

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Світова статистика останніх років констатує, що серед 1000 народжень 6-8 малюків мають вроджені вади серця. За даними цієї статистики персистенція артеріального стовбура займає 6,3%, тетрада Фалло – 6,2%, транспозиція магістральних судин – 19,4%, стеноз ЛС – 6,8%, стеноз Ао – 5,9%, коарктація Ао – 3,8%, дефекти міжшлуночкової перегородки (МШП) – 22,9%. Перераховані вади виявляються при порушенні розвитку похідних конусно-стовбурового (КС) відділу серця зародка – перехідної тимчасової ембріональної структури. Їх об'єднує термін «конусно-стовбурові дефекти», які зустрічаються з розповсюдженістю близько 1 на 150 новонароджених (В.А. Козлов, В.Ф. Шаторна, 2004; М.А. Машталір, І.В. Твердохліб, 2008; Т.Р. Johnson, 2010). Вітчизняні статистичні дані, які були надані вченими Інституту серцево-судинної хірургії України ім. М.М. Амосова, відзначали частоту розвитку вроджених серцевих дефектів – до 5-6 тисяч дітей на рік, 50-60% з яких – несумісні з життям.

Період існування КС відділу включає етапи формування аорто-пульмонального септаційного комплексу, ротацію, формування конусно-стовбурового переходу, септацію стовбура та конуса, що завершуються утворенням присерцевих зон аорти (Ао) і легеневого стовбура (ЛС), аортального присінка та артеріального конуса, отвору Ао і ЛС, півмісяцевих клапанів. Спільність походження даних структур робить доцільним вивчення їх розвитку саме у комплексі, в той час як більшість робіт розглядають формування вад серця окремо одна від одної (В.Н. Антипов и др. 2006; А.С. Gittenberger-de Groot et al., 2005).

Зневоднення супроводжує низку захворювань першого триместру вагітності. Дегідратація материнського організму призводить до гемодинамічних порушень ембріональної серцево-судинної системи, які на ранніх етапах кардіогенезу здатні викликати розвиток дефектів різного ступеня складності.

З кожним днем клінічні ембріологи, неонатологи та педіатри всього світу все більше приділяють увагу діагностиці серцевих вад на етапах пренатального розвитку. Відтворення в експериментальних моделях етапів формування вад кардіоембріогенезу на лабораторних тваринах є інструментом для визначення топографічних, морфологічних, гістогенетичних особливостей розвитку тих чи інших дефектів ембріонального серця під впливом певних чинників (L. Zhu et al., 2009; E. Staub, B.J. Wilkins, 2012; K.B. Tate et al., 2012).

На сьогодні КС дефекти – найрозповсюдженіша група вроджених вад серця. КС відділ за досить короткий період часу (3 тижні – у людини, 5 діб – у миші) зазнає ряд складних перебудов на шляху формування магістрального судинного поля, що робить даний етап кардіогенезу чутливим до впливу патогенних чинників. Зневоднення супроводжує деякі патологічні стани першого триместру вагітності серед гестозів та екстрагенітальної патології, але

його вплив як на гістогенез похідних КС відділу, так і на кардіогенез у цілому нині не з'ясований.

За цих обставин особливої актуальності набуває вирішення питань щодо кількісної оцінки численних морфогенетичних перетворень ембріональних структур КС відділу та адекватного порівняльного аналізу впливу дегідратації на їхній просторово-часовий розвиток.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри гістології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Структурні перебудови компонентів серцево-судинної системи в умовах її нормального й аномального гістогенезу у людини й експериментальних тварин» (державний реєстраційний номер 0111U006621).

Мета і завдання дослідження. Встановлення особливостей гістогенетичних перебудов конусно-стовбурового відділу серця ембріона миші, що лежать в основі його формування і розвитку похідних в нормі та за умов дегідратації материнського організму.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Провести порівняльну характеристику стовбурової та конусної септації і визначити ступінь ротаційних змін КС відділу ембріонального серця на етапах ранніх гістогенетичних перебудов за умов нормального розвитку.

2. Надати якісну та кількісну оцінку міокардіалізації ендокардіальних структур КС відділу та артеріалізації стінки новотворених магістральних судин ембріонального серця в нормі.

3. Описати кількісні та якісні зміни ранніх гістогенетичних перебудов КС відділу ембріонального серця за умов дегідратації материнського організму.

4. Надати порівняльну морфологічну характеристику над- і підклапанним частинам магістральних судин та півмісяцевим заслінкам клапанів на етапах нормального кардіогенезу. Визначити роль конусних гребенів у герметизації порожнин серця.

5. Описати кількісні та якісні зміни пізніх гістогенетичних перебудов КС відділу ембріонального серця (у термін від 13 по 15 діб гестації) за умов дегідратації материнського організму.

6. Визначити вплив дегідратації похідних конуса та стовбура протягом 13-ї доби ембріогенезу.

Об'єкт дослідження – КС відділ ембріонального серця миші, пазухи Ао і ЛС, присінок Ао, артеріальний конус, півмісяцеві клапани.

Предмет дослідження – формування і перетворення похідних КС відділу ембріонального серця миші в нормі та за умов дегідратації материнського організму.

Методи дослідження: ембріологічні (макро-, мікроскопічне дослідження серця, КС відділу та його окремих структурних компонентів і похідних), гістологічні (морфологічна оцінка стану структур та похідних КС відділу), гістохімічні (оцінка стану позаклітинного матриксу компонентів КС відділу), імуногістохімічні (аналіз проліферативних процесів у складі КС відділу

ембріонального серця; детекція популяції клітин НГ), морфометричні (кількісна оцінка морфологічних змін КС відділу на етапах гістогенетичних перебудов), біометричні (варіаційна статистика, дисперсійний та кореляційний аналіз отриманих даних), тривимірне комп'ютерне моделювання (відтворення структурних компонентів КС відділу та його похідних у просторі).

