

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДУ «КРИМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ С.І. ГЕОРГІЄВСЬКОГО»

ПОТОЦЬКА ОЛЬГА ЮРІЇВНА

УДК 611.11.013.018:611.36:616-089.873

**ГІСТОГЕНЕЗ ЕПІКАРДА ТА ЕНДОТЕЛІЮ ВІНЦЕВИХ СУДИН
НА РАННІХ ЕТАПАХ ПРЕНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ
В НОРМІ ТА ЗА УМОВ ЗУПИНКИ РОЗВИТКУ ПЕЧІНКИ**

14.03.09 – гістологія, цитологія, ембріологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Сімферополь – 2012

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор Твердохліб Ігор Володимирович, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедра гістології, завідувач кафедри.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор Федонюк Лариса Ярославівна, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського» МОЗ України, кафедра медичної біології, завідувач кафедри;

доктор медичних наук, професор Задніпряний Ігор Володимирович, ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського» МОЗ України, кафедра нормальної анатомії, професор кафедри.

Захист відбудеться “ 17 ” жовтня 2012 р. об ___ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 52.600.02 при ДУ “Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського” МОЗ України (95006, м. Сімферополь, бульвар Леніна, 5/7).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ “Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського” МОЗ України (95006, м. Сімферополь, бульвар Леніна, 5/7).

Автореферат розісланий “ _____ ” _____ 2012 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

Г.О. Мороз

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ішемічна хвороба серця займає 1-е місце в світі серед причин смерті та складає 12,8% (Інформаційний бюлетень ВООЗ №310, червень 2011 р.); визначення ж ембріонального джерела коронарного ендотелію допоможе розробити низку новітніх методів по реваскуляризації ішемізованого міокарда (B. Zhou et al., 2011; N. Smart, 2011). У серії класичних експериментів було продемонстровано, що в ембріональному періоді донором більшості клітинних компонентів вінцевих судин виступає епікард (M. P. Vrancken Peeters et al., 1999). В експериментах *in vivo* було підтверджено диференціацію клітин дефінітивного епікарда інфарктної зони в гладкі м'язові клітини та фібробласти (B. Zhou et al., 2011). Проте дані у відношенні коронарного ендотелію продовжують залишатись суперечливими, і всі експерименти у напрямку отримання ендотеліальних клітин із зрілого епікарда виявляються марні, що вимагає уточнення джерела походження даної клітинної популяції (J. van Tuyn et al., 2007; G. del Monte et al., 2011).

За останніми даними, вади розвитку серця продовжують лишатись першими за частотою, що свідчить про складність ембріогенезу даного органу. Не дивлячись на те, що розвитку серця присвячено багато робіт, у тому числі й вітчизняної школи морфологів (В.О. Козлов, В.Ф. Шаторна, 2004; Г.С. Кирьякулов и соавт., 2007; М.А. Машталір, І.В. Твердохліб, 2008; Л.Я. Федонюк, 2009; Ю.В. Сілкина, 2010), вивченню питань походження епікарда майже не було приділено уваги. Епікард довгий час вважався найменш функціонально значущою оболонкою серця, проте досліді останніх 50 років неодноразово продемонстрували, що порушення ембріонального розвитку епікарда супроводжується цілою низкою вроджених вад серця (дефекти міжшлуночкової перегородки, порушення провідності серця, некомпактний міокард та ін.) (J. Männer et al., 2005; M. Suri et al., 2007), а повна блокада формування епікарда несумісна із життям зародка та веде до його загибелі (A.J. Watt et al., 2004).

Відомо, що під час ембріонального розвитку структури, що розташовані поруч, впливають одна на одну; цей феномен відомий як позиційна інформація (M. Kerszberg, L. Wolpert, 2007). У ряді робіт було виявлено існування такого взаємозв'язку між дивертикулом печінки та проепікардом, проте характер цих відношень залишається не з'ясованим та потребує подальших досліджень (Y. Ishii et al., 2007; J. Liu et al., 2010).

Вищезазначені факти свідчать про доцільність вивчення процесу ембріонального розвитку епікарда, його ролі у формуванні коронарного ендотелію та характеру взаємовідношень з прилеглими структурами, зокрема дивертикулом печінки (ДП) і венозним синусом (ВС).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана в рамках науково-дослідної теми кафедри гістології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Структурні перебудови компонентів серцево-судинної системи в умовах її нормального й аномального гістогенезу».

незу у людини й експериментальних тварин» (номер державної реєстрації 0111U006621).

Мета і завдання дослідження. Визначення гістогенетичних процесів, що лежать в основі формування епікарда та вінцевого ендотелію в нормі та за умов зупинки розвитку печінки.

Задачі дослідження:

1. Визначити джерела та спосіб генерації епікарда курячого ембріона.
2. Визначити джерело ендотелію вінцевих судин курячого ембріона та роль епікарда в його утворенні.
3. Визначити вплив зупинки розвитку печінки на на 14-й стадії за Hamburger, Hamilton на формування епікарда.
4. Визначити вплив зупинки розвитку печінки на 16-й стадії за Hamburger, Hamilton на розвиток епікарда та вінцевого ендотелію.
5. Визначити механізм утворення вінцевих судин ембріонів людини.
6. Визначити спосіб і термін сполучення вінцевих судин людини з вінцевим синусом.
7. Визначити спосіб і термін сполучення вінцевих судин людини з аортою.
8. Визначити основні джерела походження коронарного ендотелію людини.

Об'єкт дослідження – епікард і коронарний ендотелій ембріонів людини та курки.

Предмет дослідження – гістогенетичні перебудови проепікарда на етапах формування епікарда та ендотелію вінцевих судин у нормі та за умов абляції дивертикула печінки.

