланок, були вивчені нами за допомогою панелі лектинів та моноклональних антитіл, завдяки чому вдалося, по-перше, ідентифікувати провідні кардіоміоцити, по-друге – визначати напрямки гістогенетичного процесу, у якому вони брали участь у певний термін, а по-третє – провести інтегральний аналіз динаміки кількісних показників маркер-позитивних ділянок, що також дало змогу вста-

новити послідовність гістогенетичних перетворень, їх спрямованість та терміни "перемикання" програми.

Лектин зародків пшениці (WGA), специфічний у тому числі до сіалових кислот, накопичувався в ембріональному серці у цитоплазмі та на поверхні ендотеліальних, мезенхімних клітин і деяких провідних кардіоміоцитів, які входили до складу вторинної ПСС, що формується, маркуючи їх. Накопичення лектину на 5 тижні гестації людини у значній кількості спостерігалось в клітинах ендокардіальних подушок та задньої стінки загального ПШК, на території якої формувался провідний стовбур (рис. 5).

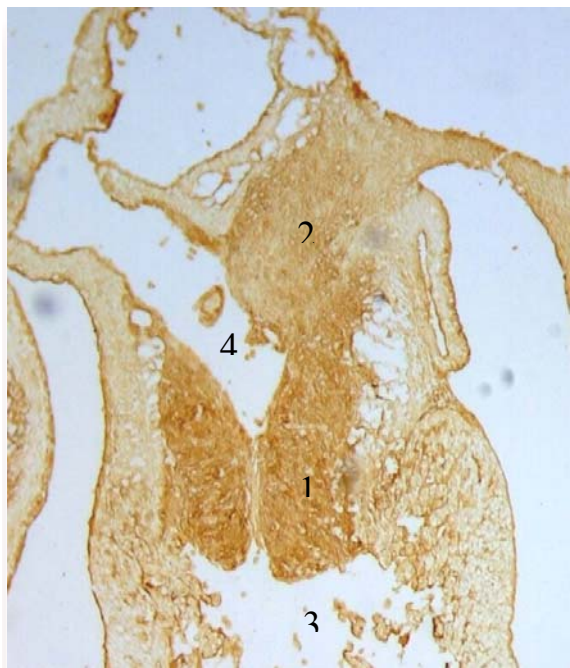


Рис. 5. Серце людини на 4 тижні гестації. Обробка лектином зародків пшениці. $\times 200$. 1 – ендокардіальна подушка; 2 – задня стінка ПШК; 3 – примітивний шлуночок; 4 – примітивне передсердя.

Лектин-позитивні клітини останньої утворювали декілька груп, що мали чіткий структурний зв'язок із мезенхімою подушок. Вважається, що WGA маркує мігруючі клітини нервового гребеня (НГ) (Poelmann R. et al., 2004), оскільки він є специфічним до вуглеводних залишків, у тому числі, N-ацетил-нейрамінової (сіалової) кислоти поверхневих глікокон'югатів мембран, а клітини нервового гребеня для забезпечення міграційного процесу експресують на своїй поверхні PSA-NCAM, які містять полісіалові кислоти.

Ми не проводили альтернативного маркування WGA-позитивних клітин на предмет доведення їхньої деривації від НГ, однак розцінювали реакцію із лектином у якості маркера перебігу міграційних процесів, про що свідчать дані різних досліджень: В.О.Антонюк (2005) зазначає, що сіалізація та гіперсіалізація цитолемі сприяє

реалізації міграційного потенціалу; І.П.Галич та Н.В.Евтушенко (2003) підтверджують цю думку, вказуючи на те, що, наприклад, малігнізовані клітини, які набувають здатності до метастазування, характеризуються саме гіперсіалізованістю поверхні, що дозволяє їм успішно долати лейкоцитарний кордон.

Крім того, групою авторів (Луцик А. Д. та співавт., 1989) було встановлено, що співвідношення D-галактоза/сіалова кислота на поверхні клітин може слугувати критерієм переключення клітиною програми реалізації відповідно адгезійного/міграційного потенціалу. Оскільки лектином WGA маркуються всі клітини, які знаходяться на етапі міграції, нам було важко виділити із загального масиву клітини провідної системи, тому ми оцінювали не стільки їх, скільки міграційний чи адгезійний потенціал ділянки, у якій відбувалося формування тієї чи іншої ланки ПСС. Для цього ми ввели інтегральний показник K , який оцінював співвідношення відносного об'єму клітин, мембрана яких насичена термінальними залишками D-галактози (PNA-позитивні) до показника сіалонасичених клітин (WGA-позитивні).

Так, ділянка формування синусно-передсердного вузла характеризувалася виразним (на 5-6 та 9-12 тижнях пренатального онтогенезу) та помірним (на 7-8 тижнях гестації) переважанням адгезійних процесів. Зростання відносного об'єму мігруючих клітин спостерігалось на 6-7 тижнях ембріонального періоду, але вони належали до сполучнотканинного диферону, що підтверджувалося не тільки відсутністю у них експресії міоспецифічних протеїнів, але і впливало із максимальної у цей період активності процесів васкулогенезу на території СПВ та початком формування сполучнотканинної капсули вузла.

