

В.В. Кошарний, В.Ф. Шаторна

Використання імуногістохімічних методів дослідження в ембріології

Дніпропетровська державна медична академія

Ключові слова: кардіогенез, ембріогенез, септації серця.

Досліджували формоутворюючі процеси кардіогенезу ембріона щура в нормі та під впливом фізичних факторів (недостатність кисню, гіпертермія, НВЧ опромінення), виявляли термінаційні періоди розвитку окремих структур серця. Матеріалом дослідження стали 54 серцець ембріонів щура ранніх етапів розвитку. Вплив фізичними факторами на ембріони проводився опосередковано на терміні вагітності самиці щура 8-9 діб. Спостерігали порушення формування міжшлуночнової перетинки та клапанного апарату серця. Для підтвердження впливу тератогенів та порушень кардіогенезу використовувались імуногістохімічні маркери: α -SMA, CD-34, Ki67, bcl-2. Використання маркерів дозволило співставити процеси проліферації та апоптозу, процеси васкулогенезу з адаптаційними механізмами тканин.

Использование иммуногистохимических методов исследования в эмбриологии

В.В. Кошарный, В.Ф. Шаторная

Исследовали формообразовательные процессы кардиогенеза эмбриона крысы в норме и под воздействием физических факторов (гипоксия, гипертермия, НВЧ излучение), определяли терминационные периоды развития отдельных структур сердца. Материалом исследования послужили 54 сердца эмбрионов крысы ранних этапов развития. Влияние физическими факторами на эмбрионы проводилось опосредствовано на сроке беременности самки крысы 8-9 суток. Наблюдали нарушение формирования межжелудочковой перегородки и клапанного аппарата сердца. Для подтверждения влияния тератогенов и нарушений кардиогенеза использовались иммуногистохимические маркеры: α -SMA, CD-34, Ki67, bcl-2. Использование маркеров позволило сопоставить процессы пролиферации и апоптоза, процессы васкулогенеза с адаптационными механизмами тканей.

Ключевые слова: кардиогенез, эмбриогенез, септация сердца.**Патология.** – 2009. – Т.6, №2. – С. 66-69**Immunohistochemical investigation methods in embryology**

V.V. Kosharniy, V.F. Shatorna

The forming processes of cardiogenesis of rat's embryos were explored in a norm and under influence of physical factors (lack of oxygen, hyperthermy, electromagnetic radiation). The termination periods of development of heart's separate structures were determined. As a material of research 54 hearts of rat's embryos in early stages of their development were used. Embryos exposure to physical factors was conducted medietly during the 8th – 9th days of pregnancy. Violation of forming of interventricular septum and valvular vehicle of heart was found out during the investigation. To confirm teratogenetic influence and violations of cardiogenesis immunohistochemical markers were used: α -SMA, CD-34, Ki67, bcl-2. These markers allowed to confront the processes of proliferation and apoptosis, processes of vasculogenesis with the adaptation mechanisms of tissues.

Key words: cardiogenesis, embryogenesis, septation of heart.**Pathologia.** 2009; 6(2): 66-69

Дослідження нормального та аномального розвитку серця базуються на сучасній теоретичній кардіології. Знання механізмів нормального розвитку серця та виникнення можливих вад є важливим для розробки методів їх корекції [1, 8, 14, 19]. Сучасні наукові дослідження показали, що більшість уроджених вад є наслідком складної взаємодії генетичних факторів і зовнішніх шкідливих агентів [5, 6, 7, 17], тому набувають актуальності методи експериментальної медичної ембріології. Одною з переваг використання ембріональних методів є можливість моделювання вад розвитку та дослідження механізмів і термінів їх формування. Закордонними [15, 18] та українськими [5, 6, 9, 10, 11, 12, 13] ембріологами-дослідниками в експериментальних моделях був встановлений тісний зв'язок між строками впливу тератогенів та спектром і тяжкістю вад розвитку серця.

Тому в наш час актуальним є дослідження присвячені дослідженням перебігу гістогенетичних процесів та питанням медичної та порівняльної ембріології.