Методи дослідження. Гістологічні, які дозволили встановити морфогенетичні процеси, що лежать в основі формування епікарда та вінцевого ендотелію; морфометричні та стереологічні, які забезпечили отримання кількісних характеристик досліджуваних гістогенетичних перебудов; імуногістохімічні, що забезпечили визначення проліферативної активності клітин, динаміки експресії маркерів ендотелію та мезотелію; тривимірне комп'ютерне моделювання, яке дозволило оцінити просторові взаємовідношення досліджуваних об'єктів, їх поверхневих та об'ємних характеристик. Достовірність отриманих даних підтверджували статистичними методами.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше визначено, що у ембріонів людини неоваскулогенез спостерігається лише протягом перших етапів коронарогенезу, а після сполучення судин з ВС основним є механізм ангиогенезу. За допомогою імуногістохімічного методу отримані докази походження коронарного ендотелію ембріона людини з різних джерел, простежено його просторовий розподіл у серці від моменту появи до становлення ефективної системи циркуляції вінцевого кровообігу. Вперше описано CD34-позитивну популяцію клітин випускного тракту ембріонів людини, яка не бере участь у формуванні вінцевих судин. З'ясовано, що останні встановлюють контакт з венною частиною кровообігу за тиждень до моменту вростання в аорту. Доведено, що зупинка розвитку печінки на ранніх етапах пренатального онтогенезу призводить до порушення утворення епікарда та вінцевих судин і викликає за-

гибель ембріона. Вперше продемонстровано співіснування двох способів генерації епікарда курячого ембріона. Метод тривимірного комп'ютерного моделювання дозволив вперше визначити, що основним механізмом коронарогенезу курячого ембріона є ангиогенез.

Практичне значення одержаних результатів. Виконане дослідження поглиблює та доповнює відомості про взаємозв'язок між ембріональним розвитком печінки, епікарда, вінцевих судин та серця в цілому. Виявлені особливості та закономірності взаємовідношень досліджуваних ембріональних структур між собою розширюють уявлення про механізми формування вроджених вад серця та їх залежність від порушення ембріогенезу печінки на ранніх етапах пренатального онтогенезу, що може бути використане для вірної інтерпретації механізмів тератогенного впливу факторів, які викликають вроджені вади серця опосередковано через пригнічення розвитку печінки.

Отримані дані, які виступають аргументами на користь походження коронарного ендотелію з епікарда, створюють теоретичне підґрунтя для розробки методів по отриманню ендотеліальних клітин *in vitro* та *in vivo* з дефінітивного епікарда у хворих на ішемічну хворобу серця.

Розроблені в ході дисертаційної роботи патенти: «Спосіб вимірювання мікроскопічних структур» та «Спосіб оцінки морфофункціонального стану ембріональних мезенхімних структур» оптимізували морфометричний та, зокрема, стереологічний аналізи мікроскопічних структур та можуть бути використані у практиці наукових морфологічних лабораторій.

Результати дисертаційної роботи можуть бути впроваджені в навчальний процес і використані в науково-дослідних роботах кафедр гістології, цитології та ембріології; анатомії людини; патологічної анатомії, зосереджуючи увагу на екстракардіальному походженні епікарда та вінцевих судин.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес і використані у НДР кафедр гістології, цитології та ембріології: Запорізького державного медичного університету МОЗ України, Одеського національного медичного університету МОЗ України та Харківського національного медичного університету МОЗ України та кафедри анатомії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено патентний пошук та аналіз даних літератури, на основі чого сформульована ідея, визначена мета роботи. Розробку завдань дослідження здійснено разом із науковим керівником. Забір матеріалу для морфологічного дослідження проведено власноруч. Виконання імуногістохімічного дослідження проводилося на базі Діагностичного центру (ТОВ «Аптеки медичної академії», м. Дніпропетровськ) з урахуванням рекомендацій керівника лабораторії, доктора медичних наук, професора І.С. Шпонки. Дисертантом самостійно розроблені теоретичні та практичні положення роботи, здійснено аналіз та узагальнення результатів. Основні положення, висновки та практичні рекомендації дисертації сформульовані разом з науковим керівником. У наукових роботах, надрукованих у співавто-

рстві, реалізовані наукові ідеї здобувача. Автору належить фактичний матеріал, отриманий ним при проведенні дослідження.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були обговорені на науково-практичних конференціях «Прикладні аспекти морфології експериментальних і клінічних досліджень» (Тернопіль, 2008), «Актуальні проблеми ембріологічних досліджень» (Дніпропетровськ, 2009), «IV міжнародні Пироговські читання» (Вінниця, 2010), III симпозиумі «Морфогенез органів і тканин під впливом екзогенних факторів» (Алушта, 2010), науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної морфології» (Полтава, 2011), науково-практичній конференції «Морфологічні аспекти мікроциркуляції в нормі та патології» (Тернопіль, 2011), розширених засіданнях Дніпропетровського відділення Товариства АГЕТ (2009, 2010, 2011).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 9 статей у наукових фахових журналах України, 5 тез доповідей у збірниках конференцій та 2 патенти України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 173 сторінках машинописного тексту (основний текст роботи становить 121 сторінку) і складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел (207 джерел, з яких 57 надруковані кирилицею, 150 – латиницею). Робота ілюстрована 73 рисунками (54 фотографії, 19 діаграм) і 4 таблицями (займають 31 сторінку).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Матеріалом для дослідження послужили 250 ембріонів курей кросу Cobb500 та 67 ембріонів людини.

З метою визначення наявності впливу печінки на розвиток епікарда виконували медикаментозну зупинку розвитку печінки на етапах формування епікарда. В першій експериментальній групі зупинку проводили на стадії 14 за Hamburger, Hamilton (НН) (до контакту ДП з основним джерелом епікарда – проепікардом, ПЕ), а в другій – на стадії 16 за НН (після контакту ДП з ПЕ, але до завершення формування епікарда). Зупинку розвитку печінки проводили шляхом введення в жовток 20 мг аміногуанідин сульфату в 0,2 мл води. Після проведення маніпуляції отвір в шкаралупі заклеювали скотчем, а яйце повертали до термостату. Життєздатність ембріонів оцінювали по наявності серцебиття.

За допомогою загальноприйнятих гістологічних методів досліджували структурні перебудови серця ембріонів. Серійні зрізи забарвлювали залізним гематоксиліном за Гейденгайном, гематоксиліном та еозином. Кислі глікозаміноглікани виявлялися при використанні альціанового синього 8GX за Стідменом.

Імуногістохімічне дослідження проводили задля ідентифікації маркерів ендотелію (антитіла до трансмембранного глікопротеїну CD34, LabVision),

який селективно експресується в клітинах ендотелію та гемопоетичних попередниках; проліферації (антитіла до Ki-67, LabVision), який є ядерним протеїном та експресується переважно у пізню G1-, S-, M- та G2- фази клітинного циклу; епікардіального епітелію (антитіла до широкого спектру цитокератинів Keratin, Pan Ab-3), які дозволяють виявити різні типи епітелію, в тому числі одношаровий плоский – мезотелій.