Передсердно-шлуночковий вузол мав дещо інші показники K у центральній та периферійній частинах: м'язові клітини центральної частини ПШВ мали високу адгезійну активність (K знаходився у межах від 0,3 до 0,6 ($p < 0,05$)) протягом всього досліджуваного періоду; це свідчить про те, що утворення «ядра» ПШВ відбувалося не клітинами-мігрантами, а клітинами із загального міокардіального пулу, які під дією генетичних та паракринних чинників детермінуються у напрямку провідного диферону. Для периферійної ділянки вузла був характерний високий показник адгезійно-міграційного індексу K (від 0,6 до 3,4 ($p < 0,05$)) протягом 6 тижня гестації, що свідчило про високу міграційну активність клітин ділянки, що вивчалася, а, починаючи із 7 тижня, відбувалася зміна клітинної програми (падіння K до 0,7 ($p < 0,05$)), спрямована на утворення з'єднань між клітинами.

Передсердно-шлуночковий пучок характеризувався високим міграційним потенціалом клітин у всіх його частинах: переважання мігра-

ційної активності провідних кардіоміоцитів передсердної частини ПШП спостерігалось протягом 6-9 тижнів пренатального онтогенезу (K мав діапазон від 3,1 до 0,8 ($p < 0,05$)). Рівень міграційної активності клітин шлуночкової частини ПШВ в ембріональний період був ще вище (K дорівнював від 3,4 до 0,1 ($p < 0,05$)).

Шлуночковий кінцевий відділ провідної системи містив клітини, які у період з 7 до 8 тижня гестації характеризувалися виразним переважанням міграційної активності (рівень K досягав 3,7 ($p < 0,05$)). Переключення гістогенетичної програми пулу клітин, що вивчався, у бік зростання адгезійного потенціалу відбувалося на 9 тижні (спостерігалось падіння рівня K до 1,3 ($p < 0,05$) вже на 10 тижні). Передсердний кінцевий відділ ПСС на 5-6 тижні ембріонального розвитку характеризувався значним переважанням адгезійних процесів (K становив менше 0,5 ($p < 0,05$)); навіть завдяки активним процесам неоваскулогенеза зростання K не відбувалося і ділянки локалізації клітин провідної системи протягом всього терміну дослідження мали низький міграційний потенціал.

Таким чином, спрямованість процесів, що призводили до формування вторинної провідної системи, відрізнялася у різних ланках – периферійна частина передсердно-шлуночкового вузла, передсердно-шлуночковий пучок та шлуночковий кінцевий відділ ПСС (волокна Пуркінє) утворювалися шляхом реалізації міграційного потенціалу провідних клітин; синусно-передсердний вузол, центральна частина передсердно-шлуночкового вузла та передсердний кінцевий відділ ПСС формувалися із клітин тих ділянок міокарда, у яких розташовані зазначені структури.

Адгезійний потенціал кардіоміоцитів провідної системи, який ми оцінювали за допомогою показника K , що відображав, у тому числі, ступінь активності реакції із лектином PNA, мав декілька складових: здатність клітин до агрегації (формування структурованих груп), утворення зв'язків із клітинами стінки судин, сполучнотканинними та нервовими елементами, а також участь у формуванні системи спеціалізованих міжклітинних контактів, за допомогою яких клітини здатні передавати сигнал.

У складі синусно-передсердного вузла утворювалися два види провідних кардіоміоцитів – перші мали невиразну реакцію із міоспецифічним притеїном MSA, яку ми розцінювали як негативну, та не експресували α -SMA (тобто вони були α -SMA⁻/MSA⁻); другі – навпаки виказували реакцію з обома детермінантами (α -SMA⁺/MSA⁺). Клітини відрізнялися також характером скупчень та ступенем взаємодії із розгалуженнями нервових волокон: перші мали значну кількість контактів з нервовими елементами, що, у свою чергу, утворювали густу сітку розга-

лужень навколо груп α -SMA⁺/MSA⁻ кардіоміоцитів; крім того, вони створювали групи за принципом агрегації, тобто без певної просторової впорядкованості. Кардіоміоцити другого виду формували волокноподібні групи, тобто контактували між собою латеральними кінцями, утворюючи тяжі, а також "склеювали" сусідні тяжі за допомогою контактів на бічних поверхнях, не формуючи, однак, "синцитію", подібно до скоротливих клітин (слід зазначити, що цей принцип зберігався у всіх ланках провідної системи); щільність контактів із відростками нервових клітин була значно меншою, порівняно із першими клітинами, оскільки далеко не з кожним кардіоміоцитом формувався нервово-м'язовий синапс.

Передсердно-шлуночковий вузол складався з клітин, схожих за імуногістохімічними характеристиками до клітин СПВ, але у іншому співвідношенні: α -SMA⁺/MSA⁻ клітини у незначній кількості виявлялися на межі центральної та периферійної ділянок вузла, а також у центральній зоні, формуючи, як і у СПВ, щільну сітку контактів із нервовими волокнами. Більшість кардіоміоцитів ПШВ були α -SMA⁺/MSA⁺. Характер утворення скупчень зберігався, асоціюючись із імуномаркерною характеристикою – маркер-негативні кардіоміоцити утворювали безархітектурні скупчення, а маркер-позитивні – утворювали тяжі, які досить добре візуалізувалися у "ядрі" ПШВ.