Наукова новизна отриманих результатів.

Уперше проведена тривимірна реконструкція структурних компонентів та похідних КС відділу в нормі та за умов дегідратації материнського організму. Візуалізовано АПСК, етапність закриття первинного і вторинного МШО, перехід інтраперикардіальних частин магістральних судин у IV та VI зяброві дуги в динаміці, міокардіальну манжетку КС відділу. Кількісно та якісно оцінено просторові особливості формування кутів на етапах перебудов КС відділу в контексті взаємопов'язаних змін (особливо під час утворення КС переходу, КС вигину, ротації).

Надана кількісна характеристика мезенхіми ендокардіальних структур даного відділу серця, напрямок її міграції в порівнянні конусної та стовбурової фракцій. Встановлено затримку проліферативної активності ядер міоцитів міокардіальної манжетки як одну з причин вкорочення КС відділу.

Надана характеристика формування похідних конуса та стовбура ембріонального серця за умов дегідратації материнського організму; комплексно проаналізовані та описані морфогенетичні механізми і етапність формування вад КС відділу в експериментальній моделі.

Проведено кореляційний та дисперсійний аналіз гістогенетичних перебудов КС відділу ембріонального серця в нормі та за умов дегідратації материнського організму.

З'ясовано етапність міокардіалізації й артеріалізації структурних компонентів КС відділу. Надано порівняльну характеристику даних процесів у конусі та стовбурі. Визначено взаємозв'язок між початком міокардіалізації та появою міоїдних комплексів при міокардіальній манжетці. Описано NF+ та GFAP+ популяції клітин КС відділу ембріонального серця у динаміці.

Практичне значення одержаних результатів. Характеристика гістогенетичних перебудов КС відділу на етапах формування його похідних дозволяють уточнити механізми, що лежать в основі формування вроджених вад серця.

Визначення впливу дегідратації материнського організму на утворення та розвиток магістрального судинного поля ембріонального серця дозволяє встановити залежність гістогенезу конуса та стовбура від материнської гемодинаміки та створити теоретичне підґрунтя для розробок ряду превентивних і діагностичних заходів у галузі акушерства та неонатології.

Розроблений в ході дисертаційної роботи «Спосіб оцінки морфофункціонального стану ембріональних мезенхімних структур» оптимізував морфометричний та стереологічний аналіз мікроскопічних структур та може бути використаний у практиці наукових ембріологічних та гістологічних лабораторій.

Матеріали дисертації впроваджені в навчальний процес кафедр гістології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, ДЗ «Луганський державний медичний університет», Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, Запорізького державного медичного університету, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського», ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», ДУ «Кримський державний медичний університет імені С. І. Георгієвського», Харківського національного медичного університету, ВДНЗУ "Українська медична стоматологічна академія", Одеського національного медичного університету, Буковинського державного медичного університету та кафедри акушерства та гінекології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Особистий внесок здобувача. Визначення напрямку, обсягу, а також завдань дослідження проведено спільно з науковим керівником. Огляд та аналіз наукової літератури, забір матеріалу, експериментальне моделювання, морфологічні дослідження, тривимірна реконструкція, морфометричний аналіз виконані автором самостійно. Дисертантом самостійно інтерпретовані отримані результати, оформлені основні розділи роботи, сформульовані та оприлюднені висновки. Наукові публікації в співавторстві містять опрацьований матеріал та висновки здобувача, що отримані ним під час виконання дисертації.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження обговорювалися на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні проблеми ембріологічних досліджень» (Дніпропетровськ, 2009), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні методи дослідження в морфології» (Луганськ, 2011), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми сучасної морфології» (Полтава, 2011), науково-практичній конференції «Морфологічні аспекти мікроциркуляції в нормі та патології» (Тернопіль, 2011), XII науковій конференції студентів та молодих учених «Новини і перспективи медичної науки» (Дніпропетровськ, 2012), науково-практичній конференції «Морфологія на сучасному етапі розвитку науки» (Тернопіль, 2012), Міжнародній науково-практичній конференції «Роль сучасної медицини у забезпеченні здоров'я суспільства» (Одеса, 2012), Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні напрямки теоретичних та прикладних досліджень» (Одеса, 2013), розширених засіданнях Дніпропетровського відділення Товариства АГЕТ (2010 – 2013).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць, серед яких 6 статей у наукових фахових виданнях України, 3 – у виданнях, що віднесені до науково-метричних баз даних, 1 – у іноземному виданні та 6 робіт опубліковано у матеріалах наукових конгресів і конференцій України; отримано 1 патент на корисну модель.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Матеріалом для дослідження послужили 317 сердець ембріонів мишей лінії C56BL/6 за умов норми та 118 – за умов дегідратації материнського організму.

З метою визначення впливу гемодинамічних змін материнського організму за умов дегідратації на ембріональний гістогенез конуса та стовбура була використана експериментальна модель, описана М.Д. McKinley зі співавторами (2008), згідно з якою моделювалося гостре зневоднення IV ступеня тяжкості за умов перорального прийому гіперосмолярних розчинів (0,3 моль/л NaCl) з подальшою водною депривацією. Часовий проміжок експерименту встановлювався до 3 або 4 діб. При цьому максимум дегідратійних змін припадав на середину дослідження. Результат оцінювався за сукупністю симптомів та макроскопічних ознак. При вилученні матки самки визначалися ознаки гіперемії вен ендометрію та пупкових судин, щільності хоріонічної та децидуальної пластинок, а також значні крововиливи під час препарування. Життєздатність ембріонів оцінювали за наявності серцебиття.

