

у нестатевозрілих щурів, найменші - у статевозрілих; можливо, за рахунок добре розвинутих компенсаторно-адаптаційних механізмів у тварин репродуктивного періоду.

3. Виразність змін морфології та морфометричних показників нейронів рухового ядра спинного мозку напряму залежать від термінів експерименту, а також віку тварин.

**Перспективи подальших досліджень в даному напрямку.** Отримані дані можуть бути використані в клініці для більш глибокого вивчення патогенезу та методів лікування захворювань, пов'язаних з руховими розладами при тривалому застосуванні барбітуратів.

#### Література

1. Рущенко И. П. Методика мониторингового исследования употребления психоактивных веществ в молодежной бреду / И. П. Рущенко, А. А. Сердюк // Соціальні технології: актуальні проблеми теорії та практики. Міжвузівський збірник наукових праць. — Одеса: Астропринт, 2005. — Вип. 25: Соціотехнологічні проблеми культури, психології та освіти. — С. 335–346.
2. Enzymatic mechanism for the phenobarbital-valproate interaction / S. Hurst, J. Hargreaves, W. Howald, J. Rexed B. The Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat // J. Comp. Neurol. - 1952. - Vol. 96, №3. - P. 415 - 495.
4. Semyanov A., Kullmann D. Kainate receptor-dependent axonal depolarization and action potential initiation in interneurons / A. Semyanov, D. Kullmann // Nat. Neurosci. - 2001. - №7. - P. 18 - 23.

#### Реферати

##### **ЗАВИСИМОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕРЕДНЕ – МЕДИАЛЬНОГО ЯДРА ПЕРЕДНИХ РОГОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ БАРБИТУРАТАМИ ОТ СРОКОВ ЭКСПЕРИМЕНТА И ВОЗРАСТА ЖИВОТНЫХ**

**Савенко Л.Д., Чурилин О.А.**

Изучена зависимость морфологических изменений передне – медиального ядра передних рогов спинного мозга крыс 2-х возрастных групп при хронической интоксикации барбитуратами. Хроническая интоксикация приводит к различным морфологическим изменениям передне – медиального ядра спинного мозга животных, степень которых напрямую зависит от сроков эксперимента, а также возраста животных.

**Ключевые слова:** передне – медиальное ядро спинного мозга, фенобарбитон.

##### **DEPENDENCE OF MORPHOLOGICAL CHANGES OF ANTERIOR-MEDIAL NUCLEUS OF ANTERIOR HORNS OF SPINAL CORD OF RATS DURING CHRONIC INTOXICATION BY BARBITURATES FROM THE TERMS OF EXPERIMENT AND AGE OF ANIMALS**

**Savenko L.D., Churilin O.A.**

Dependence of morphological changes of rats of 2th age-dependent groups during chronic intoxication by barbiturates is studied. Chronic intoxication results in different morphological changes of anterior-medial nucleus of anterior horns of spinal cord of animals, the degree of which straight depends on the terms of experiment and also age of animals.

**Key words:** anterior-medial nucleus of spinal cord, Fenobarbitonum.

УДК 616.12:611.018.835:611.89:611.013.395

##### **ПОЧАТКОВИЙ ЕТАП ФОРМУВАННЯ ВОЛОКОН ПУРКІНЬЄ В ЕМБРІОНАЛЬНОМУ СЕРЦІ ЛЮДИНИ**

**Ю.В. Сіткіна, І.С. Шронька, І.В. Твердохліб**  
Дніпропетровська державна медична академія, м. Дніпропетровськ

Вивчення етапів становлення провідної системи серця в процесі кардіогенезу і дотепер є актуальним питанням не тільки для ембріологів, але і для науковців в області терапевтичної кардіології, ультразвукової діагностики серця з причини недостатності та суперечливості дослідницьких даних стосовно генезу, механізмів, принципів формування різних рівнів провідної системи серця, яка забезпечує генерацію та проведення хвилі деполяризації до скорочувальних кардіоміоцитів.

На теперішній час результати багатьох досліджень іноземних та вітчизняних вчених, що спрямовані на вивчення походження периферійної ланки провідної системи серця (атріовентрикулярного пучка Гіса, його браншей, сітки волокон Пуркінє), не містять

однозначної думки з цього приводу. Група учених [8] приводить дані, які вказують на єдине джерело розвитку структурних елементів вентрикулярної частини провідної системи хребетних - з первинних трабекул вентрикулярного компоненту серця. Дані інших авторів [3] свідчать про гетерогенність походження клітин волокон Пуркінє (у серці курки). За допомогою імуногістохімічних маркерів встановлено, що клітини, які формують систему Гіса-Пуркінє у курки, належать до двох популяцій та виявляються по експресії різних білків – cell surface carbohydrates PSA-NCAM та HNK-1 [2]. Останній характерний для клітин нервового гребеня.