Загальновідомо, що окремі тканини і органи формуються в різні періоди зростання ембріона. При цьому тканини організму у момент максимальної інтенсивності процесів диференціювання стають високо чутливими до ушкодження дією зовнішнього середовища (іонізуюча

радіація, інфекції, вплив температури, недостатність кисню, хімічні агенти, електромагнітне випромінювання). 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 – 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. Дослідження перебігу основних гістогенетичних процесів в нормі та їх змін після впливу різних тератогенних чинників демонструє підвищену ураженість тих чи інших структур ембріонального серця на певних етапах розвитку та пояснює механізм виникнення вад розвитку органа. Одним з новітніх 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,

клітинної загибелі. Численні морфологічні дослідження, що проводилися на базах вітчизняних та закордонних наукових товариств, висвітлили закономірності становлення органної, тканинної та клітинної організації серця людини та інших біологічних об'єктів [2, 3, 4, 16, 20].

Метою дослідження стало виявлення змін в гістогенетичних процесах ембріонального серця експериментальних тварин в нормі та під впливом фізичних факторів (недостатність кисню, гіпертермія, НВЧ випромінювання) за допомогою використання імуногістохімічних маркерів.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом дослідження послужили 54 серця ембріонів щура ранніх етапів розвитку. З них 8 – контрольна група, 20 – результат впливу гіпертермією, 20 – результат впливу гіпоксією, 6 – результат опромінення НВЧ. Вплив ушкоджу вальними чинниками на ембріони проводився опосередковано у термін вагітності 8-9 діб. Саме в цей час процеси розвитку серця ембріону протікають активно, але не сформовано ще ні перетинки камер серця, ні клапанний апарат. Тобто цей часовий відрізок зазначався нами як можливий термінаційний і для підтвердження або спростування нашого припущення ми використовували імуногістохімічні маркери для дослідження гістогенетичних процесів ембріонального серця.

Підвищення температури викликали шляхом однократного внутрішньоочеревинного введення пірогеналу в дозі 3,0 мг/кг. Встановлено, що температура підвищувалася від $36,6 \pm 0,15$ °C до $38,9 \pm 0,11$ °C і утримувалася на даному рівні від 18 до 24 годин. Вплив гіпоксією проводився згідно рекомендацій Н.Ф. Іваницької (1976) та методичних рекомендацій міністерства охорони здоров'я України (2003р.) підшкірним введенням нітрату натрію (50 мг/кг) одноразово. Тобто формували гемічну гіпоксію щура та ембріонів. Вплив НВЧ-опромінювання проводили апаратом «Рамед-експерт 02» з частотою 42,3 ГГц, експозицією 30 хв. щодня протягом 10 днів на передню черевну стінку самиць.

Тварини утримувались в звичайних умовах віварію в стандартній клітці, за ними проводили систематичний нагляд. Експериментальні дослідження здійснені згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких, та інших наукових цілей» Страсбург, 18.03.86 р. По закінченню терміну досліду тварин декапітували, або після операції по забору ембріонів самиці гинули від передозування наркозу згідно з «Методичними рекомендації по виведенню тварин з експерименту» (1985).

Після забору ембріонів їх важили, вимірювали, промивали проточною водою, під контролем бінокулярного мікроскопа проводили розтин грудної клітки відсікали серце і проводили морфометрію ізольованого органа. При невеликих розмірах серця його після проводки (зневоднювання шляхом проведення їх через батарею спиртів зростаючої концентрації) заливали парафіном і готували парафінові блоки. З парафінових блоків виготовляли серії гісто-топографічних зрізів завтовшки 515 мкм. Після вміщення гістологічних зрізів у канадський бальзам або під скельце, їх вивчали під світловим мікроскопом Leica. За допомогою цифрового фотоапарата

Olympus проводили фотореєстрацію.

Для визначення перебігу основних гістогенетичних процесів протягом раннього ембріогенезу використані імуногістохімічні методи дослідження. Для дослідження процесів васкулогенезу використали цитоспецифічний маркер ендотелію CD-34. Маркер гладенької м'язової мускулатури α -sma дозволив скласти уяву про ступінь диференціювання судин та термін васкулогенезу різних структур серця. Проліферативну активність вивчали за допомогою моноклональних антитіл Ki-67 (MIB-1), які ідентифікують ядерний антиген, що присутній у більшості проліферативних клітин. Гістогенетичні процеси загибелі клітин виявляли маркером bcl-2 – маркер апоптозу. Дослідження імуногістохімічних особливостей структурних компонентів внутрішнього рельєфу шлуночків серця проведено на базі діагностичного центру при Дніпропетровській державній медичній академії (керівник патоморфологічного відділку – доктор медичних наук, професор Шпонька І.С.)

