

УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ ГІГІЄНИЧНИЙ ЦЕНТР

на правах рукопису

СЕДНЕВА ІНГА АНДРІЇВНА

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ КІСТКОВОЇ СИСТЕМИ В РАНЬОМУ
ОНТОГЕНЕЗІ ЛЮДИНИ В НОРМІ ТА ПРИ ДІЇ МУТАГЕННИХ ФАКТОРІВ

03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1994



AB 30.300

- 2 -

Робота виконана у Львівському науково - дослідному інституті спадкової патології
 Наукові керівники: кандидат медичних наук,
 старший науковий співробітник

[О.О. СОЗАНСЬКИЙ]

доктор медичних наук,
 професор І.Р. БАРИЛЯК

Офіційні споненти: доктор медичних наук
 О.І. ТИМЧЕНКО
 доктор біологічних наук
 професор Л.Є. КОВАЛЬЧУК

Провідна організація: Львівський державний університет
 ім І. Франка

Захист відбудеться "___" _____ 1994 р. о ___ год.

на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 01.37.01 з
 докторських дисертацій в Українському науковому
 гігієнічному центрі
 254660, Київ - 94, вул. Попудренка, 50.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Українського
 гігієнічного центру

Автореферат розісланий "___" _____ 1994 р.

Вчений секретар
 Спеціалізованої вченої ради,
 кандидат медичних наук

В.Ю. Селезньов

ЛНБ ім. В. Стефаніка
 АН України

Актуальність теми. Одним з актуальних завдань медичної генетики є вивчення причин виникнення спадкових та вроджених вад розвитку (ВЕР). Особливості морфогенеза на ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку представляють один з головних напрямків у вивченні клінічного поліморфізму та гетерогенності вроджених вад розвитку різного генезу у людини. Саме на цих стадіях онтогенезу формує ся різноманітна патологія органів та систем організму : серед новонароджених ВЕР зустрічаються у 3 % випадків, а у зародків значно частіше - у 10% [Stengel L., 1974].

На жаль, на сьогодні у 70 % аномалій, які реєструються, неможливо точно встановити причини їх виникнення; в 15% випадків вони пов'язані з генними мутаціями, в 5% - з хромосомними аберраціями, а 10% припадає на долю вад, які викликаються специфічними тератогенними чинниками [Лазик Г.И., 1979].

В результаті аварії на Чорнобильській АЕС у 1986 році значна частина України опинилася в умовах надфонового радіаційного впливу. На радіоакт.вно забруднених землях проживають більш, ніж 2 млн. громадян України [Ильин Л.А. и др., 1989, Вобильова О.О., 1993].

У більшості регіонів України забруднення атмосферного повітря перевищує допустимі рівні у 5-20 разів [Сердюк А. М., 1992]. Існуюче в деяких регіонах хімічне забруднення може бути небезпечним для спадкового апарату людини [Барилік І.Р., 1992, 1993]. Згідно з даними літератури, генетичні наслідки впливу хімічних чинників-еквівалентні дії іонізуючої радіації в дозі 80 бер (Запоріжжя) і 100 бер (Маріуполь) за 30 років життя [Антипенко Є.М. і співавтори, 1992].

Проте не всі наслідки дії шкідливих факторів зовнішнього середовища на організм людини вивчені. Це стосується, зокрема, вивчення впливу малих доз радіації на зародок, що розвивається, а також наслідків "хімічної хвороби" в м. Чернівці. Сьогодні є очевидним, що екстраполяція даних, отриманих в експерименті навіть на ссавцях, може бути прийнята досить умовно, тому що практично ні один вид ссавців не ідентичний людині у відношенні чутливості до тератогенних чинників. Також слід прийняти до уваги відмінності у дозах, які застосовуються в експерименті, особливості метаболізму та ферментативних перетворень у тварин. Одним з проявів тератогенних ефектів, в тому