Для створення тривимірних комп'ютерних моделей використовували комплекс програм Microsoft Office Picture Manager, ліцензійну версію програми 3ds max. Серійні зрізи необхідної структури, фотографували, а отримані цифрові зображення обробляли за допомогою Microsoft Office Picture Manager. Оброблені зображення імпортували до 3ds max, де проводилось вирівнювання зображень відносно один одного, обведення контуру необхідної структури та створення поверхні. Далі проводилось обробка матеріалів поверхні, співставлення різних моделей (серця, ПЕ, ДП) та їх візуалізація. Кожна модель у програмі 3ds max отримує кількісні характеристики, такі, як об'єм і площа поверхні, що фіксувалися для стереологічного аналізу.

Морфометричний та стереологічний аналізи проводили за загальноприйнятими методиками в оригінальній модифікації (Пат. України №51942, №55038), за якими обчислення проводились на основі цифрових зображень мікроскопічних препаратів із попереднім (одноразовим) їх калібруванням.

У процесі біометричного аналізу в роботі використовували методи варіаційної статистики з розрахунком t-критерію Стьюдента та критеріїв Вілкоксона, Манна-Уїтні. Усі розрахунки проводились із використанням ліцензійної програми «Statistica» (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E 415822 FA).

Результати дослідження та їх обговорення. *Гістогенез епікарда та коронарного ендотелію курячого ембріона за умов нормального розвитку.* Поява основного джерела епікарда (проепікарда, ПЕ) спостерігалась на стадії 13 за НН на поверхні ВС або правої жовткової вени. У цей час ДП ще не був сформований як такий, що дозволяє виключити його індуктивний вплив на появу ПЕ, хоча в ряді робіт описано індукцію експресії основних маркерів ПЕ у ціломічному мезотелії з допомогою ектопічної імплантації ДП (Y. Ishii et al., 2007). Швидше за все ці розбіжності пов'язані з тим, що в експерименті спостерігали лише експресію маркерів, а не появу морфологічних ознак ПЕ.

На стадії 14 за НН з'являвся ДП, який розташовувався нижче та ліворуч від ПЕ та був позбавлений мезенхіми. На наступній стадії довкола печінки формувалась мезенхіма, яка сполучалась з проепікардіальною, що дозволяє припустити взаємодію між згаданими ембріональними структурами.

На стадії 17 за НН відростки ПЕ прикріплювались до дорзальної поверхні передсердно-шлуночкового каналу (ПШК), що означало початок утворення епікарда. Окрім зазначеного способу, на цій стадії ми спостерігали додатковий механізм генерації епікарда, який полягав у продукції везикул подібними до ПЕ структурами (вирости поперечної перегородки) та їх адгезію на поверхні міокарда. За даними літератури, у певних видів тварин, таких як Міноги, спостерігається співіснування двох механізмів генерації епікарда (M.A. Pombal et al.,

2008). Хоча виміряна одномоментно площа поверхні везикул, прикріплених до міокарда, максимально складала не більше $0,12 \pm 0,05\%$ загальної поверхні серця, точно встановити їх внесок у формування епікарда важко.

Протягом стадій 18-19 за НН значне збільшення об'єму ПЕ співпадало із локалізацією ДП всередині його мезенхіми, що дозволяє припустити наявність індуктивного ефекту печінки на ріст мезенхіми ПЕ. Формування епікарда в цьому проміжку часу супроводжувалось розповсюдженням по поверхні серця зовнішнього епітелію ПЕ. Цей процес співпадав із суттєвим зростанням об'єму міокарда викинуть в той час як в динаміці загального об'єму ендокардіальних структур подібного стрибку не було (рис. 1А).

З 20-ої стадії за НН у формуванні епікарда починався новий етап, який полягав в утворенні вторинного дорзального мезокарда за рахунок об'єднання більшості відростків ПЕ у єдину структуру. В той же час стрімке зниження об'єму ПЕ (рис. 1С), а також поява субепікардіального простору (СЕП), заповненого не лише позаклітинним матриксом, як на попередній стадії, але також і клітинним компонентом, свідчить про «перетікання» $(2,18 \pm 0,21) \times 10^6$ мезенхіми ПЕ на дорзальну поверхню ПШК. У деяких роботах також згадується про втрачання об'єму ПЕ на утворення епікарда (M.-P.F.M. Vrancken Peeters et al., 1997).

Наступний етап гістогенетичних перебудов ПЕ характеризувався появою всередині нього судин, що нами спостерігалось на стадії 23 за НН, хоча в літературі це явище датується по-різному з 17-ї до 25-ї стадії за НН. Розбіжності скоріш за все пов'язані з видовими особливостями видів птахів, використаними в ході дослідження (*Coturnix coturnix japonica* у M.-P.F.M. Vrancken Peeters et al., 1997). Судини, які з'являлись в ПЕ, завжди були пов'язані з порожниною ВС, що свідчить про їх утворення шляхом ангиогенезу. Таким чином, перші люменізовані судини, які з'являються в СЕП курячих ембріонів, є венами, що дають початок коронарному руслу. Ті ж судини, що спостерігаються всередині вторинного дорзального мезокарда, дають початок притокам вінцевого синуса. Сполучення ж з порожниною випускного відділу серця відбувалось на стадії 31 за НН, що супроводжувалось масовою загибеллю клітин міокарда конусного відділу.

Гістогенез епікарда та коронарного ендотелію за умов зупинки розвитку дивертикулу печінки. На взаємозв'язок між розвитком ПЕ та ДП вчені звернули увагу лише декілька років тому, отже, на даний момент це явище описане лише у декількох роботах, результати яких суперечливі (J.M. Pérez-Pomares et al., 2006; Y. Ishii et al., 2007; J. Liu et al., 2010). У проведенні експерименту ми спиралися на дані, отримані при дослідженні даного виду птахів у нормі. Оскільки ДП просторово наближувався до ПЕ та сполучався із проепікардіальною мезенхімою лише з стадії 15 за НН, затримку її розвитку проводили на стадії 13-14 за НН, тобто до моменту контакту з ПЕ (перша експериментальна група). Максимальне просторове зближення згаданих структур спостерігалось в період з 17-ї до 18-ї стадії за НН, тому в другій експериментальній групі затримка розвитку печінки проводилась на 16 стадії – після контакту з ПЕ, але до максимального