За допомогою загальноприйнятих гістологічних методик досліджували гістогенез похідних конуса та стовбура ембріонального серця миші. Серійні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином, залізним гематоксиліном Гейденгайна, орсеїном. Гістохімічний метод дозволяв визначати кислі глікозаміноглікани за умов реакції з альціановим синім 8 GX за Сідменом.

Імуногістохімічне дослідження проводили для: а) ідентифікації клітин НГ (антитіла до триплетів нейрофіламентів (NF, LabVision) та до кислого гліального фібрилярного протеїну (GFAP, DakoCytomation)); б) міоцитів конуса та стовбура та з'ясування етапів міокардіалізації та артеріалізації даних відділів серця (альфа-гладком'язовий актин (α -SMA, DakoCytomation)); в) встановлення проліферативної активності ядер міоцитів міокардіальної манжетки, правого шлуночка та мезенхіми структурних компонентів КС відділу (Ki-67 – ядерний протеїн, експресія якого відбувається у G₁, S, M, G₂ фази клітинного циклу (LabVision)).

Тривимірні комп'ютерні моделі створені з допомогою комплексу програм Microsoft Office Picture Manager, ліцензійної версії програми 3ds max. Серійні зрізи необхідної структури, створені в горизонтальній чи фронтальній площинах, фотографували. Отримане зображення підлягало обробці у програмному забезпеченні Microsoft Office Picture Manager. Вторинна візуалізація змодельованої структури об'єкту дослідження відбувалася в оболонці 3ds max.

Морфометричний аналіз проводили за загальноприйнятими методиками в оригінальній модифікації (Пат. України 55038), за яким обчислення здійснювалося на основі цифрових зображень мікроскопічних препаратів із попереднім калібруванням.

За допомогою біометричного аналізу, який проводили за Г.Ф. Лакінім (1990), була з'ясована сила впливу фактора онтогенетичного віку на

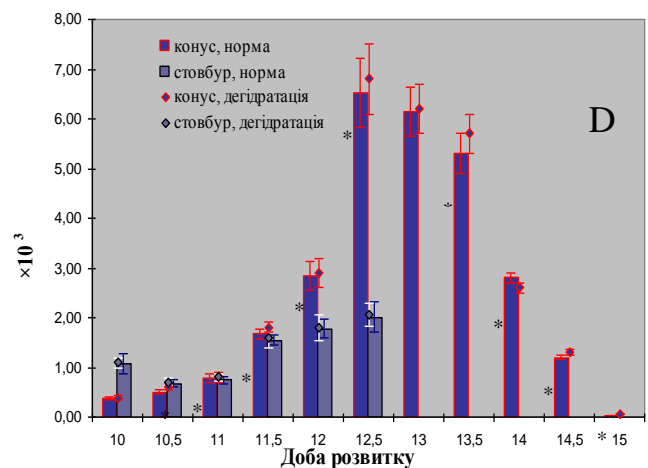
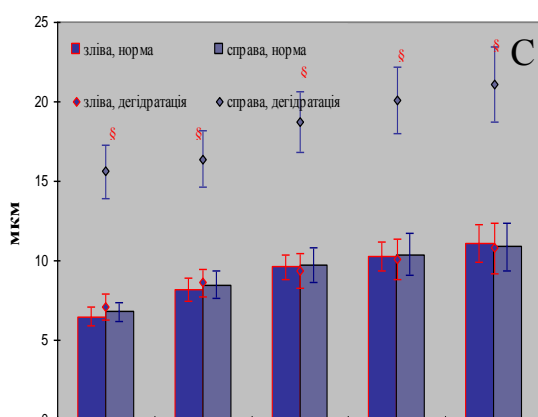
перебудови конуса та стовбура та визначений кореляційний зв'язок у функціонально залежних парах перемінних величин в нормі та за умов дегідратації материнського організму. У процесі біометричного аналізу використовували варіаційну статистику з розрахунком *t*-критерію Стьюдента та критеріїв Вілкоксона, Манна-Уїтні. Усі розрахунки проводили за допомогою ліцензійної програми «Statistica» (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E 415822 FA).

Результати дослідження та їх обговорення. *Септація КСВ ембріонального серця в нормі та за умов дегідратації материнського організму.* Септація КСВ серця ембріона супроводжувалася утворенням АПСК. Межі розповсюдження конденсованої фракції мезенхіми співпадали з межами даного септаційного комплексу. Чисельна щільність і абсолютна кількість ядер мезенхімних клітин подушок стовбура мали позитивну динаміку росту, різко збільшуючись на 11-й добі ембріогенезу (рис. 1В, D). Максимальні значення показників чисельної щільності й абсолютної кількості ядер мезенхімних клітин подушок стовбура і гребенів конуса спостерігалися наприкінці існування структурних компонентів стовбура (12,5 діб) та конуса (15 діб). З 13-ї доби конденсована мезенхіма стовбура залишалася у складі мезенхіми півмісяцевих клапанів та мала тенденцію до зниження даних показників під час формування клапанної структури. Чисельна щільність ядер клітин конденсованої мезенхіми гребенів конуса починала свій ріст наприкінці 11-ї доби ембріонального розвитку, збільшуючись на 91,6% ($p < 0,05$). При цьому ріст параметра мав нерівномірний характер, збільшуючись спочатку вчетверо на 11-й добі, а потім втриє – на 12-й. З 13-ї доби значення даного показника достовірно та рівномірно знижувалося. Рівень об'ємної щільності конденсованої мезенхіми гребенів конуса збільшувався на 88,2% ($p < 0,05$) з 10-ї по 15-у добу кардіогенезу. Показники об'ємної щільності клітинного компоненту подушок стовбура та гребенів конуса достовірно зростали у період 10,5-12,5 діб, максимально збільшуючись на 11-й та 12-й добах гестації. Підсумовуючи дані результати встановлено, що на початкових етапах гістогенетичних перебудов КСВ чисельність клітин мезенхімної популяції подушок стовбура збільшується за рахунок міграції клітин конденсованої фракції мезенхіми, тоді як в гребенях конуса – за рахунок епітеліо-мезенхімної трансформації (ЕМТ). За даними (J.D. Berndt et al., 2008) відомо, що ЕМТ – основний механізм відновлення популяції мезенхімних клітин КСВ, хоча є такі припущення, що вона відновлюється за рахунок мігруючих клітин НГ (L. Taneyhill et al., 2007). У ході дослідження було встановлено, що міграція клітин конденсованої мезенхіми спочатку заселяє подушки стовбура, а потім – конусні гребені. При цьому в першому випадку характер заселення має ексцентричний характер, тоді як в другому – концентричний. Під час дегідратаційних змін материнського організму показники, які характеризують мезенхімну популяцію, достовірно зменшувались у значеннях параметрів чисельної щільності мезенхімних клітин як конденсованої, так і неконденсованої фракції.