Результати та їх обговорення. Визначивши при попередніх дослідженнях основні етапи кардіогенезу експериментальних тварин припустили, що можливий термінаційний період розвитку серця є етап септації, тобто етап розподілу первинної серцевої трубки на окремі камери. Базуючись на цьому припущенні вплив гіпоксією та гіпертермією, а також НВЧ опромінювання ми проводили на етапах розвитку щура, що передують септації, а саме на 8-9 добі вагітності самиці щура. Дослідження дії на процеси септації ембріонального серця зазначених тератогенів продемонструвало їхній вплив на формування міжпередсердної (МПП) та міжшлуночкової перетинки (МШП) та передсердно-шлуночкових клапанів. Як показали гістологічні дослідження ранніх ембріональних сердець, вплив гіпоксії на ранніх етапах ембріогенезу істотно змінює алгоритм формування перегородки серця. Знижений вміст кисню приводив до патологічного осередкового потовщення міжшлуночкової перетинки в ембріонів шурів (рис. 1).

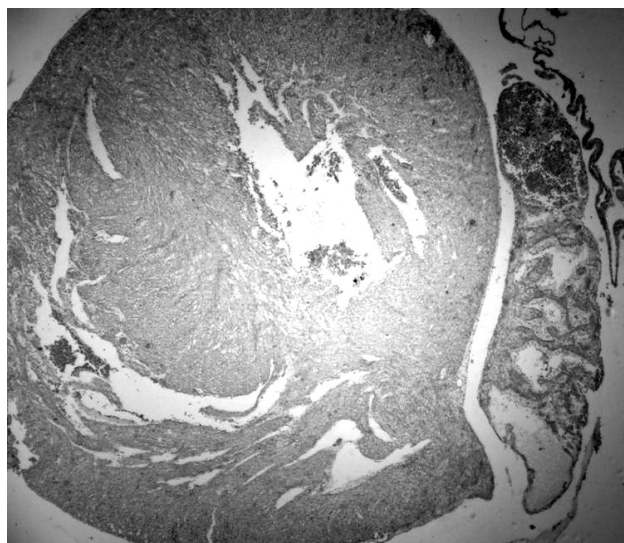


Рис. 1. Регіональне потовщення міжшлуночкової перегородки серця ембріона щура 11-ї доби розвитку після впливу гіпоксією. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб. ок8 х об10.

Аналогічна картина спостерігалась нами також після НВЧ опромінення. Явно виражена неоднорідність товщини міокарда, на нашу думку, може приводити до порушення динаміки скорочення раннього серця і в ембріонів контрольної групи нами не спостерігалась. Гіпоксія та НВЧ опромінення також провокували витончення стінок передсердь та міжпередсердної перегородки. Дефектів міжпередсердної перетинки нами не зустрічалось, але відставання за стадіями розвитку у формуванні самої перетинки відзначалось. Досить часто зустрічалось як результат впливу гіпоксії куляста форма серця та гіпертрофія міокарда (рис.1).

При впливі НВЧ-опромінення спостерігалось теж збільшення маси серця ембріонів шурів, без зміни зовнішньої форми.

Спектр вад розвитку серця був різноманітним, але порушення формування міжшлуночкової перетинки ми спостерігали як після впливу гіпоксією, НВЧ-опроміненням, так і після впливу гіпертермією. Діапазон порушень МШП досить великий: від міжшлуночкового отвору до витончення середньої частини перегородки та розшарування її на окремі трабекули. Найбільш часто трапляюся необ'єднання м'язової та мезенхімної частин міжшлуночкової перетинки, тобто наявність отвору у верхній частині МШП, чого не зустрічалось у контрольній групі. Другим порушенням процесів септації було утворення перфорацій у міжшлуночкової перегородці. Такі перетинки нагадували окремі трабекули між якими зберігались отвори-перфорації і які не розділяли повністю порожнини шлуночків і мали вигляд розвинутих синусоїдів. Відібрані об'єкти з дефектами розвитку більш детально вивчалися на гістологічному рівні.