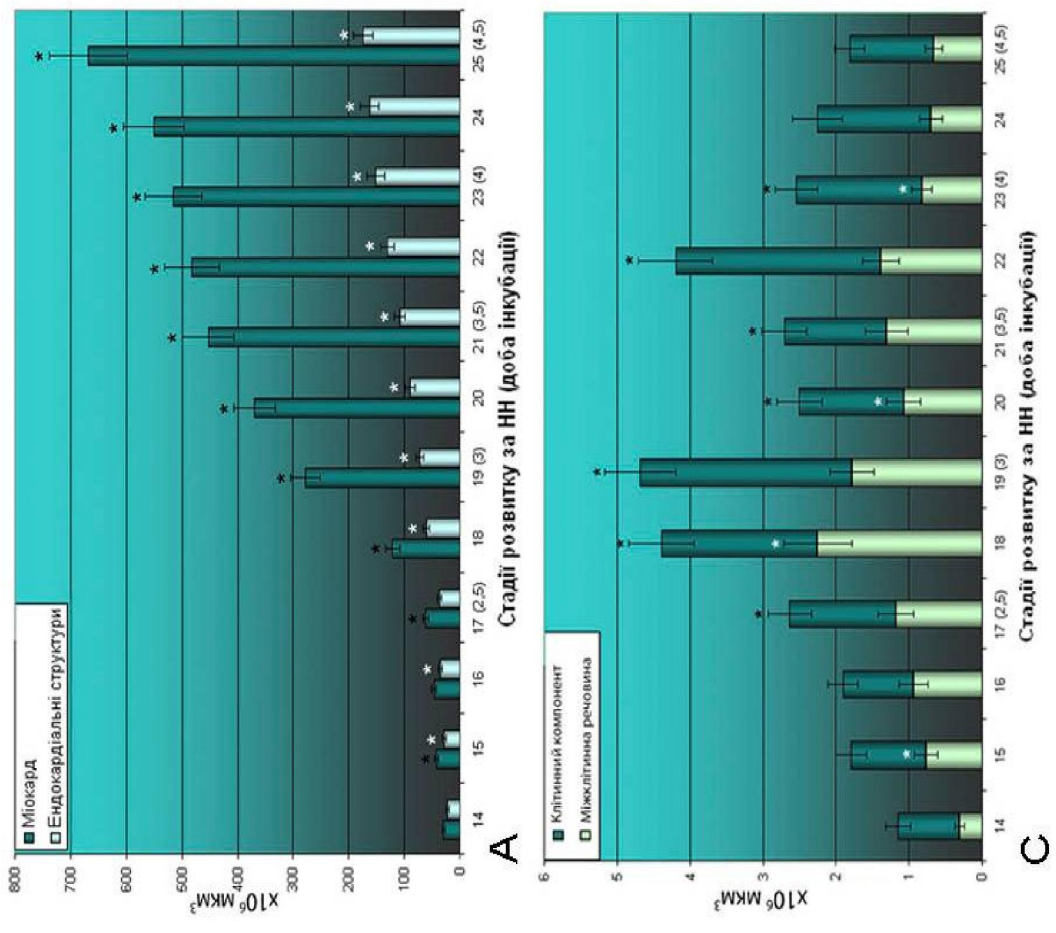


Рис. 1. А. Динаміка об'ємів міокарда та ендокардіальних структур серця курячого ембріона в нормі. В. Динаміка об'ємів міокарда та ендокардіальних структур серця курячого ембріона другої експериментальної групи. С. Динаміка об'ємів мезенхіми та позаклітинного матриксу мезенхіми проєпікарда курячого ембріона в нормі. Д. Динаміка об'ємів мезенхіми та судин проєпікарда курячого ембріона в нормі.

Примітки: * - достовірність від попередньої стадії;

† - достовірність від норми.

наближення. У першій групі на 3-ю добу інкубації (відповідає стадії 19 за НН) контакту ПЕ з ПШК не спостерігалось в жодному випадку; максимальний термін життя склав лише 3 доби (тобто менше за добу після введення в експеримент). Подібні результати були отримані в досліджах по введенню аміногуанідин сульфату на ранніх термінах інкубації (R.E. Neuman, T.A. McCoy, 1955) відзначали, що тривалість життя експериментальних ембріонів була обернено пропорційна до терміну введення препарату. У той же час міокард та ендокардіальні структури за об'ємом достовірно не відрізнявся від стадії 16 за НН, що свідчить про достовірне зниження (на 84,7% та 49,4%, відповідно), але не повну зупинку їх проліферативної активності (відносно початку експерименту зазначені показники достовірно зростають на 45,3% та 52,1%, відповідно). Зміни, що розвивались в серці ембріонів перед загибеллю, співпадають із спектром аномалій, описаних при абляції ПЕ (A.C. Gittenberger-de Groot et al., 2000; J. Männer et al., 2005), що дає змогу припустити, що саме відсутність контакту ПЕ з ПШК була причиною зафіксованих порушень.

У другій експериментальній групі, об'єм ПЕ достовірно не збільшувався, що свідчить про залежність росту ПЕ від контакту з ДП. Достовірне зростання об'єму ПЕ на середину 5-ї доби можна пояснити появою всередині вторинного дорзального мезокарда судин, наповнених кров'ю. Щодо динаміки об'єму міокарда, то відзначалось його поступове зростання, не дивлячись на достовірну відмінність від показників норми (на 61,9%). Такі результати свідчать про збереження міокардом певного базального рівня проліферативної активності. Загалом такі дані співпадають з продемонстрованими в експериментах по абляції ПЕ (J. Männer et al., 2005), порушенню його контакту з міокардом (P.C. Nahirney et al., 2003), затримці епітеліо-мезенхімної трансформації епікарда (H. Lie-Venema et al., 2003), пригніченню експресії епікардом RXR α (E. Merki et al., 2005). Відносно ендокардіальних структур отримані результати свідчать про існування взаємозв'язку між ПЕ та подушками ПШК, які зменшувались в об'ємі на 39,5% ($p < 0,05$) у порівнянні з нормою (рис. 1B).

Важливо, що на відміну від першої експериментальної групи ПЕ контактував із серцем та давав початок епікарду. Не дивлячись на це в СЕП мезенхімні клітини були помітні лише на дорзальній поверхні ПШК в місці контакту з ПЕ. Відсутність клітин в СЕП свідчить про пригнічення утворення клітин-дериватів епікарда. Саме їх відсутністю можна пояснити розвиток спектру вад серця, подібного до першої експериментальної групи.