Ротація КСВ в нормі та за умов дегідратації материнського організму. У період з 10-12,5 діб КСВ ембріонального серця обертається на $110,2 \pm 9,4^\circ$ проти годинникової стрілки. При цьому вже на 11,5 діб гестації його кут ротації складає $78,7 \pm 6,3^\circ$, що вказує на динаміку та ступінь ротаційних змін. Однак деякі вчені вимірювали кут за годинниковою стрілкою та отримували значення кута близько 20° (F. Bajolle et al., 2006). Під час нашого дослідження встановлено фізіологічний хід КСВ саме проти годинникової стрілки. Цей факт підтверджують додатково виділені параметри змін товщини правої та лівої стовбурових подушок, вентрального та дорсального гребенів саме у протигодинниковому напрямку. Тобто показники товщини лівої подушки та дорсального гребеня достовірно перевищували аналогічні параметри протилежних структур, тим самим зміщуючи вісь повороту. Достовірно зростаючі показники зовнішніх діаметрів конуса, стовбура та переходу між ними збільшували кут вигину КСВ ембріонального серця, нівелюючи, таким чином, його проклапанні властивості.

Під час моделювання дегідратації найбільших змін досягали саме просторові перебудови КСВ. Вони характеризувалися достовірним збільшенням куту ротації та вигину КСВ (рис. 1А) під впливом аномальної гемодинаміки ембріона. Це провокувало, в свою чергу, достовірне зменшення товщини правої подушки на всіх досліджуваних термінах та товщини вентрального гребеня з 12-ї до 13-ї доби. Також за рахунок більш крутого оберту аортального каналу відносно легеневого статистично вагомо зменшувався діаметр стовбура та конусно-стовбурового переходу відповідно. Перелічені просторові зміни структурних компонентів КСВ, як це вказувалося раніше, відображалися на процесі розподілення їхнього клітинного складу. Особливо даним змінам підлягала популяція клітин конденсованої мезенхіми, адже її міграція має досить швидкі та критичні темпи. Переміни у міграційних процесах підтверджувалися редукцією кардіогеля в просторі біля міокардіальної манжетки стовбурових подушок, значним достовірним звуженням АПСК та видовженням його правого й лівого зубців.

Міокардіалізація та артеріалізація структурних компонентів КСВ. При візуалізації популяції гладком'язових клітин ембріонального серця виявлялася коекспресія α -актину гладких міоцитів та білків міофібрилярного компоненту кардіоміоцитів. Згідно результатам досліджень J. Yu et al. (2000), ембріональний міокард схильний до повільного тривалого скорочення, що забезпечується білками кардіоміоцитів, подібними до α -актину гладких міоцитів.



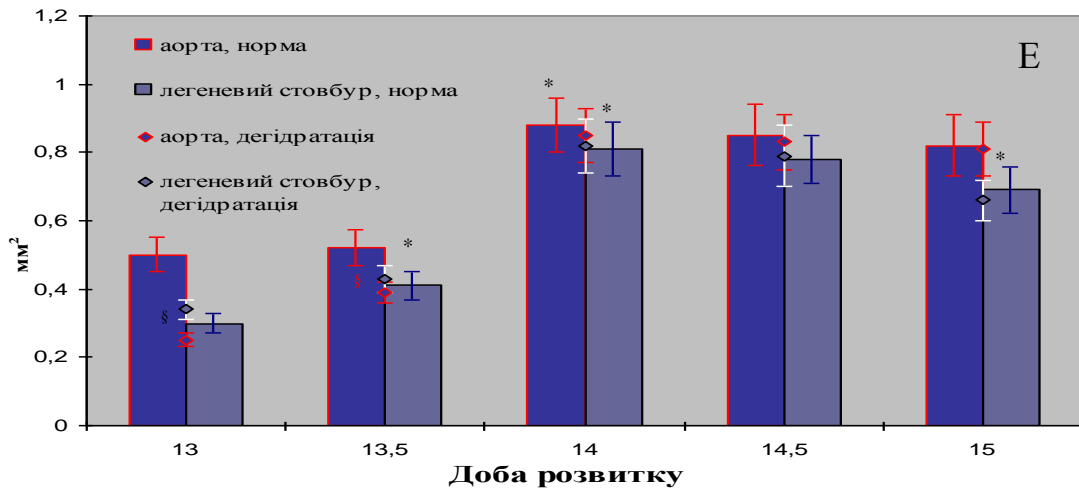


Рис. 1. А. Динаміка кута ротації КСВ ембріонального серця миші. В. Динаміка чисельної щільності ядер мезенхімних клітин структурних компонентів конуса та стовбура. С. Динаміка зовнішніх діаметрів вінцевих артерій. D. Динаміка абсолютної кількості ядер мезенхімних клітин структурних компонентів КСВ. Е. Динаміка площі виходу аортального присінка/артеріального конуса в підклапанній зоні Ао/ЛС.

