

УДК 611.12: 575.16 – 029.9

О.О. Савенкова, В.В. Кошарний, В.Ф. Шаторна

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ ТА ГІПЕРТЕРМІЇ НА КАРДІОГЕНЕЗ

Дніпропетровська державна медична академія (м. Дніпропетровськ)

Дане дослідження є фрагментом планової наукової роботи кафедри анатомії людини Дніпропетровської державної медичної академії «Морфогенез серця та судин після експериментальних втручань» (номер державної реєстрації 0106U012193).

Вступ. За останні десятиріччя виникли нові якісні зміни в розвитку методів лікування серцевих хвороб раніше неоперабельних дітей, особливо новонароджених та грудних, але потреби медичної галузі вимагають досконалого розуміння особливостей і закономірностей як нормального розвитку органа так і формування можливих вад. У зв'язку з посиленням негативного впливу екологічної обстановки на організм людини, зараз як ніколи, зростає інтерес спеціалістів як медицини так і біології до адаптаційних можливостей серцево-судинної системи та проблем виникнення вад розвитку [1, 2, 3, 4]. Тому в наш час набуває все більшого значення медична і порівняльна ембріологія та їх методи дослідження [5, 6, 7, 8]. Сучасну науку цікавлять зміни в навколишньому середовищі, що виникають під впливом антропогенних факторів та можуть провокувати порушення розвитку органів (гіпоксія, гіпертермія, хімічні речовини, вплив опромінення та ін.) [9, 10, 11]. До теперішнього часу відсутня в необхідному обсязі інформація про морфогенетичні закономірності змін, що виникають на етапах раннього кардіогенезу в будові серця під впливом тих чи інших факторів. Серед цих факторів досить часто зустрічаються такі, як гіпертермія та гіпоксія, але дослідження впливу зазначених факторів не виявляють механізму та термінів ембріогенезу, коли можливим стає утворення аномалії [12, 13]. Можливість аналізу морфогенетичних змін у серці при формуванні вад розвитку серця в експериментальних моделях цікавить ембріологів та лікарів у зв'язку з тим, що безпосереднє спостереження за розвитком вад у людини неможливо.

Метою дослідження було встановлення впливу гіпоксії та гіпертермії на кардіогенез піддослідних тварин.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом дослідження послужили 55 сердець ембріонів білих безпородних щурів, які отримувались на фіксованих термінах вагітності в

лабораторних умовах за загальноприйнятими методиками. В ході дослідження використали експериментальну модель гіпоксії та гіпертермії у дослідних тварин. Підвищення температури у щурів викликали шляхом однократного внутрішньоочеревинного введення пірогеналу в дозі 3,0 мг/кг вагітній самиці. Вплив гіпоксією проводився згідно рекомендацій Н.Ф.Іваницької (1976) підшкірним введенням нітрату натрію (50 мг/кг) одноразово.

Для виконання поставленої задачі використовували окрім стандартних морфологічних також і сучасні методи дослідження – імуногістохімічні маркери. Імуногістохімічні методи застосовувалися для оцінки перебігу кардіогенезу в нормі та змін основних гістогенетичних процесів, їх співвідношень та виявлення термінів і етапів васкулогенезу серця. Ми проводили аналіз даних як після впливу гіпертермією так і гіпоксією, що дало можливість співставити результати для визначення терміну найбільшого впливу та порушень напрямків гістогенетичних процесів. В роботі використовували наступні маркери:

- CD34 – цитоспецифічний маркер ендотелію. Використання саме цього маркера дало можливість визначити початок та напрямок перших етапів утворення судин серця (ангіогенез);

- α -sma – маркер гладенької м'язової тканини, використання якого дало можливість не тільки визначити основні етапи васкулогенезу, але й дозволило відстежити диференціювання первинних судин серця, що розвивається у процесі кардіогенезу та зміни, які відбуваються після впливу гіпоксії та гіпертермії;

- bcl-2 – маркер апоптозу – досліджували запрограмовану клітинну загибель кардіоміоцитів на ранніх етапах кардіогенезу та порушення цих процесів після впливу гіпоксії і гіпертермії;

- ядерний маркер Ki67 – маркер проліферації, який дозволяє позначити всі клітини, що знаходяться на різних стадіях мітозу.