Для дослідження впливу зазначених чинників на хід базових гістогенетичних процесів нами використовувались імуногістохімічні маркери. Використання саме 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 змогли вірно трактувати напрямок основних гістогенетичних процесів, які відбуваються в ембріональному серці. У ранніх ембріонів (11-12 доба розвитку), які пережили вплив фізичних факторів спостерігали локальне пригнічення проліферації та порушення процесів васкулогенезу та формоутворюючих процесів. Але дані по окремих експериментальних групах відрізнялись.

Кількість апоптотичних клітин після злиття атріовентрикулярних подушок за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж в експерименті з гіпертермією. Істотне зменшення інтенсивності апоптотичних процесів в різних відділах раннього ембріонального серця безумовно має значення у формоутворенні вад серця після використаних тератогенів, але в нашому дослідженні постійно зустрічалися ділянки (наприклад, в стінках крупних судин серця, міжшлуночкової перетинці), де виразність апоптозів, навпроти, посилювалася або мала нетипове положення. Це дозволяє припустити, що вплив тератогенів на ініціацію апоптотичної

активності не є однозначним. Вплив гіпоксією та НВЧ опроміненням призводив до загального зменшення апоптозів міокарда та стінок судин, а вплив високими температурами, навпроти, призводив до збільшення апоптозу 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 міокарда був підвищений як після гіпоксії так і після НВЧ опромінення, 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 та НВЧ опромінення достовірно збільшений як в передсердях так і в шлуночках, а після впливу підвищеною температурою – достовірно знижений у порівнянні з нормою.

Для дослідження васкулогенезу міокарда, 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 сухожилкових струн.

Поряд з зазначеними відходженнями від норми, як вплив фізичних факторів на хід кардіогенезу, нами спостерігалось також збільшення кількості діючих судин міокарда шлуночків (після впливу НВЧ опромінення) та збільшення діаметру цих судин (після впливу гіпоксією) (рис.2).

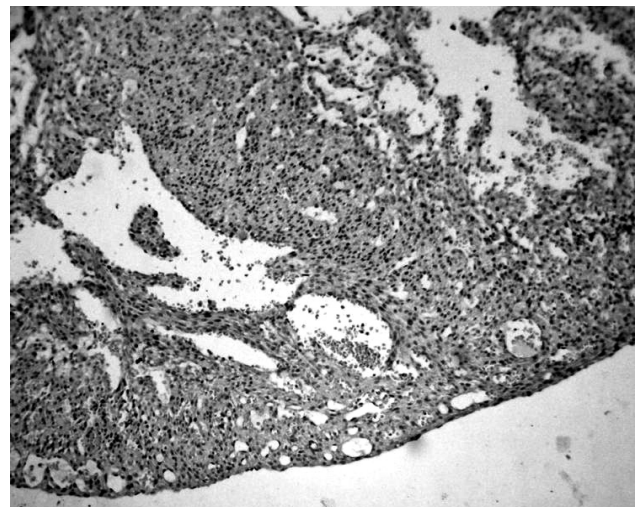


Рис. 2. Судини стінки правого шлуночку серця ембріона шура 11-ї доби розвитку після впливу гіпоксією. Забарвлення гематоксилін-еозин. 36. ок8 х об10.

Ці дані були підтверджені використанням маркерів α -SMA та CD-34. Маркер CD-34 - накопичувався в ендотелії навіть самих ранніх судин, а маркер α -SMA виявляв ступінь диференціювання судин, тобто ступінь формування стінки судини, бо накопичувався в середньому прошарку судини, що формується, а саме в гладенькій мускулатурі. Таким чином ми мали можливість виявляти як первинні судини та синусоїди так і спостерігати етапи формування судинного русла ембріонального серця.

Висновки. 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. Таким періодом для кардіогенезу щура є 9-10 стадія нормального розвитку. Вплив фізичними факторами саме в цей період неодмінно призводить до формування вад міжшлуночної перетинки, порушень розвитку міжпередсердної перетинки та впливає на формування судин міокарду. Вплив тератогенів на ініціацію апоптотичної та проліферативної не однозначний в різних ділянках серця, тому нами досліджувався проліферативно-апоптотичний індекс – як показник динаміки цих основних гістогенетичних процесів. Проліферативно-апоптотичний індекс після впливу гіпоксії та НВЧ опромінення достовірно збільшений як в передсердях, так і в шлуночках, а після впливу підвищеною температурою – достовірно нижчий у порівнянні з нормою.