Примітка: * - достовірна відмінність від попередньої стадії;

§ - достовірна відмінність від норми.

Тому вони мали певний рівень експресії маркера аж до 13-ї доби ембріонального розвитку. З початком пізніх гістогенетичних перебудов КСВ інтенсивність даної реакції згасала. Виходячи з результатів дослідження експресії маркера α -SMA, стало можливим визначити етапність міокардіалізації та артеріалізації структурних компонентів конуса та стовбура з 10-ї по 13-у ембріогенезу. Початок міокардіалізації стовбурових подушок співпадає з початком 10,5 діб ембріогенезу, а саме з появою в них міоїдних клітин та збільшенням їх утворення у краніо-каудальному напрямку.

Манжеткова стадія міокардіалізації конусних подушок, виділена під час нашого дослідження, тривала з 10,5 до 12,5 діб. З 11-ї доби міоїдні клітини, які експресували маркер α -SMA, визначалися субендокардіально до 12,5 діб. На початку ротаційних змін КСВ (11,5 діб), спостерігалась нова популяція міоїдних клітин, що були залучені до складу АПСК. Що за даними (I. Moralez et al., 2006) відповідають стану міокардіалізації подушок стовбура. На противагу

цьому, ми стверджуємо, що септаційна стадія є початковою ланкою артеріалізації стінки Ао та ЛС. Це обумовлено виявленням в ході дослідження специфічним характером розповсюдження популяції міоїдних клітин над «підковою» септаційного комплексу у новоутвореному міжсудинному просторі. Септаційний етап артеріалізації тривав до 13,5 діб. Популяція міоїдних клітин поступово переміщувалася до субендотеліального простору стінки судин, починаючи таким чином субендотеліальний етап артеріалізації.

Встановлено тривалість даної стадії до 14-ї доби ембріогенезу. Міокардіалізація конусних гребенів мала двоетапний перебіг та тривала до 15-ї ембріональної доби. Трабекулярний етап починався у термін 11,5 діб та продовжувався у субендокардіальний етап шляхом утворенням міоїдних комплексів у субендокардіальному просторі конусних гребенів до 13,5 діб.

Особливості пізнього гістогенезу похідних КСВ в нормі та за умов дегідратації материнського організму. За даними наших досліджень та досліджень ряду авторів клапанний апарат магістральних судин серця розвивається з дистальних частин подушок стовбура (F.J. de Lange et al., 2004), але існують відомості, що попередником півмісяцевих клапанів є проксимальна частина конусних гребенів (R.S. Qayyum et al., 2001). Вивчення гістогенезу клапанного апарату магістральних судин за умов експерименту дозволило відокремити параметри, які піддавалися змінам. Аналізуючи останні, підсумовано, що аортальний клапан підлягав затримці у вкороченні за умов відповідно збільшених показників глибини заслінок та об'єму на всіх етапах пізніх гістогенетичних перебудов КСВ ембріонального серця миші.

У переліку показників, які характеризують надклапанні ділянки Ао та ЛС, вагомих змін досягали показники з боку Ао. Тобто, враховуючи дані рівномірно збільшених у порівнянні з нормою значень товщини, між'ядерної відстані гладком'язових клітин, а також росту об'ємної щільності міжклітинного компоненту медії на всіх досліджуваних строках ембріонального розвитку припускається наявність патологічного фіброзу.

Підклапанна частина обох судин оформлювалась у вигляді ділянок виходів з відповідних шлуночків на протязі гістогенетичних перебудов переважно конусного відділу ембріонального серця. У дослідженні, встановлена доля дорсального гребеня, редукція конденсованої мезенхіми якого мала більш вповільнені темпи, ніж вентрального. На 15-у добу ембріогенезу залишкові ділянки конденсованих мезенхімних клітин мали місце скупчення у вигляді гребеневої надшлуночкової структури справа – термінова ділянка між шлуночком та артеріальним конусом. Закриття первинного МШО завершувалося на 13-у добу ембріогенезу. При цьому встановлено, що закриття отвору відбувалося шляхом поєднання м'язової частини МШП, верхнього лімбу дорсального гребеня та верхньої АВ подушки. До того ж була надана відповідь на спірне питання відносно закриття вторинного МШО, яке відбувалося у термін 14,5 діб за напрямком вкороченої міокардіальної манжетки та залишків конденсованої мезенхіми конусних гребенів.

Під час експерименту саме показники, які характеризують підклапанну ділянку Ао, підлягали найвиразнішим змінам. Спостерігалось звуження зовнішнього діаметру даної зони Ао статистично вагомою мірою з 13-ї до 14-ї доби ембріогенезу. За експериментальних умов площа виходу аортального присінка у підклапанній зоні статистично вагомо зменшувалася у порівнянні з аналогічним нормальним показником лише у термін 13 діб (на 50,1%) та 13,5 діб (на 26,2%) ембріонального розвитку (рис. 1Е). Також відбувалося звуження зовнішнього діаметра правої вінцевої артерії під впливом дегідратації на 51,1% ($p < 0,05$) на 13,5 діб ембріогенезу (рис. 1С). У цей термін за допомогою тривимірного моделювання було встановлено наявність випинання, яке було розташоване під лівим волокнистим кільцем та нагадувало відросток мембранозної частини МШП. За умов дегідратації строком раніше на серійних зрізах відмічалось характерне розростання мембранозної частини у краніальному напрямку, поміряти яке було досить складно за умов утрудненості виділення певного рельєфу виросту та диференціювання з поверхнею гіпертрофованої МШП. На інших термінах розвитку констатувалася лише гіпертрофована МШП, достовірно збільшена в об'ємних та площинних показниках.