Lamers W et al. [5] схиляються до думки про те, що синоатріальний та атріовентрикулярний вузли, міжвузольні тракти, пучок Гіса та його гілки формуються за участю клітин нервового гребеня, які заселяють ендокардіальні подушки та зону первинного міжшлуночкового отвору у ранньому серці. У подальшому зазначені структури приймають участь в розвитку конотрункуса, частини міжшлуночкової перегородки (саме тої, в якій розташовується пучок Гіса), а також правого атріовентрикулярного з'єднання та субаортальної частини висхідного тракту. В усіх зазначених зонах знайдено клітини, що експресують відповідні білки.

У період раннього кардіогенезу в умовах відсутності сформованої провідної системи функцію розповсюдження хвилі збудження беруть на себе міоцити шлуночків трабекулярного компоненту міокарда. Вони експресують в цитоплазмі протеїни, що характерні для нейронів та клітин провідної системи (HNK-1, NF, EAP-300). Згодом рівень експресії цих білків спадає та повністю зникає на більш пізніх стадіях у більшості ділянок серця, залишаючись лише в сегментах розташування нервових гангліїв серця та у провідних кардіоміоцитах. З результатів аналізу даних низки досліджень [4, 6] визначено, що експресія даних протеїнів характерна для клітин, які є похідними нервового гребеня. Крім того, відомо, що у період становлення провідної системи серця кардіоміоцити, що диференціюються, експресують цитоскелетні білки, що характерні для м'язової, але не для серцевої м'язової тканини. Це, наприклад, міозин-зв'язувальний білок ( $\alpha$ - та  $\beta$ -форми),  $\alpha$ -гладком'язовий актин ( $\alpha$ SMA) та інші [7, 9].

Отже, до теперішнього часу є не до кінця вивченими питання походження, взаємовідносин кластерів клітин, що формують різні ланки провідної системи серця, а також механізми регуляції їхнього гістогенезу та динаміка рівня експресії специфічних білків впродовж кардіогенезу на різних рівнях - повільної та швидкої передачі імпульсу.

Метою роботи було вивчення початкового етапу формування системи волокон Пуркінє у шлуночках серця людини.

Матеріал та методи дослідження. Нами були досліджені 12 сердець ембріонів людини у період з 5 до 7 тижня гестації. Матеріал фіксували у 10% нейтральному забу-ференому формаліні з подальшою обробкою за стандартною методикою. Для вивчення кардіоміоцитів провідної системи застосовували антитіла до білків триплету нейро-філаментів (Neurofilament 200kDa & 68kDa (NF)), антитіла до  $\alpha$ -гладком'язового актину ( $\alpha$ SMA) (Lab Vision Corporation) з системою візуалізації LSAB.

Результати дослідження та їх обговорення. На 5 тижні ембріонального розвитку людини в субендокардіальному шарі вентрикулярного міокарда, сформованому за рахунок архітектурно невпорядкованих трабекул, ми спостерігали поодинокі клітини, які накопичували маркер NF. Характер та рівень експресії NF клітинами у зазначених ділянках відрізнялися від таких у інших імунопозитивних кардіоміоцитів. Експресія білків нейрофіламентів відбувалася в них рівномірно по всій цитоплазмі (умовно ми назвали ці клітини, як NF-позитивні клітини I-го типу). Кардіоміоцити міжшлуночкової перегородки, стулок клапанів та більшість клітин стінки шлуночків, які також були імунопозитивними, мали інший характер розподілення антигену – у вигляді посмугованості (II тип NF-позитивних клітин).

На наш погляд, це пов'язано з коекспресією білків нейрофіламентів та міозин-зв'язувального білка приблизно з такою самою молекулярною вагою, локалізованого у ділянках А-дисків, синтез якого характерний для скелетного, але не для кардіального типу м'язової тканини. Це припущення збігається з дослідженнями Alyonucheva et al. [1], які досліджували експресію myosin binding protein-H у волокнах Пуркінє у серці ембріонів курей та доказали, що у клітинах провідної системи відбувається коекспресія нейрональних та скелетних м'язових білків.

При вивченні мікрооточення імунопозитивних клітин I типу ми з'ясували, що розташовані навкруги клітини формували пухкі архітектурні ансамблі. При аналізі мікрорегіонів з поодинокими клітинами вказаного типу, а також ділянок, що містили групи таких клітин, встановлена їх різна просторова архітектоніка: поодинокі маркер-позитивні кардіоміоцити були оточені широкими міжклітинними просторами, сформованими скорочувальними кардіоміоцитами (NF-негативними); у той час, як групи цих клітин розміщувалися у більш щільних ділянках міокарда, формуючи зони адгезії із скоротливими кардіоміоцитами.