Передсердно-шлуночковий пучок містив тільки α -SMA⁺/MSA⁺ клітини із характерним для них характером формування поздовжніх груп. Не дивлячись на те, що ділянка розгалуження пучка (гребінь м'язової частини МШП) містила велику кількість нервових волокон, пучкові провідні кардіоміоцити не утворювали насичених нервовими елементами груп. Таким чином, можна вважати, що тісний функціональний зв'язок між провідною та нервовою системами формується в основному на рівні кардіостимуляторного центру та якоюсь мірою на рівні передсердно-шлуночкового вузла.

Клітини шлуночкового кінцевого відділу ПСС мали імуногістохімічну специфічність, яка відрізняла їх від інших ланок – вони характеризувалися негативною реакцією із α -SMA та позитивною із MSA та NF (α -SMA⁻/MSA⁺/NF⁺). Незначний адгезивний потенціал на початку формування цього відділу відбивався на здатності клітин формувати ізольовані від скоротливого міокарда неорієнтовані скупчення; після зміни напрямку клітинної програми від проліферації (після міграції) на диференціювання відбувалося переструктурування груп у тяжі. Нервові закінчення не утворювали синапсів із цим видом провідних кардіоміоцитів.

Передсердний кінцевий відділ провідної системи складався із клітин, імуногістохімічна ха-

рактеристика яких в ембріональний період мала вигляд – $\alpha\text{-SMA}^{+(3)}/\text{MSA}^{+}/\text{NF}^{+}$, змінюючись на $\alpha\text{-SMA}^{+(1)}/\text{MSA}^{+}/\text{NF}^{-}$ після 10 тижня гестації, мало відрізняючись від типових передсердних кардіоміоцитів. Подібно до волокон Пуркінє, клітини цього відділу ПСС не формували контактів із нервовими закінченнями.

Інші характеристики адгезійного потенціалу (ступінь і терміни реалізації, розповсюдженість, спрямованість та видоспецифічність процесу) оцінювалися нами завдяки використанню лектина PNA, який специфічний до термінальних залишків $\beta\text{-D}$ -галактози, а також спираючись на дані літератури (Шаповалова Е.Ю., Луцик А.Д., 2000) про активацію агрегаційних властивостей клітин та ініціацію процесу диференціювання у разі присутності в структурі їхнього глікокалікса термінальних залишків $\beta\text{-D}$ -галактози.

При аналізі динаміки показників відносного об'єму PNA-позитивних ділянок у складі структурних елементів провідної системи було встановлено, що вони прямо пропорційно пов'язані з рівнем їхньої проліферативної активності. Наприклад, у складі синусно-передсердного вузла відбувалося зниження кількісних характеристик накопичення лектину арахісу у структурі провідних кардіоміоцитів, починаючи з 8 тижня гестації, супроводжуючись зменшенням кількості мітотично активних клітин. Наші припущення про зв'язок між двома явищами підтверджуються даними іншого дослідження (Волошин Н.А., Пашенко С.Н., 2004), які свідчать про те, що зростання експресії β -галактозидози, яка від'єднує галактозу від олігосахаридів, свідчить про вихід клітин з мітотичного циклу. Саме цей процес, на нашу думку, і призводить до зменшення кількості PNA-позитивних клітин, що ми констатували при вивченні всіх ланок ПСС.

Якщо враховувати дані, які свідчать про утворення частини міжклітинних з'єднань в процесі реалізації мітотичного поділу, можна припустити, що активація процесу формування системи спеціалізованих контактів між провідними кардіоміоцитами відбувається без участі $\beta\text{-D}$ -галактозильних термінальних залишків на поверхні клітин, оскільки позитивна динаміка кількісних показників спеціалізованих контактів спостерігалася нами вже після реалізації кардіоміоцитами проліферативного потенціалу.

Дослідження якісних характеристик та кількісних параметрів різних видів міжклітинних з'єднань, які утворюють провідні кардіоміоцити між собою та із скоротливими клітинами, було проведено на щурах, однак схожість процесів ультраструктурного диференціювання клітин провідної системи щурів та людини дозволяють проведення екстраполяції результатів на серце людини.

Так, клітини синусно-передсердного вузла формували три різновиди контактів – зони зли-

пання, десмосоми та, найбільш численні, щілинні контакти. Важливими періодами становлення системи міжклітинних з'єднань у клітинах СПВ був початковий етап розвитку вузла, а також період перед та одразу після народження щурят, коли відбувалося стрімке зростання загальної та індивідуальної кількості спеціалізованих контактів. У ранньому періоді кардіоміоцити активніше формували адгезійні зони з'єднання, що було спряжене із процесом високої мітотичної активності; ми припускаємо, що цей процес відбувається за участю галактозовмісних глікокон'югатів у складі мембран, оскільки на початку гістогенезу СПВ у людини кардіоміоцити активно накопичували лектин арахісу. Уповільнення темпів збільшення площі зон злипання із паралельним падінням мітотичної активності супроводжувалося ростом кількісних характеристик нексусів та десмосом, а також зниженням кількості PNA-позитивних клітин.