Співставивши та проаналізувавши дані нормального й аномального пізнього гістогенезу КСВ ембріонального серця миші за умов дегідратації материнського організму, можна встановити субаортальний стеноз, який у термін 13 та 13,5 діб має ознаки динамічної форми. Літературні дані (С.К. Tanner et al., 2005) вказують, що дана вада є наслідком фіброзної та фіброзно-м'язової обструкції за динамічним типом та виникає за умов потовщення МШП, зумовлюючи обструкцію аортального присінка. Враховуючи описані ознаки дефекту та той факт, що пік дегідратаційних змін материнського організму припадав на 12 та 12,5 діб, можна припустити, що найвразливішим етапом гістогенетичних перебудов КСВ за умов материнського зневоднення є ротаційні зміни останнього.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної задачі, яка полягає у визначенні гістогенетичних перебудов КСВ серця ембріона миші, що лежать в основі його формування і розвитку в нормі та за умов дегідратації материнського організму. Результати порівняльного аналізу даних нормального й аномального гістогенезу похідних конуса та стовбура дозволили оцінити вплив дегідратації материнського організму на просторові перебудови КСВ ембріонального серця.

1. Впродовж 10-12,5 діб ембріонального розвитку миші значення абсолютного об'єму конденсованої мезенхіми стовбурових подушок статистично вагомо збільшується на 86,6%, відповідний показник конусних гребенів – на 96,3% ($p < 0,05$). Кут ротації аортального каналу відносно легеневого складає $110,2 \pm 9,4^\circ$; КС відділ серця обертається проти годинникової стрілки на $32,3 \pm 3,8^\circ$.

2. Міокардіалізація подушок стовбура проходить манжетковий (з 10,5 діб пренатального розвитку) та субендокардіальний (з 11 діб) етапи; артеріалізація – септаційний (з 11,5 діб) та субендотеліальний (з 12 діб). Міокардіалізація конусних гребенів включає трабекулярний (з 11,5 діб) та субендокардіальний (з 13,5 діб) етапи. Станом на 11,5 діб ембріогенезу індекс проліферації міоцитів міокардіальної манжетки досягає найбільшого значення $51,2 \pm 2,9\%$, що на $41,5\%$ ($p < 0,05$) менше за аналогічний показник правого шлуночка.

3. Дегідратація материнського організму у період 10-12,5 діб ембріогенезу призводить до звуження АПСК та КС переходу на $37,9\%$ та $25,8\%$ ($p < 0,05$) у порівнянні з відповідними показниками у нормі. Кут ротації КС відділу достовірно вищий відносно норми на $20,1\%$.

4. Станом на 12,5 діб нормального ембріогенезу товщина стінки пазухи ЛС достовірно більша на $44,2\%$ за відповідний показник Ао; на 13,5 діб товщина стінок пазух обох судин вирівнюється; на 15-у добу стінка пазухи Ао достовірно товща за ЛС на $24,0\%$. Ріст товщини аортальної стінки супроводжується ростом ендотеліоцитів. У стінці Ао переважає відносна товщина медії, в стінці ЛС – інтими та адвентиції. Вповільнена редукція конденсованої мезенхіми дорсального гребеня супроводжується формуванням правого надшлуночкового гребеня. Закриття первинного МШО відбувається шляхом поєднання м'язової частини МШП, верхнього лімбу дорсального гребеня та верхньої АВ подушки (станом на 13 діб); вторинного – вкороченої міокардіальної манжетки і залишків конденсованої мезенхіми конусних гребенів (станом на 14,5 діб).

5. За умов дегідратації материнського організму протягом 12,5-15 діб пренатального розвитку статистично вагомо зростають значення товщини стінки аортального синуса, об'ємної щільності її міжклітинного компонента, розмірів гладком'язових та ендотеліальних клітин стінки, товщини трабекулярного і компактного міокарда аортального присінка, площі поверхні МШП, з піком змін у термін 13 та 13,5 діб ембріонального розвитку. Товщина інтими стінки аортального синуса достовірно збільшується на $50,2\%$ на фоні витончення медії на $25,3\%$ ($p < 0,05$). Станом на 12,5 діб ембріогенезу в експерименті площа МШО досягає найбільших змін, статистично вагомо зменшуючись на $57,6\%$ у порівнянні з нормою.

6. Площа виходу аортального присінка достовірно менша на $50,1\%$ (13 діб) та $26,2\%$ (13,5 діб) у порівнянні з відповідним показником у нормі. Абсолютний об'єм МШП статистично вагомо збільшується на $35,8\%$ (13 діб) та $31,1\%$ (13,5 діб) порівняно з нормою. Зовнішній діаметр правої вінцевої артерії за умов експерименту звужений на $50,1\%$ ($p < 0,05$) за аналогічний показник у нормі.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шаповал К. І. Нормальний і аномальний розвиток випускного тракту ембріонального серця. Участь клітин нервового гребеня / К. І. Шаповал // Морфологія. – 2008. – Т. II, № 3. – С. 5-16.