Важливим спостереженням є не лише встановлення контакту ПЕ з серцем, але також поява в ньому вінцевих судин (які склали основну частину об'єму ПЕ), спрямованих до СЕП, що відповідало стадії 23 за НН у нормі (рис. 1D). У свою чергу, перехід ендотелію ВС в ендотелій судин ПЕ свідчить на користь ангиогенезу як ключового механізму утворення судин у даному випадку.

Значення епікарда для ембріонального розвитку ендотелію вінцевих судин людини. Оскільки початок формування епікарда у ембріонів людини відбувається на достатньо ранніх етапах пренатального онтогенезу (до кінця четвертого тижня) отримання такого матеріалу для дослідження є неможливим. УВ нау-

ковій літературі існує лише одна робота присвячена цій темі (R. Hirakow, 1992), в якій автор описав механізм утворення епікарда шляхом приростання відростків ПЕ, тобто такий, що характерний для курячих ембріонів. Тому для більш детального вивчення ранніх етапів формування епікарда ми використали саме цей об'єкт біології розвитку.

У свою чергу, в науковій літературі механізм формування вінцевих судин та походження коронарного ендотелію лишається не з'ясованими, а дані отримані переважно на об'єктах біології розвитку, тому однією з наших задач було дослідити розвиток коронарного русла людини на ранніх етапах пренатального онтогенезу. Отже, якщо підсумувати вже існуючі дані, можна виділити чотири потенційні попередники коронарного ендотелію:

- 1) епікардіальний епітелій (J.M. Pérez-Pomares et al., 2002; 2006; R.J. Tomanek et al., 2006);
- 2) навколочечінкова мезенхіма (R.E. Poelmann et al., 1993; J. Kattan et al., 2004; H. Lie-Venema et al., 2005);
- 3) ендотелій венозного синуса (C. Red-Horse et al., 2010);
- 4) ендокард міжтрабекулярних просторів (C. Red-Horse et al., 2010).

Щоб визначити механізм формування судин та джерело походження їх ендотелію використано методи тривимірного моделювання та імуногістохімії.

Виходячи з результатів дослідження CD34+ клітини серця ембріона людини можна розділити на три основні групи. Перша з них (найбільш чисельна) представлена клітинами, асоційованими з епікардом. Деякі представники цієї групи розташовувались безпосередньо в складі епікардіального епітелію, що свідчить про їх походження саме з епікарда. Слід зазначити, що частина цієї популяції ендотелію приймає участь у перших етапах формування коронарного русла, які полягають в кооперації ендотеліальних клітин з еритроїдними. Подібні клітинні комплекси описані рядом авторів (J. Kattan et al., 2004; A. Ratajska, 2006; R.J. Tomanek et al., 2006). Позитивний статус еритроїдних клітин крові при реакції на маркер Ki-67 (індекс проліферації $91,3 \pm 5,2\%$) свідчить про можливість розмноження цих клітин *in situ* в СЕП. Такі результати узгоджуються із отриманими А. Ratajska за допомогою електронної мікроскопії у дослідженнях, проведених на ембріонах миші (А. Ratajska, 2006).

Враховуючи той факт, що в СЕП спостерігались як еритроїдні клітини, вільно розташовані в позаклітинній речовині, так і ендотеліальні, які не контактували з еритроїдними, можна зробити висновок про поступову асоціацію цих клітин у комплекси. Наявність одночасно окремих еритроїдно-ендотеліальних клітинних комплексів (що було визначено за допомогою тривимірного моделювання) свідчить на користь неоваскулогенезу як рушійного механізму початку утворення вінцевих судин.

Друга за чисельністю популяція CD34+ клітин асоційована з випускним трактом серця. На 13-й стадії за Carnegie такі клітини знаходились лише в складі конденсованої мезенхіми нервового гребеня, в місці його імміграції в серце із зябрових дуг (М.А. Машталір та ін., 2007; Т. Nakamura et al., 2006). Враховуючи показники цих клітин в динаміці, можна констатувати, що регіон їх розповсю-

дження обмежується стовбуровим відділом, який дає початок позасерцевим структурам (інтраперикардіальним частинам аорти та легеневого стовбуру). Проте під час септації стовбурового відділу в складі аортопульмональної перегородки CD34+ клітини не виявляються, що виключає їх роль у цьому процесі. Пояснити появу та призначення CD34+ клітин випускного тракту можна гетерогенністю популяції серцевої фракції нервового гребеня, яка походить з різних сегментів (перших чотирьох) та мігрує через третю, четверту та шосту зяброві дуги (T. Nakamura et al., 2006).

Третя та найменша популяція CD34+ клітин являє собою вирости ендотелію ВС, спрямовані до серця. У дослідженні згаданих авторів, виконаному на мишах (C. Red-Horse et al., 2010), стверджується, що у 70% коронарний ендотелій має походження з ендотелію ВС, в той час як за нашими результатами це достатньо малочисельна популяція CD34+ клітин серця.

Загально відомо, що джерелом вінцевого синуса є лівий ріг ВС (Т.В. Садлер, 2001), проте сполучення цієї судини з коронарним руслом і, у такий спосіб, із порожниною серця залишається не описаним. У результаті досліджень ми дійшли висновку, що саме вирости ендотелію ВС необхідні для впадіння примітивних вінцевих судин у венозну частину системного кровообігу, що відбувається на стадії 16 за Carnegie (період між 37-ю і 42-ю добою пренатального онтогенезу). З цієї стадії сліпо замкнені судини, які за своєю природою є венами, наповнюються кров'ю, що супроводжується достовірним зростанням об'ємної щільності судин субепікарда передсердно-шлуночкової борозни від 9,1% до 21,8% на 18-й стадії, при додатковому зростанні об'єму мезенхіми СЕП на 42,1% ($p < 0,05$). У такий спосіб лівий ріг венозного синуса трансформується у вінцевий синус.

Сполучення вінцевих судин з аортою спостерігалось майже за тиждень після асоціації з ВС. Цій події передували процеси апоптозу кардіоміобластів випускного тракту в регіоні стовбурового відділу.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної наукової задачі, яка полягає у визначенні гістогенетичних процесів, що лежать в основі формування епікарда та вінцевого ендотелію в нормі та за умов зупинки розвитку печінки на ранніх етапах пренатального онтогенезу. Результати проведеного дослідження дозволили охарактеризувати механізми раннього коронарогенезу ембріона людини та з'ясувати роль епікарда у розвитку ендотелію вінцевих судин.