У складі передсердно-шлуночкового вузла спостерігалися схожі тенденції спряженості процесів утворення контактів та мітотичної активності. При цьому, крива показника кількості нексусів у період після народження мала більш стрімкий характер, порівняно із пренатальним онтогенезом. Чисельність десмосомних контактів збільшувалася протягом досліджуваного періоду неоднорідно, маючи чотири складові динамічної кривої: повільну на початковому етапі, стрімку у термін перед народженням та протягом першого тижня життя, майже плато протягом другого та третього тижня життя та повторний період активного збільшення. Крива зростання квантифікаційних характеристик зон злипання мала дуже повільний характер, що було пов'язано із іншим принципом їхнього утворення – не шляхом збільшення чисельності, а шляхом "наращення" індивідуальної площі. Стрімке зростання кількості нексусів та десмосом не співпадало із піком проліферативної активності кардіоміоцитів, як це спостерігалось при вивченні динаміки кількісних параметрів зон злипання, що ми пов'язували із залученням у процес утворення адгезивних контактів термінальних залишків $\beta\text{-D}$ -галактози, оскільки у часі напрямом змін цих категорій співпадав.

Процес утворення зон злипання та десмосом у передсердно-шлуночковому пучку не мав виразних сплесків активності, а перебігав досить рівномірно протягом всього терміну формування ПШП; формування нексусів, як найбільш чисельного виду контакту між провідними клітинами у складі пучка, активно відбувалося у термін, наближений до народження, а також після народження, що може бути пов'язане із зростанням активності серцевого м'яза загалом.

Формування системи спеціалізованих контактів між кардіоміоцитами у складі передсердного та шлуночкового кінцевих відділів провід-

ної системи серця мало схожі ознаки кількісних та якісних змін, перебіг яких проходив нерівномірно: чисельність нексусів найбільш активно зростала у ранньому періоді розвитку цієї ланки системи, змінюючись у подальшому на більш повільний характер кривої динаміки; десмосомні контакти та зони злипання мали пік зростання параметру у період, наближений до народження; кількісні характеристики у період після народження уповільнювалися, компенсуючись швидкими темпами диференціювання структури контактів, які мали зрілий вигляд вже до кінця 3 тижня життя шурів.

Слід зазначити, що кінцева ланка провідної системи у складі шлуночків реалізувала проліферативний потенціал наприкінці ембріонального - початку плодового періоду, що відповідало періоду перед народженням у щура, впродовж якого спостерігалася найбільш активна динаміка зростання кількості зон злипання. Однак, саме у термін з 10 до 14 тижня пренатального розвитку людини відбувалося різке зниження відносного об'єму PNA-позитивних клітин, що свідчить про відсутність зв'язку між наявністю β -D-галактокон'югатів у складі клітин Пуркінє та утворенням адгезивного типу контактів. На нашу думку, це пов'язано із тим, що у серці щура відсутні типові волокна Пуркінє, які можна спостерігати у міокарді людини, а тому розвиток цієї ланки відбувається із залученням інших компонентів мембран кардіоміоцитів за схожим із скоротливими міоцитами механізмом.

Деяко інші паралелі спостерігалися у передсердному кінцевому відділі – висока проліферативна активність клітин стінки передсердь у людини співпадала із зростанням кількості PNA-позитивних клітин та відповідала за строками позитивній динаміці кількісних параметрів щілинних контактів, а зниження кількості клітин на стадії мітозу не супроводжувалося редукцією залишків β -D-галактози та характеризувалося початком активної позитивної динаміки кількісних характеристик адгезійного типу контактів, що свідчить про підтвердження припущень щодо участі β -D-галактокон'югатів у формуванні зон злипання та плям злипання (десмосом); процеси ж інгібіції мітозу тут, скоріше за все, пов'язані не з редукцією галактозильних залишків, а відбуваються за іншим механізмом.

При дослідженні процесів диференціювання міжклітинних контактів у ланках провідної системи ми оцінювали також структурну частину цього процесу з метою екстраполяції даних на серце людини. При появі перших зон злипання у примембранних їхніх ділянках спостерігалася електронно-щільна речовина, яка розподілялася несиметрично – з боку обох чи тільки однієї з клітин. Характерною була відсутність внутрішньоклітинних органел у цих зонах, окрім незначної кількості міофіламентів. У подальшому від-

бувалося збільшення товщини контрастної речовини у кортикальних ділянках мембран із зростанням симетричності та збільшенням, таким чином, індивідуальної площі контакту. Форма зон злипання була різною – від лінійної до сходовподібної з орієнтацією під прямим та іншими кутами відносно поздовжньої вісі міофібрил. Довгі зони злипання серед провідних кардіоміоцитів зустрічалися рідко. Локалізація цього виду контакту відповідала у зрілих клітинах ділянці Z-диску в складі прилеглих до нього міофібрил. Найменша кількість зон злипання спостерігалася у складі клітин синусно-передсердного вузла.