2. Дяговець К. І. Просторові перебудови випускного тракту серця мишачих зародків протягом пренатального онтогенезу / К. І. Дяговець, М. А. Машталір // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Т. 2, № 2. – С. 74-77. *Здобувачем проведено опис морфологічного дослідження.*
3. Дяговець К. І. Якісна та кількісна характеристика мезенхімної популяції структурних компонентів конуса та стовбура на етапах ранніх гістогенетичних перебудов конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші / К. І. Дяговець // Морфологія. – 2012. – Т. VI, № 3. – С. 10-17.
4. Дяговець К. І. Особливості пізнього гістогенезу дериватів конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші в нормі та за умов дегідратації материнського організму / К. І. Дяговець // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Т. 2, № 4. – С. 186-191.
5. Дяговець К. І. Ротація конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші в нормі та за умов дегідратації материнського організму / К. І. Дяговець, І. В. Твердохліб // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 47-51. *Здобувач брав участь у постановці експерименту, розробці загального плану статті та підготовці її до друку.*
6. Dyagovets K. I. Features of histogenetic restructuring of myocardial cuff and myocardium of conus under the myocardialization of structural components of the conotruncus from the embryonal mouse heart at the normal condition / K. I. Dyagovets // Світ медицини та біології. – 2013. – Т. 38, № 2. – С. 101-105.
7. Dygovets K. I. Participation of the neural crest cells in the restructuring of conotruncus of the mouse's embryo heart. Morphological observation / K. I. Dyagovets // Збірник наукових праць SWorld. Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. [«Сучасні напрямки теоретичних та прикладних досліджень»], (Одеса, 23-31 березня 2013 р.). – Одеса. – ЦИТ - 113-0114. - С. 60-66.
8. Dyagovets K.I. Ways of formation and development of derivatives of conotruncal region of the mouse embryonic heart at normal condition and under maternal dehydration / K.I. Dyagovets // The pharma innovation – journal. – 2013. – Vol. 2, № 5. – P. 51-56.
9. Дяговець К.І. Септація конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші в нормі та за умов дегідратації материнського організму / К.І. Дяговець // Український медичний альманах. – 2013. – Т. 16, № 2. – С. 55-56.
10. Шаповал К. І. Механізми скорочення довжини випускного тракту в процесі кардіогенезу / К. І. Шаповал // Мат-ли Всеукр. наук.-практ. конф. [«Актуальні проблеми ембріологічних досліджень»], (Дніпропетровськ, 2009 р.). – Дніпропетровськ. – С. 84-85.
11. Дяговець К. І. Перебудова конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші протягом пренатального онтогенезу / К. І. Дяговець // Мат-ли наук.-практ. конф. [«Морфологічні аспекти мікроциркуляції в нормі та патології»], (Тернопіль, 17-18 червня 2011 р.). – Тернопіль. – С. 78-79.
12. Дяговець К. І. Перебудова конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші протягом пренатального онтогенезу / К. І. Дяговець

// Мат-ли наук.-практ. конф. [«Сучасні методи дослідження в морфології»], (Луганськ, 9-10 листопада 2011 р.). – Луганськ. – С. 110.

13. Дяговець К. І. Біометрична оцінка кількісних перебудов конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші / К. І. Дяговець // Мат-ли Міжнар. наук.-практ. конф. [«Роль сучасної медицини у забезпеченні здоров'я суспільства»], (Одеса, 21-22 грудня 2012 р.). – Одеса. – С. 91-94.

14. Дяговець К. І. Конфігураційні зміни похідних конусу та стовбуру на етапах ранніх гістогенетичних перебудов конусно-стовбурового ембріонального серця миші та людини / К. І. Дяговець // Мат-ли XII наук. конф. [«Новини і перспективи медичної науки»], (Дніпропетровськ, 2012 р.). – Дніпропетровськ. – С. 85-86.

15. Дяговець К. І. Особливості клітинного складу структурних компонентів конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші на етапах ранніх гістогенетичних перебудов / К. І. Дяговець // Мат-ли наук.-практ. конф. [«Морфологія на сучасному етапі розвитку науки»], (Тернопіль, 5-6 жовтня 2012 р.). – Тернопіль. – С. 77-79.

16. Пат. 55038 Україна, МПК⁷ А61В 10/00. 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 ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України». - № u201001465; заявл. 12.02.10; опубл. 10.12.10, Бюл. № 23 (2010). *Здобувачем проведено аналіз літератури та здійснено практичну апробацію.*

АНОТАЦІЯ

Дяговець К.І. Шляхи утворення та розвитку похідних конусно-стовбурового відділу ембріонального серця миші в нормі та за умов дегідратації материнського організму. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.09 – гістологія, цитологія, ембріологія. ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» МОЗ України. – Івано-Франківськ, 2013.

У роботі досліджені етапи гістогенетичних перебудов КСВ ембріонального серця миші в нормі та за умов дегідратації материнського організму. Вибір напрямку експериментальної частини роботи зумовлений необхідністю виявлення залежності характеру перебудов ембріонального попередника магістральних судин та півмісяцевих клапанів від змін материнського організму за умов дегідратації. За допомогою кількісних гістологічних методик описані основні етапи формування похідних конуса та стовбура. З використанням тривимірного комп'ютерного моделювання з'ясовані механізми просторових перебудов КСВ та визначено його роль у процесах герметизації порожнин серця. Імуногістохімічне дослідження дало можливість виділити етапи міокардіалізації та артеріалізації структурних компонентів КСВ серця та з'ясувати механізм його вкорочення.

Ключові слова: конус, стовбур, аорта, легеневий стовбур, півмісяцеві клапани, дегідратація.

АННОТАЦІЯ

Дяговец Е.И. Пути образования и развития производных конусно-стволового отдела эмбрионального сердца мыши в норме и в условиях дегидратации материнского организма. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – гистология, цитология, эмбриология. ГВУЗ “Ивано-Франковский национальный медицинский университет” МЗ Украины. – Ивано-Франковск, 2013.

Группа врожденных конусно-стволовых дефектов сердца у детей является первоочередной среди врожденных пороков сердца по возможностям комбинирования с другими пороками и вовлечения в состав субклинических персистирующих дефектов. Большинство работ, посвященных аномальному кардиогенезу базируется на использовании моделей различных патологических состояний, тогда как влияние дегидратации материнского организма на гистогенетические перестройки эмбрионального сердца остается открытым вопросом. При этом обезвоживание организма матери разной степени тяжести сопровождается рядом заболеваний первого триместра беременности (гестозы, экстрагенитальная патология). Сложность гистогенетических перестроек конусно-стволового отдела эмбрионального сердца на пути формирования магистрального сосудистого поля в достаточно короткий период времени обуславливает выбор именно этого отдела сердца для предпочтительной экспериментальной модели.