1. Основним джерелом епікарда курячого ембріона виступає проепікард, який приростає відростками до передсердно-шлуночкового каналу, його епітелій розповсюджується по поверхні серця, утворюючи основну частину епікардіального епітелію. Субепікардіальна мезенхіма утворюється пересуванням $(2,18 \pm 0,21) \times 10^6$ мкм³ мезенхіми проепікарда на дорзальну поверхню передсердно-шлуночкового каналу. Додатковим джерелом епікарда виступають подібні до проепікарда вирости поперечної перегородки, що генерують відокремлені

цисти, які дають початок $0,12 \pm 0,05\%$ епікардіального епітелію та поодиноким клітинам субепікарда.

2. На стадії 20 за НН з проепікарда курячого ембріона утворюється вторинний дорзальний мезокард, який сполучає венозний синус та дорзальну поверхню передсердно-шлуночкового каналу. Ця структура на стадії 23 за НН використовується для вrostання перших коронарних судин ангиогенезом з ендотелію венозного синуса до серця.

3. Зупинка розвитку печінки на 14-й стадії за НН призводить до порушення утворення епікарда, що станом на третю добу інкубації супроводжується відставанням об'єму проепікарда на $60,0\%$ від норми, об'єму міокарда – на $84,7\%$, об'єму ендокардіальних структур – на $49,4\%$ ($p < 0,05$), в той час як відносно початку експериментального втручання останні два зазначені показники статистично достовірно зростають на $45,3\%$ та $52,1\%$ ($p < 0,05$), відповідно, а об'єм проепікарда залишається незмінним.

4. Зупинка розвитку печінки на 16-й стадії за НН супроводжується формуванням епікарда, але субепікардіальна мезенхіма з'являється лише на дорзальному боці передсердно-шлуночкової борозни, тобто порушується процес епітелію-мезенхімної трансформації епікарда. Станом на п'яту добу інкубації об'єм міокарда та ендокардіальних структур достовірно відстає від норми на $61,9\%$ та $39,5\%$ ($p < 0,05$), відповідно. Ендотелій венозного синуса дає початок вінцевим судинам, проте їх загальний об'єм на $82,9\%$ ($p < 0,05$) поступається нормі.

5. Формування коронарного русла ембріона людини починається після завершення формування зовнішнього шару епікардіального епітелію з неоваскулогенезу, що проявляється в утворенні на 13-й стадії за Carnegie під епікардом шлуночків до 10 окремих еритроїдно-ендотеліальних клітинних комплексів; еритроїдні клітини цих комплексів іммігрують з порожнини серця та розмножуються *in situ* (індекс проліферації $91,3 \pm 5,2\%$). На 15-й стадії такі комплекси зливаються між собою і з 17-ї стадії розвитку до васкулогенезу доєднується ангиогенез, який з 18-ї стадії перетворюється на основний та єдиний механізм росту вінцевих судин.

6. Вперше вінцеві судини людини встановлюють сполучення з венозним синусом на 16-й стадії за Carnegie шляхом контакту з виростами його ендотелію в місці приростання проепікарда до серця. З цієї стадії сліпо замкнені судини, які за своєю природою є венами, наповнюються кров'ю, що супроводжується статистично достовірним зростанням об'ємної щільності судин субепікарда передсердно-шлуночкової борозни від $9,1\%$ до $21,8\%$ на 18-й стадії, при додатковому зростанні об'єму мезенхіми передсердно-шлуночкової борозни на $42,1\%$ ($p < 0,05$). У такий спосіб лівий ріг венозного синуса трансформується у вінцевий синус.

7. Сполучення вінцевих судин людини з аортою відбувається за тиждень після їх впадіння до венозного синусу – на 19-й стадії за Carnegie. Передумовою для цього процесу є апоптотична загибель клітин міокардіальної манжетки випускного відділу серця на рівні межі конусу і стовбуру. Вростання вінцевих

судин в аорту стимулює трансформацію їх проксимальних сегментів на артерії, що супроводжується появою гладком'язових клітин у складі медії.

8. CD34-позитивні клітини серця ембріона людини за походженням розділяються на субпопуляції: перша походить з епікардіального епітелію та утворює в субепікарді комплекси з клітинами еритроїдного ряду; друга асоційована з конденсованою мезенхімою нервового гребеня випускного тракту, участі в утворенні коронарного русла не приймає; третя (найменша) представляє собою вирости ендотелію венозного синуса, спрямовані до передсердно-шлуночкового каналу і дає початок ендотелію вінцевих вен в місці їх впадіння до вінцевого синуса.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Продемонстрований в роботі вплив зупинки розвитку печінки на коронарогенез та формування епікарда поглиблює уявлення про механізми формування вроджених вад серця та їх залежність від порушення ембріогенезу печінки на ранніх етапах пренатального онтогенезу. Ці дані мають враховуватись при дослідженні механізмів тератогенного впливу факторів, які можуть викликати вроджені вади серця опосередковано через пригнічення розвитку печінки.

2. Визначення ембріональних джерел походження ендотелію вінцевих судин допоможе у розробці нових методів реваскуляризації міокарда у хворих на ішемічну хворобу серця.

3. Запропоновані в дисертації способи проведення морфометричних і стереологічних розрахунків дозволяють вдосконалити методологічні підходи, зосереджуючи увагу на екстракардіальному походженні епікарда та вінцевих судин.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Потоцкая О. Ю. Новый источник эпикарда у птиц: морфологическое наблюдение / О. Ю. Потоцкая // Морфология. – 2008. – Т. II, № 1. – С. 5-15.

2. Потоцька О. Ю. Походження епікарду та його структурно-функціональний внесок у формування гетерогенності серця / О. Ю. Потоцька // Морфология. – 2008. – Т. II, № 4. – С. 37-43.

3. Потоцкая О. Ю. Взаимосвязь проэпикарда, проэпикардоподобных структур и поперечной перегородки на ранних этапах пренатального онтогенеза кур кросса Cobb 500 / О. Ю. Потоцкая // Морфология. – 2009. – Т. III, № 4. – С.62-70.

4. Потоцкая О. Ю. Трехмерное компьютерное моделирование проэпикарда птиц на этапах эмбриогенеза / О. Ю. Потоцкая // Морфология. – 2009. – Т. III, № 2. – С. 47-54.