Щілинний вид контакту на ранніх етапах розвитку спостерігався у вигляді коротких (майже точкоподібних) мембранних структур із локалізацією у незначній кількості як у прикінцевих зонах (поряд із зонами злипання, так і на бічних поверхнях (у більшій кількості) (рис. 6).

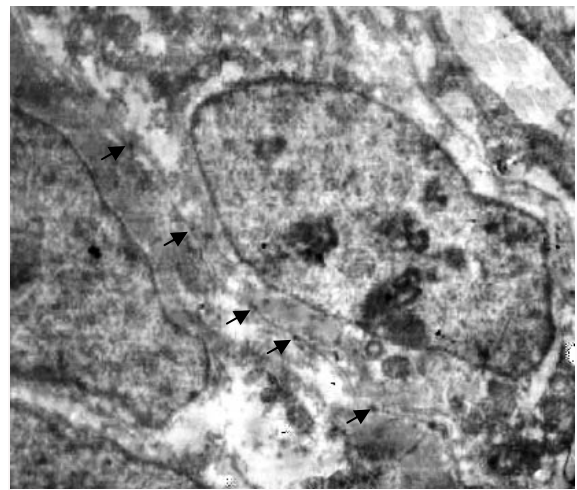


Рис. 6. Електроннограма провідного кардіоміоцита серця щура на 20 добу ембріогенеза. $\times 10000$. Стрілками вказані точкоподібні нексуси.

Відстань між мембранами була значною, порівняно із кінцевою стадією. У процесі диференціювання мембрани сусідніх клітин у складі нексусів поступово наближувалися одна до одної, супроводжуючись накопиченням невеликої кількості контрасту у міжмембранній щілині. Цей вид контакту був найбільш чисельним серед інших у складі провідних кардіоміоцитів і характеризувався розташуванням, у більшості, на бічних поверхнях клітин.

Плями злипання, або десмосоми, із самого початку свого розвитку мали вигляд контрастно насичених ділянок клітинних мембран контактуючих клітин із більшою за розмірами міжклітинною щілиною, порівняно із нексусами, а також характеризувалися присутністю міжмембранної електронно-щільної речовини; локалізо-

вана у внутрішньому примембранному шарі плазмолемми контрастна речовина розподілялася, як і у зонах злипання, несиметрично у сусідніх клітинах, із відсутністю у ділянках розміщення десмосомного з'єднання міофіламентів, на відміну від зон злипання. У сформованому вигляді десмосомні контакти мали незначну індивідуальну площу, порівняно із ділянками адгезії, але найбільшу серед вивчених видів контактів за розміром міжмембранну щілину, заповнену контрастною речовиною.

Гістогенетичний процес у провідних кардіоміоцитах, який реалізується останнім та триває довше за всі інші – є процес диференціювання, який передбачає набуття клітиною дефінітивних ультраструктурних характеристик. Динаміку та гетерогенність диференціювання провідних клітин серця людини ми оцінювали за результатами використання м'язово-специфічного антигену (MSA) та аналізуючи зміни гістоструктурних особливостей кардіоміоцитів протягом 4-14 тижня пренатального онтогенезу.

Клітини синусно-передсердного вузла поділялися на 2 групи MSA⁻ та MSA⁺. Перші мали незначну кількість непорядкованих міофіламентів, яка зберігалася на максимально досліджуванних строках. Другий вид клітин містив більшу кількість впорядкованих міофіламентів із формуванням міофібрил довжиною у декілька саркомерів. Вони мали тенденцію до зростання інтенсивності реакції із MSA (що свідчило про темпи формування міофібрил), яка зростала на початковому етапі розвитку СПВ, після чого зберігалася до 14 тижня. На нашу думку, це свідчить про те, що провідні клітини синусно-передсердного вузла набувають ознак кінцевої стадії диференціювання дуже рано, порівняно із іншими клітинами міокарда.

Для кардіоміоцитів передсердно-шлуночкового вузла та передсердної частини однойменного пучка визначалися схожі темпи диференціювання. Накопичення MSA відбувалося у клітинах на ранніх етапах розвитку вузла із зростанням інтенсивності реакції, рівень якої потім був стабільний протягом всього терміну дослідження. Дещо із затримкою відбувалося формування і, відповідно, диференціювання клітин шлуночкової частини ППП – вони поступово накопичували MSA протягом 6-10 тижня гестації.

Кінцевий відділ ПСС у складі міокарда передсердь містив кардіоміоцити, які експресували MSA на високому рівні вже на 5 тижні гестації, що було вище рівня у скоротливих кардіоміоцитах, за рахунок яких відбувалося потовщення стінок передсердних камер. Ранні MSA⁺ кардіоміоцити зберігали рівень інтенсивності реакції протягом досліджуваного періоду, якого пізніше досягав і скоротливий тип новоутворених клітин. Отже, процеси міофібрилогенезу відбувалися у клітинах ПСС швидше, порівняно із скорот-

ливими кардіоміоцитами, що може свідчити про більш високі темпи набуття загальної зрілості провідними кардіоміоцитами. Клітини шлуночкового кінцевого відділу набували ознак диференційованих пізніше за інші ланки провідної системи, що пов'язано, можливо, із появою їх у останню чергу. Накопичення MSA відбувалося в них повільно, не досягаючи рівня скоротливих кардіоміоцитів шлуночків.