Целью нашей работы было определить гистогенетические перестройки КСО сердца эмбриона мыши, которые лежат в основе его формирования и развития производных в норме и в условиях дегидратации материнского организма.

Материалом для работы послужили 317 эмбриональных сердец мышей линии C56BL/6 в условиях нормального развития и 118 в условиях дегидратации материнского организма. Были использованы гистологические, морфометрические, стереологические, иммуногистохимические, биометрические методы, а также трехмерное компьютерное моделирование.

В результате исследований удалось выяснить, что в процессе гистогенетических перестроек конусно-стволовой отдел (КСО) створчатые подушки трансформируются в надклапанную часть аорто-пульмонального септационного комплекса (АПСК) и в зону полулунных клапанов; конусные гребни – в подклапанную часть АПСК и вентро-медиальный фрагмент межжелудочковой перегородки (МЖП). При этом КСО до 11-х суток эмбриогенеза достоверно удлиняется на 56%, а потом укорачивается на 42,9% ($p < 0,05$).

В течении 10-12,5 суток эмбрионального развития значение объемной плотности конденсированной мезенхимы достоверно увеличивается на 87,9%, тогда как соответствующий показатель стволовых подушек – на 64,2% ($p < 0,05$). Клетки конденсированной мезенхимы вначале заселяют подушки ствола, достоверно увеличиваясь в значении показателя численной плотности ядер клеток на 93,9%, а после этого – конусные гребни, возрастая двукратно. Поворот аортального канала относительно легочного на $32,3 \pm 3,8^\circ$ сопровождается достоверным уменьшением толщины мезенхимы левой стволовой подушки на 93,4% и вентрального гребня на – 26,75% ($p < 0,05$).

Дегидратация материнского организма в период 10-12,5 суток эмбриогенеза приводит к нарушению распределения мезенхимы эндокардиальных структур КСО сердца с преобладанием субэндокардиальной фракции. Данные изменения отображаются на толщине АПСК и диаметре конусно-стволового перехода в срок 11,5 суток уступают аналогичным показателям в норме на 37,9% и 25,8% ($p < 0,05$) соответственно. Угол ротации достоверно увеличивается на 20,1% относительно нормы; площадь межжелудочкового отверстия уменьшается на 57,6% ($p < 0,05$) в отличие от соответствующего значения в норме.

Толщина трабекулярного миокарда конусного отдела сердца вдвое меньше, чем аналогичный показатель правого желудочка. До ротационных изменений значение толщины компактного миокарда конуса на 42,8% ($p < 0,05$) меньше, чем соответствующее значение миокарда правого желудочка. Установлено, что конусная миокардиализация отличается от стволовой отсутствием двух стадий. Достоверное снижение индекса пролиферации миоцитов миокардиальной манжетки относительно соответствующего показателя кардиомиоцитов правого желудочка может быть причиной укорочения КСО сердца.

В срок 12,5 суток гестации толщина стенки надклапанной части легочного ствола больше 44,2% ($p < 0,05$), чем соответствующий показатель со стороны аорты; на 13,5 суток показатели толщины стенок надклапанных частей сосудов выравниваются; на 15-е сутки стенка надклапанной части аорты достоверно толще на 24,0%. Закрытие первичного МЖО происходит путем соединения мышечной части МЖП, верхнего лимба дорсального гребня и верхней атрио-вентрикулярной подушки; вторичного – за счет соединения укороченной миокардиальной манжетки и остатков конусных гребней.

В условиях дегидратации материнского организма максимальные изменения происходят на протяжении 13-х суток. При этом сужается подклапанная зона аорты и уменьшается площадь выхода аортального преддверия на 50,1% (13 сут.) и 26,2% (13,5 сут.). Эти изменения сопровождают признаки разрастания мембранозной части МЖП и сужения устья правой венечной артерии на 51,1% ($p < 0,05$) в срок 13,5 сут. гестации. Аортальный клапан подвергается задержке в уменьшении длины на фоне увеличенного показателя абсолютного объема.

Ключевые слова: конус, ствол, аорта, легочной ствол, полулунные клапаны, дегидратация.

ANNOTATION

Dyagovets K. I. Ways of formation and development of derivatives of conotruncal region of the mouse embryonic heart at normal condition and under maternal dehydration. – Manuscript.

Dissertation for the degree of Candidate of medical sciences in specialty 14.03.09 – histology, cytology, embryology. SHEI “Ivano-Frankivsk National Medical University” MPH of Ukraine. – Ivano-Frankivsk, 2013.

In this work stages of histogenetic reorganizations of the conotruncus of mouse embryonic heart at normal condition and under the maternal dehydration were investigated. It was necessary to define the dependence of the character of reorganizations of the progenitor of great vessels and semilunar valves from the maternal hemodynamic changes under the dehydration. Main stages of formation of derivatives of conotruncus were described with the help of histological methods. Using three-dimensional computer modeling it was clarified the mechanisms of spatial rearrangements of the conotruncus and its role in the process of the heart chambers hermetization. Immunohistochemical methods enabled us to distinguish the stages of myocardialization and arterialization of the structural components of conotruncus and to determine the mechanism of its shortening.

Key words: conus, truncus, aorta, pulmonary trunk, semilunar valves, dehydration.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AB

атріовентрикулярний

АПСК

аортопульмональний септаційний комплекс

Ao	аорта
BBC	врожені вади серця
KCB	конусно-стовбуровий відділ
ЛС	легеневий стовбур
МШО	міжшлуночковий отвір
МШП	міжшлуночкова перегородка
НГ	нервовий гребінь
α SMA	альфа-гладком'язовий актин
NF	білки триплету нейрофіламентів
GFAP	гліальний фібрилярний кислий білок
+	позитивні