5. Потоцкая О. Ю. Задержка развития печени на ранних этапах пренатального онтогенеза приводит к нарушению образования эпикарда и его эпителио-мезенхимной трансформации, но не влияет на формирование коронарного эндотелия / О. Ю. Потоцкая, И. В. Твердохлеб // Морфология. – 2010. – Т. IV, № 3. – С. 41-55. *Здобувачем проведено опис морфологічного дослідження.*

6. Потоцька О. Ю. Кількісна характеристика гістогенеза проепікарда птахів / О. Ю. Потоцька / Вісник морфології. – 2010. – Т. 16, № 2. – С. 271-273.

7. Потоцька О. Ю. Морфогенез серця курячого ембріону за умов затримки розвитку бруньки печінки / О. Ю. Потоцька // Вісник проблем біології та медицини. – 2011. – Вип. 2, № 2. – С. 226-228.

8. Потоцька О. Ю. Гістогенез в'язцевих судин на ранніх етапах пренатального онтогенезу курки та людини / О. Ю. Потоцька // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 4. – С. 70-72.

9. Потоцька О. Ю. Гістогенез епікарда та в'язцевих судин курячого ембріона на ранніх етапах пренатального онтогенезу в нормі та за умов експериментальної зупинки розвитку печінки / О. Ю. Потоцька // Морфологія. – 2011. – Т. V, № 4. – С. 50-55.

10. Пат. 51942 Україна, МПК⁷ G01N 1/00. Спосіб вимірювання мікроскопічних структур / Потоцька О. Ю., Горбунов А. О., Твердохліб І. В., Мурашкіна Д. Г., Хріпков І. С., Сілкіна Ю. В.; заявник та патентовласник Дніпропетровська державна медична академія. – № u201000615; заявл. 22.01.10; опубл. 10.08.10, Бюл. № 15 (2010). *Здобувачем запропоновано спосіб винаходу, здійснена практична апробація та оформлено заявку на патент.*

11. Пат. 55038 Україна, МПК⁷ G01N 1/00. Спосіб оцінки морфофункціонального стану ембріональних мезенхімних структур / Потоцька О. Ю., Горбунов А. О., Мурашкіна Д. Г., Дяговець К.І., Сілкіна Ю. В., Твердохліб І. В.; заявник та патентовласник Дніпропетровська державна медична академія. – № u2010 01465; заявл. 12.02.10; опубл. 10.12.10, Бюл. № 23 (2010). *Здобувачем проведено аналіз літератури та здійснено практичну апробацію.*

12. Потоцька О. Ю. Походження епікарда різних відділів серця: аналіз компенсаторних реакцій за умов видалення проепікарда / О. Ю. Потоцька, К. І. Шаповал, Т. О. Гудлетт // Мат-ли науково-практичної конференції [«Морфологічні основи компенсаторно-приспосувальних процесів і їх структурне забезпечення»], (Тернопіль, 10-12 жовт. 2008 р.). – Тернопіль : Укрмедкнига. – С. 45. *Здобувачем описано отриманий матеріал, зроблено узагальнення.*

13. Потоцька О. Ю. Походження гематогенних клітин ембріонального серця курки / О. Ю. Потоцька // Український морфологічний альманах. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 223.

14. Потоцкая О. Ю. Сравнительная характеристика проэпикарда и проэпикардopodobных структур птиц, их участие в формировании эмбрионального эпикарда / О. Ю. Потоцкая // Мат-ли наук.-практ. конф. [«Актуальні проблеми ембріологічних досліджень»], (Дніпропетровськ, 7-10 жовтня 2009 р.). – Дніпропетровськ. – С. 70.

15. Потоцька О. Ю. Кількісна характеристика гістогенеза проепікарда птахів / О. Ю. Потоцька // Труды Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Герогиевского. – 2010. – Т. 146, № 6. – С. 89-90.

16. Потоцька О. Ю. Гістогенез коронарних судин на ранніх етапах пренатального онтогенезу людини / О. Ю. Потоцька // Мат-ли наук.-практ. конф. [«Морфологічні аспекти мікроциркуляції в нормі та патології»], (Тернопіль, 17-18 червня 2011 р.). – Тернопіль : Укрмедкнига. – С. 136-137.

АНОТАЦІЯ

Потоцька О.Ю. Гістогенез епікарда та ендотелію вінцевих судин на ранніх етапах пренатального онтогенезу в нормі та за умов зупинки розвитку печінки. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.09 – гістологія, цитологія, ембріологія. – ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського» МОЗ України. – Сімферополь, 2012.

В дисертації досліджені основні етапи гістогенетичних процесів, що лежать в основі формування епікарда та вінцевого ендотелію в нормі та за умов зупинки розвитку печінки. Експериментальне втручання проводили з метою визначити наявність, або відсутність впливу печінки на розвиток епікарда та вінцевих судин. Встановлено, що за умов порушення взаємодії печінки та основного джерела епікарда – проепікарда – спостерігається спектр порушень розвитку серця, включаючи відсутність епікарда, дефіцит об'єму міокарда, ендокардіальних структур (переважно за рахунок подушок передсердно-шлуночкового каналу) та вінцевих судин. З використанням тривимірного комп'ютерного моделювання з'ясовані основні механізми формування вінцевих судин курки та людини. З допомогою імуногістохімічного методу популяція ендотеліальних клітин серця ембріонів людини розділена на підгрупи в залежності від походження.

Ключові слова: розвиток вінцевих судин, ендотелій, проепікард, епікард, печінка.

АННОТАЦИЯ

Потоцкая О.Ю. Гистогенез эпикарда и эндотелия коронарных сосудов на ранних этапах пренатального онтогенеза в норме и при остановке развития печени. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – гистология, цитология, эмбриология. – ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского» МЗ Украины. – Симферополь, 2012.

Распространенность заболеваний сердечно-сосудистой системы среди взрослого населения и врожденных пороков сердца у детей обуславливает потребность изучения нормального эмбрионального развития данного органа. Большинство работ в области кардиогенеза посвящены развитию мио- и эндокарда, в то время как эпикард фактически остается наименее изученным. В работах, посвященных изучению развития эпикарда, такие вопросы как его роль в происхождении коронарного эндотелия, влияние печени на развитие эпикарда, остаются без ответа.

Целью нашей работы было определить гистогенетические процессы, лежащие в основе формирования эпикарда и коронарного эндотелия в норме и при остановке развития печени.