Слід зазначити відмінність морфологічних ознак поодиноких маркер-позитивних кардіоміоцитів та клітин цього типу у складі груп: у першому випадку клітини мали відросчасту форму, високий ядерно-цитоплазматичний індекс, ядро округлої форми з добре вираженими глибокими хроматину. У свою чергу, групи складалися з клітин полігональної форми з пере-важанням довжини над шириною, відсутність відростків, невелике ексцентрично розташоване та гомогенно забарвлене ядро. Розмір ядра, порівняно з оточуючими скорочувальними кардіо-міоцитами, був у 2-3 рази менше. На наш погляд, гістоморфологічні ознаки вищеописаних клітин свідчать про те, що у субендокардіальному шарі міокарда шлуночків вони з'являються внаслідок реалізації міграційного потенціалу. Про це свідчить наявність у зоні їхнього розташування широких міжклітинних просторів, а також відросчаста форма самих клітин. У подальшому зміна форми клітин з втратою відростків вказує на зниження міграційної активності, зростання адгезійного та проліферативного потенціалів кардіоміоцитів I типу з паралельним ущільненням як клітин у групах, так і оточуючих скорочувальних кардіоміоцитів у цьому мікрорегіоні.

При вивченні топографії клітин, що міtilися антитілами до альфа-гладком'язового актину ( $\alpha$ SMA), ми з'ясували, що цей маркер розподілявся у тих самих зонах, де й антитіла до NF з тією різницею, що не спостерігалось II типу характеру розташування білків (у вигляді посмугованості). Це підтверджує наші міркування стосовно того, що, по-перше, антитілами і до нейрофіламентів, і до альфа-м'язового актину міtilяться саме провідні кардіоміоцити (коекспресія вказаних білків підтверджена даними інших авторів); по-друге, клітини атріовентрикулярного пучка, його бранші та волокна Пуркін'є мають єдине походження, бо експресують одні й ті самі протеїни з високим рівнем експресії. На 6 тижні ембріонального розвитку людини групи кардіоміоцитів, що експресували NF за I типом, характеризувалися зміною рівня експресії та нерівномірністю його ступеня у межах групи: центрально розташовані клітини мали більш виражений ступінь експресії та гетерогенність розподілення антигену. Розподілення антитіл до  $\alpha$ SMA мало схожі характеристики, притаманні для строку, що досліджувався. 7 тижень пренатального розвитку людини характеризувався зростанням чисельності груп клітин I типу та кількості самих клітин у групах. Рівень експресії NF не знижувався у порівнянні із попереднім строком, що досліджувався. Однак рівень експресії скорочувальними кардіоміоцитами різко падав. Це стосувалося і динаміки накопичення антитіл до  $\alpha$ SMA.

Вивчення даних літератури та співставлення їх із власними спостереженнями відносно механізмів реалізації клітинами міграційного, адгезійного та проліферативного потенціалів дозволило припустити, що попередники кардіоміоцитів волокон Пуркін'є мігрують у стінку шлуночків з єдиного джерела. Про це свідчить наявність широких міжклітинних просторів у містах локалізації поодиноких NF-експресуючих клітин, морфологічні ознаки приналежності цих клітин до малодиференційованого кластеру, однотипність таких клітин у правому та лівому шлуночках. Втрата відростків клітинами у подальшому, зниження ядерно-цитоплазматичного індексу, формування ізольованих груп, набуття гістоморфологічних ознак, які відрізняють ці клітини від оточуючих скорочувальних кардіоміоцитів, ущільнення останніх навкруги NF-позитивних груп клітин свідчить про те, що кластери описаних клітин утворюються шляхом проліферації клітин-мігрантів, а не завдяки диференціюванню під дією специфічних факторів із загального пула кардіоміоцитів «на місці» (як, наприклад, це відбувається у серці курки), або шляхом міграції великої кількості клітин з подальшим їх розмежуванням.

#### Висновки

1. Поява перших клітин волокон Пуркін'є в стінці шлуночків серця людини відбувається на 5 тижні ембріонального розвитку у субендокардіальному шарі міокарда.