Таким чином, загальною тенденцією процесу диференціювання у клітинах провідної системи серця людини є набуття ними гістоструктурних ознак зрілих клітин впродовж ембріонального та раннього плодового періоду, що, однак, не свідчить про завершення диференціювання на ультраструктурному рівні. Раніше за всі провідні клітини перебіг процесу диференціювання відбувався у клітинах вузлової частини ПСС; клітини шлуночкового кінцевого відділу набували ознак дефінітивних останніми.

Процеси клітинної загибелі, які реалізуються у ембріональному міокарді за механізмом апоптозу, вивчалися нами за допомогою маркерів Вах та CD95 (Fas/APO1). Протягом всього досліджуваного терміну апоптотичні клітини були малочисельними не тільки у ділянках розвитку структурних елементів провідної системи, але і у міокарді взагалі. Апоптотичний індекс складав не більше $7 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$). Характерною була топологія розподілення маркерів: CD95-позитивні спостерігалися тільки у ранньому серці людини на стадії появи перших ендотеліальних клітин у субепікардіальному шарі міокарда шлуночків, передсердь та ланок провідної системи серця; Вах-позитивні містилися у ділянках активної проліферації, однак теж у незначній кількості.

При розвитку синусно-передсердного вузла на 6 тижні розвитку були присутні Вах-позитивні та CD95-позитивні клітини (рис. 7); другі зникали вже на 8 тижні гестації.

Таким чином, процеси апоптозу не мають значного впливу на розвиток провідної системи серця, оскільки кількість клітин на стадії апоптотичної загибелі протягом всього періоду дослідження у складі всіх ланок ПСС була незначною і, навіть, не відображала рівня проліферативної активності. На наш погляд, це пов'язано із тим, що апоптоз – це не основний і не єдиний спосіб регуляції гістогенетичних процесів у провідній системі, що розвивається, та у міокарді в цілому. Враховуючи відсутність реакції клітин із каспазою-1 та каспазою-3 при дослідженні, можна стверджувати, що існують інші – каспазозалежні – механізми контролю як розміру клітинної популяції, так і змін у її складі, які спостерігаються у зрілому серці. Підтвердження цього є дані досліджень (Sallee D., 2004; Манских В. Н., 2007), які свідчать про роль апоптозу більше при розвитку патологічних станів у серці – ішемії

міокарда, кардіоміопатіях та інших.

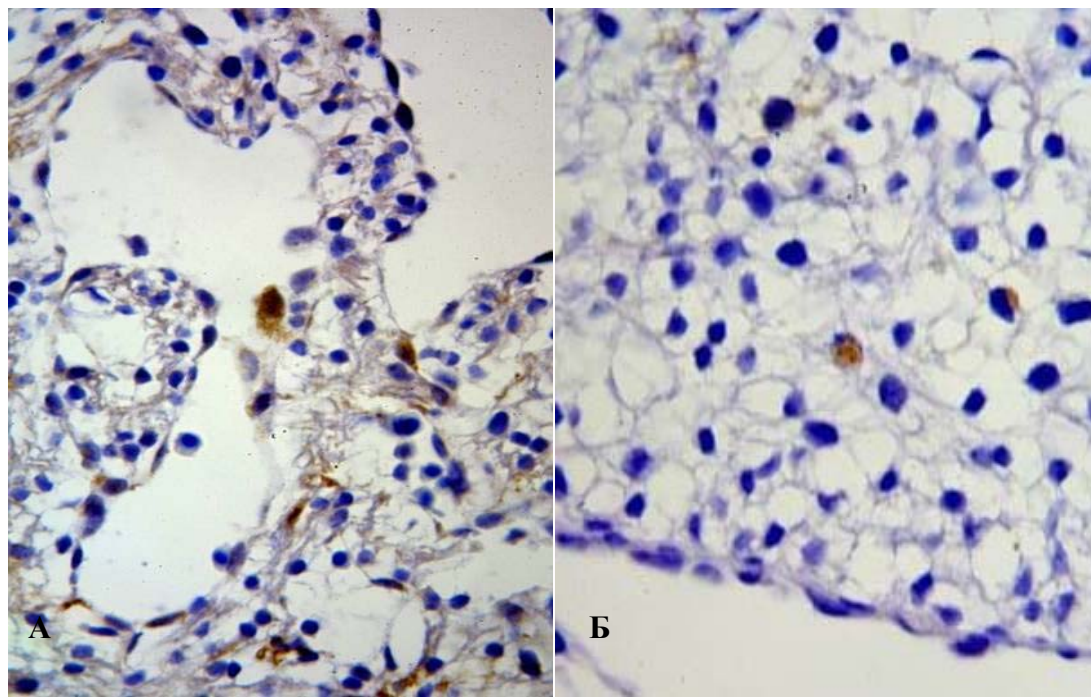


Рис. 7. Ділянки шлуночків серця людини на 6 тижні гестації. Обробка бах (А) та CD95 (Б). ×1000.