Материалом для работы послужили 250 эмбрионов куриц кросса Cobb500 и 67 эмбрионов человека. Были использованы гистологические, морфометриче-

ские, стереологические, иммуногистохимические, статистические методы, а также трехмерное компьютерное моделирование.

В результате исследований удалось выяснить, что эпикард куриного эмбриона начинает формироваться на стадии 17 по Hamburger, Hamilton (НН). Основным его источником выступает проэпикард (ПЭ), который прирастает отростками к атрио-вентрикулярному каналу (АВК), его эпителий распространяется по поверхности сердца, образуя основную часть эпикардального эпителия. Субэпикардальная мезенхима образуется перемещением мезенхимы ПЭ на дорзальную поверхность АВК, в других регионах - путем эпителио-мезенхимной трансформации эпикарда. Дополнительным источником эпикарда выступают подобные ПЭ выросты поперечной перегородки, продуцирующие везикулы, покрытые эпителием и заполненные мезенхимой, которые прилипают к сердцу и таким образом дают начало около $0,12 \pm 0,05\%$ эпикардального эпителия и единичным клеткам субэпикарда.

На стадии 20 по НН из ПЭ куриного эмбриона образуется вторичный дорзальный мезокард, соединяющий венозный синус и дорзальную поверхность АВК. Эта структура выполняет функцию своеобразного «мостика», который на стадии 23 по НН используется для врастания первых коронарных сосудов ангиогенезом из венозного синуса. На этой стадии сосуды по объему составляют 88,8% дорзального мезокарда. На стадии 26 по НН за счет постепенного укорочения расстояния между венозным синусом и АВК сердца, что сопровождается уменьшением объема сосудов вторичного мезокарда, вторичный дорзальный мезокард перестает существовать как таковой. В дальнейшем его локализации соответствует место впадения коронарных вен в венечный синус. Сообщение с аортой происходит на 31-й стадии по НН; этому событию предшествует апоптоз кардиомиобластов миокардиальной манжетки выпускного тракта на границе конуса и тункуса.

Остановка развития печени приводит к нарушению образования эпикарда, что сопровождается дефицитом объема ПЭ, миокарда, эндокардиальных структур, в то время как относительно начала экспериментального вмешательства эти показатели достоверно возрастают (объем ПЭ остается неизменным). Со стороны сердца развивается дилатация камер, что вместе с расширением магистральных вен свидетельствует о сердечно-сосудистой недостаточности. 100% эмбрионов погибают в течение нескольких суток после начала эксперимента. Эндотелий ВС образует выросты - венечные сосуды, которые через вторичный дорзальный мезокард врастают в субэпикардальное пространство; регион распространения таких сосудов ограничен только дорзальной поверхностью АВК, а их общий объем, несмотря на отчетливую дилатацию, уступает норме.

Формирование коронарного русла эмбриона человека начинается после завершения формирования наружного слоя эпикардального эпителия с неоваскулогенеза, что проявляется в образовании на 13-й стадии по Carnegie под эпикардом желудочков до 10 эритроидно-эндотелиальных клеточных комплексов; эритроидные клетки этих комплексов иммигрируют из полости сердца и

размножаются *in situ* (индекс пролиферации $91,3 \pm 5,2\%$). На 15-й стадии такие комплексы сливаются между собой вдоль межжелудочковой борозды, а на 16-й - устанавливают сообщение с венозным синусом путем контакта с выростами его эндотелия в месте прирастания проэпикарда к сердцу. С этой стадии слепо замкнутые сосуды наполняются кровью и к васкулогенезу присоединяется ангиогенез. На 19-й стадии по Carnegie сосуды устанавливают связь с аортой в регионе апоптоза миобластов миокардиальной манжетки.

CD34-позитивные клетки сердца эмбриона человека по происхождению разделяются на субпопуляции: первая ассоциирована с эпикардиальным эпителием, формируется путем его трансдифференцирования, образует в субэпикарде комплексы с клетками эритроидного ряда и, таким образом, дает начало большей части коронарного эндотелия. Вторая ассоциирована с конденсированной мезенхимой нервного гребня выпускного тракта, участия в образовании коронарного русла не принимает, оставаясь в составе средней оболочки интраперикардиальных частей аорты и легочного ствола. Третья (наименьшая) представляет собой выросты эндотелия венозного синуса, направленные внутрь субэпикардиальной мезенхимы атрио-вентрикулярной борозды, и дает начало эндотелию коронарных вен в месте их сообщения с венечным синусом.

Ключевые слова: развитие коронарных сосудов, эндотелий, проэпикард, эпикард, печень.

SUMMARY

Pototskaya O.Yu. Histogenesis of epicardium and coronary endothelium on the early stages of prenatal ontogenesis under normal conditions and after arrest of liver development. – Manuscript.

Dissertation for the degree of Candidate of medical sciences in specialty 14.03.09 - histology, cytology, embryology. – SI "Crimea State Medical University, named after S.I. Georgievsky" MPH of Ukraine. – Simferopol, 2012.

In the current work main periods of histogenetic processes underlying the formation of epicardium and coronary endothelium at normal conditions and after arrested liver development were investigated. The experimental intervention was used to determine the presence or absence of the effect of liver bud on the development of epicardium and coronary vessels. It was determined that a violation of the interaction of liver and the main source of epicardium – proepicardium – cause wide spectrum of heart malformations, including total absence of epicardium, deficit of volumes of myocardium, endocardial structures (mainly due to atrio-ventricular cushions) and coronary vessels. Using three-dimensional computer modeling it was clarified the basic mechanisms of coronary vessels formation in chicken and human embryos. Using immunohistochemical method the population of endothelial cells of the heart of human embryos was divided into subgroups depending on their origin.

Key words: development of coronary vessels, endothelium, proepicardium, epicardium, liver.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВС – венозний синус

ДП – дивертикул печінки

ПЕ – проепікард

ПШК – передсердно-шлуночковий канал

СЕП – субепікардіальний простір

НН – Hamburger, Hamilton

Підписано до друку 07.08.12 р. Формат 60×90/16.
Умовн. друк. арк., 0,9. Друк ризографія. Папір офсетний.
Наклад 100 пр. Зам. № 164 .

Надруковано ВТК «Друкар» ДЗ «ДМА МОЗУ»
м. Дніпропетровськ, пл. Жовтнева, 4.