2. Поодинокі NF-позитивні клітини мігрують у стінку шлуночків з єдиного джерела із клітинами пучка Гіса. Клітини волокон Пуркінє коекспресують білки, що притаманні клітинам нервової системи (білки нейрофіламентів), а також клітинам несерцевих типів м'язової тканини (альфа-гладком'язовий актин).
3. Характер розподілення білків нейрофіламентів у клітинах волокон Пуркінє принципово відрізняється від такого у клітин інших ланок провідної системи і топологічно характеризується рівномірністю експресії по всій цитоплазмі.
4. Реалізація адгезійного та проліферативного потенціалів NF-позитивних клітин волокон Пуркінє відбувається після завершення міграційних процесів.

*Перспективи подальших досліджень в даному напрямку. Планується продовження вивчення механізмів просторової трансформації та диференціювання волокон Пуркінє в серці людини у подальші періоди кардіогенезу.*

#### Література

1. Alyonicheva T. Skeletal muscle-specific myosin binding protein-H is expressed in Purkinje fibers of the cardiac conduction system / Alyonicheva T., Cohen-Gould L., Siewert C. // *Cirk. Res.* – 1997. – Vol. 80. - P. 665-672.
2. Chuck E. Differential expression of PSA-NCAM and HNK-1 Epitopes in the developing cardiac conduction system of the chick / E. Chuck, M. Watanabe // *Dev. Dyn.* – 1997. – Vol. 209. – P. 182-195.
3. Gourdie R. Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system / Gourdie R., Thompson R., Mikawa T. // *Development.* – 1995. – Vol. 121. – P. 1423-1431.
4. Kirby M., Stewart D. Neural crest origin of cardiac ganglion cells in the chick embryo: identification and extirpation / M. Kirby, D. Stewart // *Dev. Biol.* – 2000. – Vol. 97.- P. 433-443.
5. Lamers W. New findings concerning ventricular septation in the human heart-their implications for maldevelopment / Lamers W., Wessels A., Verbeek F. // *Circulation.* – 1999. – Vol. 86. – P. 1194-1205.
6. Sakai H. Immunoelectron microscopic localization of HNK-1 in the embryonic rat heart / Sakai H., Ikeda T., Ito H. // *Anat. Embryol.* – 1994. – Vol. 190. - P. 13-20.
7. Thornell L. Filament systems in the Purkinje fibers of the heart / L. Thornell, A. Eriksson // *Am. J. Physiol.* – 2001. – Vol. 241. – P. H291-H305.
8. Wessels A. Spatial distribution of 'tissue-specific' antigens in the developing human heart and skeletal muscle, III: an immunohistochemical analysis of the distribution of the neural tissue antigen G1N2 in the embryonic heart: implications for the development of the atrioventricular conduction system / Wessels A., Vermeulen J., Verbeek F. // *Anat. Rec.* – 1992. – Vol. 232. - P. 97-111.
9. Ya J. Expression of the smooth-muscle proteins alpha smooth-muscle actin and calponin, and of the intermediate filament protein desmin are parameters of cardiomyocyte maturation in the prenatal rat heart / Ya J., Markman M., Wagenaar G. // *Anat. Rec.* – 1997. – Vol. 249. - P. 495-505.

#### Реферати

##### НАЧАЛЬНЫЙ ЭТАП ФОРМИРОВАНИЯ ВОЛОКОН ПУРКИНЬЕ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ СЕРДЦЕ ЧЕЛОВЕКА

**Силкина Ю.В., Шпонька И.С., Твердохлеб И.В.**

Нами исследованы сердца эмбрионов человека на 5-7 неделе гестации. Использовали антитела к белкам нейрофиламентов (NF) и альфа гладкомышечного актина ( $\alpha$ SMA). Первые клетки волокон Пуркинє найдены нами на 5 неделе в субэндокардиальных слоях стенки обоих желудочков в виде отдельных клеток или их групп. Характер распределения маркера отличался от такового в других звеньях проводящей системы. Мы считаем, что волокна Пуркинє и атриовентрикулярный пучок однородны по происхождению.

**Ключевые слова:** проводящая система, волокна Пуркинє, нейрофиламенты, альфа-гладкомышечный актин, кардиогенез.

##### THE INITIAL STAGE OF FORMING FIBERS PURKINJE IN THE HUMAN EMBRYONIC HEART

**Silkina Yu., Shpon'ka I., Tverdokhleba I.**

We observed the human embryonic hearts on 5-7 week of gestation. Antibodies to the triplet of neurofilaments (NF) and alpha smooth-muscle aktin ( $\alpha$ SMA) were used. The first cells of Purkinje fibers are found by us on 5 week in the subendocardial layer both ventricles as separate cages or their groups. Character of marker distributing was different from such in other chapters conducting system. Furthermore, we consider the cells of Purkinje fibers and atrioventricular bunch have got homogeneous originally.

**Keywords:** conducting system, Purkinje fibers, neurofilaments, alpha smooth-muscle aktin, cardiogenesis.