Підсумок

Підсумовуючи все вищевикладене, можливо говорити про те, що процеси гістогенезу, які відбуваються шляхом реалізації міграційного, адгезійного, проліферативного потенціалів за участю механізмів апоптозної та інших видів регуляції чисельності клітинної популяції та присутності різних диферонів, з утворенням системи спеціалізованих міжклітинних контактів, перебігають у різних ланках провідної системи асинхронно та

характеризуються схожими алгоритмами при порівнянні між собою гістогенетичних перетворень структури вузлів, а також при проведенні паралелей між іншими структурними компонентами ПСС із збереженням при цьому індивідуальних особливостей гістогенезу кожної.

Перспективи подальших розробок пов'язані з вивченням впливу онтогенетичного розвитку провідної системи серця на формування тканинної організації міокарда.

Літературні джерела

Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк. – Львів : Кальварія, 2005. – 554 с.

Волкова О. В. Эмбриогенез и возрастная гистология внутренних органов человека / О. В. Волкова, М. И. Пекарский. - М. : Медицина, 1976. – 412 с.

Волосовець О. П. Педіатричні аспекти ведення дітей з природженими вадами серця / Волосовець О. П., Сенаторова Г. С., Гончарь М. О. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2008. – 215 с.

Волошин Н. А. Роль лектинов в диагностике и лечении злокачественных новообразований / Н. А. Волошин, С. Н. Пашенко // Запорожский мед. журн. – 2004. – № 3. – С. 93–96.

Галич И. П. Изменение гликозилирования при онкогенезе и развитии других патологических процессов / И. П. Галич, Н. В. Евтушенко //

Онкология. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 4–9.

Митрофанова Л. Б. Гистологическая и электрофизиологическая характеристика задне-верхней части межпредсердной перегородки / Л. Б. Митрофанова, Е. Н. Михайлов, Д. С. Лебедев // Вестник аритмологии. – 2008. – № 52. – С. 20–26.

Динов Б. А. Прогнозирование течения и оценки тяжести полных атриовентрикулярных блокад у детей / Б. А. Динов, Ю. М. Белозеров // Вест. Аритм. – 2006. – Т. 4, № 2. – С. 15–19.

Изменение уровня сывороточных аутоантител класса IgG к ряду белков нервной ткани у больных с жизнеугрожающими аритмиями / Т. П. Ключник, Е. В. Даниловская, О. Е. Ватолкина [и др.] // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. – 1988. – Т. 125, № 6. – С. 677–679.

Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / Луцик

А. Д., Детюк Е. С., Луцик М. Д. ; под ред. Е. Н. Панасюка. – Львов : Вища шк., 1989. – 144 с.

Манских В. Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение / В. Н. Манских // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 11. – С. 909–915.

Мутафьян О. А. Пороки сердца у детей и подростков / О. А. Мутафьян. – М. : ГЭОТАР, 2009. – 556 с.

Пат. 51942 Україна МПК G 01 N 1/00 Спосіб вимірювання мікроскопічних структур / О. Ю. Потоцька, А. О. Горбунов, І. В. Твердохліб, Д. Г. Мурашкіна, І. С. Хріпков, Ю. В. Сілкіна ; заявник та патентновласник Дніпропетровська державна медична академія. – № у 2010 00615 ; заявл. 22.01.10 ; опубл. 10.08.10, Бюл. № 15.

Пат. 52333 Україна МПК G 01 N 1/00 Спосіб обчислення рівня міграційно-адгезійного потенціалу ембріональних клітин / Ю. В. Сілкіна, І. В. Твердохліб, А. О. Горбунов, О. Ю. Потоцька, Д. Г. Мурашкіна ; заявник та патентновласник Дніпропетровська державна медична академія. – № у 2010 01471 ; заявл. 12.02.10 ; опубл. 25.08.10, Бюл. № 16.

Результаты анализа интраоперационных биопсий миокарда у детей с тетрадой Фалло / И. Ф. Егорова, Р. А. Серов, М. Р. Туманян, А. С. Шарыкин // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2001. – № 4. – С. 8.

Шаповалова Е. Ю. Изменения углеводного состава тканей в процессе раннего эмбрионального гистогенеза дыхательной системы у человека / Е. Ю. Шаповалова, А. Д. Луцик // Таврич. медико-биолог. вестник. – 2000. – № 1–2. – С. 175–178.

Development of the cardiac pacemaking and conduction system / R. Gourdie, B. Harris, J. Bound [et al.] // Birth Defects Res. – 2003. – Vol. 69. – P. 46–57.

Ansari A. Distribution of the Purkinje fibres in the sheep heart / A. Ansari, S. Ho, R. Anderson // Anat. Rec. – 1999. – Vol. 254. – P. 92–97.