Перспективи подальших досліджень. Порушення формування судинного русла та міжшлуночної перегородки може призвести до змін скорочувальної функції серця. Вияв механізму, що порушує злиття мезенхімної та м'язової частини міжшлуночної перегородки дозволить забезпечити корегування або запобігання формування зазначеної вади. Цікавим на наш погляд є подальше дослідження також папілярно-трабекулярного апарату серця після впливу фізичних факторів.

Література

1. 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. Дугадо, А.Ф. Синев // Вісник проблем морфології і медицини. – 2006. – В. 2. – С. 172-174.
2. Горелова Н. И. Иммуногистохимическая характеристика раннего кардиомиогенеза человека / Н. И. Горелова // Вісник морфології. — 2004. — Т. 10, № 2. — С. 242—245.
3. Горелова Н. И. Методы иммуноморфологии в изучении гистогенетических процессов раннего кардиомиогенеза / Н. И. Горелова, Ю. В. Силкина // Карповські читання : І наук. конф. : тези доп. — Дніпропетровськ, 2004. — С. 15—17.
4. Горелова Н. И. Иммуногистохимическая характеристика раннего кардиомиогенеза человека / Н. И. Горелова // Вісник морфології. — 2004. — Т. 10, № 2. — С. 242—245.

Відомості про авторів:

Кошарний Володимир Віталійович, кандидат медичних наук, викладач кафедри анатомії людини Дніпропетровської державної медичної академії.

Шаторна Віра Федорівна, кандидат медичних наук, доцент кафедри анатомії людини Дніпропетровської державної медичної академії.

Адреса для листування:

49008, м. Дніпропетровськ, вул. Робоча, 160, кв. 90; тел.: 8067-338-24-95.

5. Жаріков М.Ю., Кошарний В.В., Козловська О.Г. Особенности влияния экспериментальной коарктации аорты на стан міокарда і секреторних компонентів серця щурів / М.Ю.Жаріков, В.В. Кошарний, О.Г. Козловська // Таврический медицинский биологический вестник. - 2006.-Т. 9, № 3. - С.58-60.

6. Машталір М.А. Формування конусно-стовбурового відділу серця у мишачих та курячих зародків під впливом ретиноевої кислоти /М.А.Машталір // Медичні перспективи. 2006. - Т. №1. - С.8-12.

7. Мутафьян О.А. Врожденные пороки сердца у детей / О.А.Мутафьян // – Санкт-Петербург, 2002.– 210 с.

8. Нуджент Э.В. Врожденные пороки сердца // Клиническая кардиология. Под ред. Шланта К. и Александра Р.: Пер. с англ. – СПб.: Невский диалект, 2000. – С. 259-286.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. Экспериментальное моделирование врожденных пороков сердца и магистральных сосудов / Под редак. Г.С.Кирьякулова.- Київ: «Вища школа»- 1994.-158 с.

15. Atrial development in the human heart: an immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues / A. Wessels, R. H. Anderson, R. R. Markwald [et al.] // Anat. rec. — 2000. — Vol. 259, № 3. — P. 288—300.

16. Barry M.A, Behnke C.A, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anti-cancer drugs, toxins and hyperthermia. Biochem Pharmacol. 1990. - Vol.40. - P. 2353-2362.

17. 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.

18. Development of the papillary muscles of the mitral valve: morphogenetic background of parachute-like asymmetric mitral valves and other mitral valve anomalies / Oosthoek P.W., Wenink A.C., Wisse L.J., Gittenberger-de Groot A.C. // Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery. – 1998. – Vol.116, № 1. – P. 36-46.

19. Effects of environmental hyperthermia on cardiovascular function in the rat embryo / Nakazawa M., Miyagawa S.T., Morishima M., Kajio F., Takao A. // Pediatr Res. - 1991. -30(6). - P.505-508.

20. Yasuda K, Nakai A, Hatayama T, Nagata K. Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105. J Biol Chem. 1995. - Vol.270. - P. 29718-29723.