Результати досліджень та їх обговорення. Наші дослідження виявили, що терміни появи перших судин серця відрізнялись в різних камерах та структурах раннього ембріонального серця щура. Для дослідження ангіо- та васкулогенезу міокарду, що формується, ви-

користували цитоспецифічний маркер CD-34, внутрішнім контролем постановочних реакцій було накопичення маркеру в ендокарді ембріонального серця, в той час як маркер гладенької м'язової мускулатури α -sma дозволив скласти уявлення про ступінь та термін диференціювання стінки первинних судин, що є важливим при трактуванні механізму утворення сухожилкових струн клапанного апарату. Яскравим прикладом градієнту накопичення маркерів ангиогенезу є делямінаційна пластинка шлуночків – структура яка дає початок формуванню соскоподібних м'язів, сухожилкових струн та стулок передсердно-шлуночкових клапанів. Результати дослідження показали, що процеси ангиогенезу відрізняються в різних частинах делямінаційної пластинки. В середній частині делямінаційної пластинки, яка кріпиться до стулки передсердно-шлуночкового клапану, накопичення зазначених маркерів майже не відбувалося. Це призводило до погіршення розвитку зазначеної ділянки, її витончення і переходу до стану первинної сухожилкової струни серця. В експериментальних групах піддослідних тварин незалежно від агенту впливу накопичення цих маркерів майже не відрізнялось від норми.

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 (рис.1).

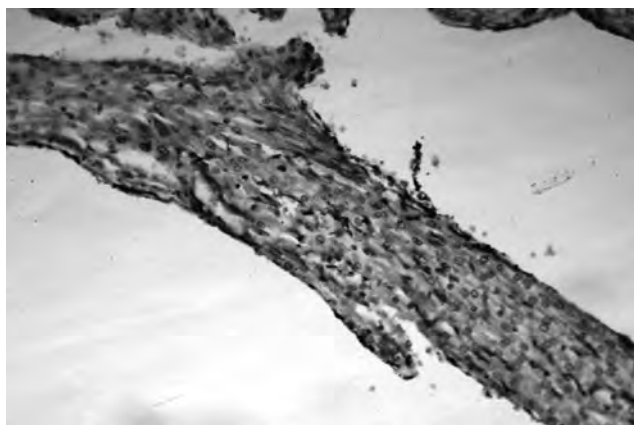


Рис.1. Первинні судини трабекули лівого шлуночку серця ембріону щура 17 доби розвитку після впливу гіпоксією. Коричневим кольором (накопиченням маркеру CD34) забарвлено ендотелій судин, що формуються та ендокард. Збільшення: ок.8 X об.10.

У зв'язку з тим, що формування судинного русла 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 передсердно-міокарду, що мали різний рівень експресії α -sma.

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. 2).

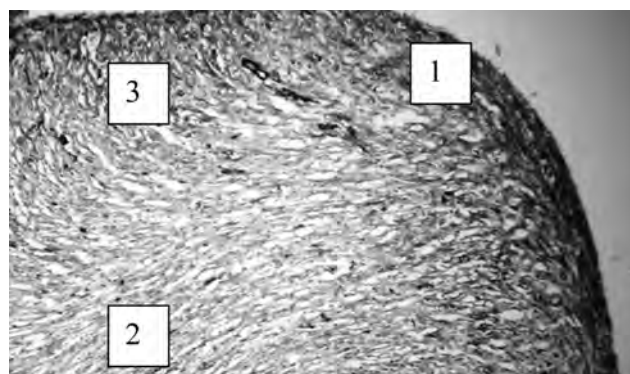


Рис.2. Накопичення маркеру α -sma (коричневий колір) в субепікардіальній зоні міокарду верхівки лівого шлуночку та в судинах міокарду серця ембріону щура 17 доби розвитку після впливу гіпоксією. Збільшення: ок.4 X об.10. **Позначення:** 1 – міокард субепікардіальної зони; 2 – компактний міокард; 3 – судини міокарду.

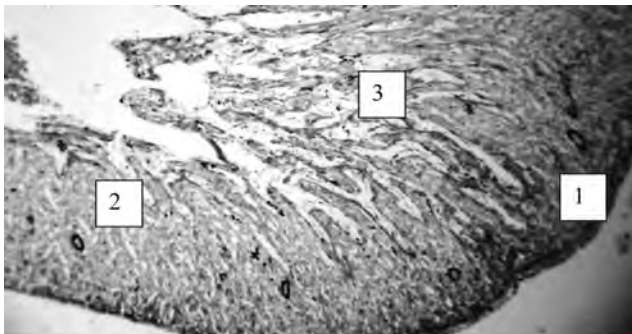


Рис.3. Градієнт накопичення маркеру α -sma (коричневий колір) в субепікардіальній зоні міокарду лівого шлуночку серця ембріону щура 17 доби розвитку після впливу гіпоксії. Збільшення: ок.8 X об.10. **Позначення:** 1 – міокард субепікардіальної зони; 2 – компактний міокард; 3 – трабекулярний міокард.

Накопичення маркеру α -sma спостерігалось також в трабекулярному міокарді шлуночків. Це свідчить про участь субепікардіального та трабекулярного міокарду у проведенні імпульсу в шлуночках (рис. 3). Компактний міокард не приймає участі у передачі імпульсу, а виконує лише скорочувальну функцію.