Fas-ligand gene transfer to the embryonic heart induces programmed cell death and outflow tract defects / D. Sallee, Y. Qiu, J. Liu [et al.] // Dev Biol. – 2004. – Vol. 267, № 2 P. 309–19.

Franco D. Molecular characterization of the ventricular conduction system in the developing mouse heart: topographical correlation in normal and congenitally malformed hearts / D. Franco, J. Icardo // Cardiovascular Research. – 2001. – Vol. 49, № 2. – P. 417–429.

James T. The internodal pathways of the human heart / T. James // Prog. Cardiovasc. Dis. – 2001. – Vol. 43, № 6. – P.495-535.

Moorman A. Development of the cardiac conduction system: a matter of chamber development / A. Moorman, V. Christoffels // Novartis Found. Symp. – 2003. – Vol. 250. P. 25–34.

Morphology of inter-atrial conduction routes in patients with atrial fibrillation / P. Platonov, L. Mitrofanova, L. Chireikin [et al.] // Europace. – 2002. – Vol. 4, № 2. – P. 183–192.

Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system / S. Rentschler, J. Zander, K. Meyers [et al.] // PNAS. – 2002. – Vol. 99, № 16. – P. 10464-10469.

New method for AF ablation during sinus rhythm based on detecting the “AF-Nests” pacing / J. Pachón, E. Pachón, T. Lobo // Clin. Electrophysiol. – 2006. – Vol. 29, № 3. – P. 318–322.

Observations on the development of the human atrioventricular node and bundle / R. Truex, T. Marino, D. Marino // Anat. Rec. – 1978. – Vol. 192, № 3. – P. 337–350.

Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels / J. Liu, H. Dobrzynski, J. Yanni [et al.] // Cardiovascular Research. – 2007. – Vol. 73, № 4. P. 729–738.

Skeletal muscle-specific myosin binding protein-H is expressed in Purkinje fibers of the cardiac conduction system / T. Alyonicheva, L. Cohen-Gould, C. Siewert [et al.] // Circ. Res. – 1997. – Vol. 80. – P. 665-672.

Suárez-Mier M. Histopathology of the conduction system in sudden infant death / M. Suárez-Mier, B. Aguilera // Forensic Science International. – 1998. – Vol. 93, № 2. – P. 143-154.

Šolc D. The heart and heart conducting system in the kingdom of animals: A comparative approach to its evolution / D. Šolc // Exp. Clin. Cardiol. – 2007. – Vol. 12, № 3. – P. 113–118.

Targeting and functional role of N-RAP, a nebulin-related LIM protein, during myofibril assembly in cultured chick cardiomyocytes / S. Carroll, A. Herrere, R. Horowitz // J. Cell Sci. – 2001. – Vol. 114, № 23. – P. 4229–4238.

The neural crest is contiguous with the cardiac conduction system in the mouse embryo: a role in induction? / R. Poelmann, M. Jongbloed, D. Molin [et al.] // Anat. Embryol (Berl). – 2004. – Vol. 208, № 5. P. 389–393.

The development of the cardiac specialized tissue / R. Anderson, A. Becker, A. Wenink // The conduction system of the heart. – Leiden : HE Stenfert Kroese, 1976. – 142 p.

Силкина Ю.В. Гистогенетические преобразования проводящей системы сердца.

Резюме. Были исследованы сердца эмбрионов и плодов человека, а также сердца эмбрионов, новорожденных и зрелых крыс. Исследование проводилось с использованием панели антител (NF, α -SMA, MSA, neuregulin, Ki-67, bax, CD95), панели лектинов (WGA, PNA, HPA, SBA, SNA), электронной микрос-

копии. Было установлено, что кардиомиоциты стенок предсердий и трабекул желудочков эмбрионального сердца человека экспрессируют антигенные детерминанты, специфичные для клеток дефинитивной проводящей системы – NF и α -SMA, формируя пути проведения импульсов для сокращения в условиях отсутствия сформированной проводящей системы. Регрессия протеинов происходит по мере формирования дефинитивной ПСС, оставаясь на продолжительное время только в кардиомиоцитах ее предсердного конечного отдела. Последние сохраняют эмбриональные свойства и в зрелом сердце. Развитие всех отделов проводящей системы, за исключением конечных ее отделов, тесно взаимосвязано с гистогенезом нервной системы, поскольку увеличение относительного объема нервных волокон в составе структурных компонентов системы прямо коррелирует как со степенью уплотнения клеток узловой части и предсердно-желудочкового пучка, так и со скоростью их дифференцировки. Инициация апоптоза клеток проводящей системы происходит по bax-зависимому и Fas-зависимому механизмам, направленным, в первом случае, на поддержание клеточной популяции, а во втором - на процессы заселения васкулогенных клеток на территорию компонентов ПСС. Процессы апоптоза на территории структурных элементов проводящей системы в целом малочисленны. Срок, на котором проводящая система имеет вид единой системы, приходится на 11 неделю гестации человека, однако процесс дифференцировки клеток проводящей системы к этому сроку не завершается, и в первую очередь это касается системы специализированных межклеточных соединений.

Ключевые слова: проводящая система, гистогенез, эмбриональное сердце.