Внаслідок впливу гіпоксії на ембріонів щура ми спостерігали посилення накопичення маркеру α -sma в субепікардіальному та трабекулярному шарах міокарду шлуночків. Вплив гіпертермією не мав таких явних наслідків. Даних в науковій літературі для порівняння цього феномену з результатами досліджень інших вчених ми не знайшли.

Ми реалізували задачу провести порівняльний аналіз експресії антиапоптотичного білка bcl-2 та маркера проліферації клітин Ki-67, що надає змогу вірно трактувати напрямок основних гістогенетичних процесів, які відбуваються в ембріональному серці. Кількість апоптотичних клітин після злиття атривентрикулярних подушок за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж в експериментах з впливом гіпоксії. Істотне зменшення інтенсивності апоптотичних процесів в різних відділах раннього ембріонального серця безумовно має значення у формоутворенні вад серця після використання 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. Вплив гіпоксії призводив до загального зменшення апоптозів міокарду та стінок судин, а вплив високи-

ми температурами, навпроти, призводив до збільшення кількості апоптотичних клітин ембріонального серця.

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. Таке співвідношення характеризувало перевагу проліферації чи загибелі клітин, тобто можна було говорити про напрямок розвитку ділянки. 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.

Дослідження проліферації та клітинної загибелі, 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) та 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.

Висновки.

1. Використовуючи імуногістохімічні маркери, ми дослідили перебіг основних гістогенетичних процесів серця ембріона щура в нормі та після впливу фізичними факторами 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.

2. 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.

3. Дослідження процесів ангиогенезу та васкулогенезу міокарду камер серця продемонструвало, що перші судини формуються

в міокарді шлуночків, а диференціювання клітин відбувається швидше у компактному міокарді. Вплив гіпоксії призводить не лише до збільшення кількості і діаметру діючих судин, але й прискорює диференціювання стінок судин.

Перспективи подальшого дослідження. Перспективним, на наш погляд, є дослідження за допомогою методів імуногістохімії формування вад розвитку серця на тканинному та клітинному рівнях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анатомия сложных врожденных пороков сердца / [Г. С. Кирьякулов, В. А. Васильев, Т. В. Бородий и др.]. — Донецк : КИТИС, 2000. — 330 с.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Круцяк В. М. Значення ембріологічних досліджень на сучасному етапі розвитку морфологічної науки / В. М. Круцяк, В. І. Проняев, Ю. Т. Ахтемійчук // Буковинський медичний вісник. — 1998. — Т. 2, № 1. — С. 3–7.
6. 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.
7. Мутафьян О. А. Врожденные пороки сердца у детей / Мутафьян О. А. — Санкт-Петербург, 2002. — 210 с.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

УДК 611.12:575.16-029.9

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И ГИПЕРТЕРМИИ НА КАРДИОГЕНЕЗ

Савенкова Е.А., Кошарный В.В., Шаторная В.Ф.

Резюме. Исследовали базовые гистогенетические процессы, этапы васкулогенеза эмбрионального сердца крысы в норме и под воздействием физических факторов (недостаток кислорода, гипертермия). Материалом исследования стали 55 сердец эмбрионов крысы ранних этапов развития. Влияние физическими факторами на эмбрионы проводилось на сроке беременности самки крысы 8-9 суток. Для подтверждения влияния тератогенов и нарушений закладки и дифференцировки сосудов сердца использовались иммуногистохимические маркеры. Использование маркеров CD34 и α -sma позволило сопоставить процессы васкулогенеза с адаптационными механизмами тканей. Изучалось соотношение пролиферации и апоптоза. Мы выявили терминационные периоды кардиогенеза крысы—11 сутки эмбриогенеза.

Ключевые слова: кардиогенез, эмбриогенез, васкулогенез сердца.

UDC 611.12:575.16-029.9

INFLUENCE HYPOXIA and HYPERTERMIA on CARDIOGENESIS Savencova E.A.,

Kosharniy V.V., Shatornaja V.F.

Summary. Investigated base hystogenesis processes, stages vasculogenesis embryonic of a rat in norm and under the influence of physical factors (an oxygen lack, hyperthermia). A material of research of a steel of 55 hearts of embryos of a rat of early stages of development. Influence by physical factors on embryos was spent on term of pregnancy of a female of a rat of 8-9 days. For influence acknowledgement teratogenetic and infringements of a bookmark and a differentiation of vessels of heart were used immunohistochemical markers. Use of markers CD34 and α -sma has allowed to compare processes vasculogenesis with adaptable mechanisms of fabrics. The parity proliferations and apoptosis was studied. We have revealed the termination periods кардиогенеза rats - 11 days embryogenesis.

Key words: cardiogenesis, embryogenesis, vasculogenesis.

Стаття надійшла 12.01.2010 р.