числі і у людини, є дефекти кісткової системи, що складають значну частину - від 51 % [Штурм В.А., 1968] до 97,6 % [Черствой Е.Д., 1984] в спектрі вроджених вад розвитку у дітей. Найбільшу питому вагу мають аномалії розвитку кінцівок - 75 % [Рудський А.В., Михайлов А.Н., 1987]. У взаємозв'язку з етіологічними та патогенетичними факторами нагаданими роль відіграє морфологічне дослідження кісткової системи зародка людини [Pinto-Machado J., 1988]. Крім цього, характеристика частоти та спектру вроджених аномалій розвитку, складена для репрезентативних груп популяції, може в значній мірі висвітлити питання оцінки динаміки тератогенних ефектів в популяції при дії шкідливих факторів зовнішнього середовища .

Метою даної роботи було вивчити на нативному матеріалі процеси окостеніння скелету ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів в нормі, а також розробити методичні підходи до вивчення тератогенних ефектів в популяції на моделі кісткової системи зародка людини.

Для досягнення поставленої мети послідовно розв'язували наступні задачі:

1. Розробити метод нативного визначення зон окостеніння хрящових моделей кісток у абортіваних ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку, а також провести порівняльний аналіз авторського методу нативного визначення зон окостеніння з класичними методами фарбування кісток за Доусоном та Петерсом.
2. На нативному матеріалі визначити розміри хрящових моделей дефінітивних кісток поясу верхніх та нижніх кінцівок та їх зон окостеніння в нормі.
3. Визначити характер взаємозв'язку між довжиною кістки та розміром II зони окостеніння в нормі та дослідити міжіндивідуальні відмінності в динаміці окостеніння ембріонів і плодів людини львівської популяції.
4. Дослідити особливості морфогенезу людини в умовах дії малих доз радіації (Чернігівська область).
5. Вивчити в динаміці особливості морфогенезу кісткової системи ембріонів і плодів людини в умовах впливу хімічних чинників зовнішнього середовища (м.Чернівці).

Наукова новизна дослідження. Вперше запропоновано спосіб визначення зон окостеніння у абортіваних ембріонів людини, який здійснюється мікроскопуванням нативних інтактних препаратів кісток зародка з використанням ефекту темного поля. Встановлено, що при використанні класичних методів виявлення зон ендохондрального окостеніння (фарбування за методиками Доусона або Петерса) достовірно змінюються розміри хрящової моделі дефінітивної кістки I, відповідно, співвідношення довжини до розміру зони окостеніння. Метод захищений авторським свідоцтвом N 1464082.

Вперше на нативному матеріалі встановлені абсолютні розміри хрящових моделей дефінітивних кісток (ключиці, плечової, ліктьової, променевої, лопаткової, стегнової, великої та малої гомілкових, тазової, пальців рук і ніг) і їхніх зон ендохондрального окостеніння. На нативному матеріалі встановлено кореляційну залежність між довжиною кістки та розміром II зони окостеніння.

На достатній кількості фактичного матеріалу показано явище міжіндивідуальних відмінностей як по розмірам хрящових моделей кісток, так і по розмірам зон окостеніння. Вперше на нативному матеріалі в період розвитку від 6 до 12 тижнів встановлено і досліджено явище латеральної асиметрії по розмірам зон окостеніння при нормальному перебігу вагітності.

Вперше запропоновано метод оцінки на нативному матеріалі впливу шкідливих чинників різного походження на зародок людини, що розвивається.

Практична цінність. В результаті проведеної роботи розроблено новий метод дослідження розвитку кісткової системи ембріона та плода людини 6-12 тижнів розвитку, що дозволяє значно розширити методичні підходи до вивчення процесів росту та диференціації кісток в нормі і патології.

Запропонований нами спосіб визначення зон ендохондрального окостеніння кісток у абортіваних ембріонів і плодів людини значно простіший, економічніший, не вимагає спеціальних реактивів та обладнання, точний, значно скорочує час дослідження. Результат отримується через 0,5 - 1 годину після забору матеріалу. В той самий час для приготування серійних зрізів кісток необхідно 3-5 днів, а на пофарбування за методикою Доусона або Петерса - 28 - 30 днів, не враховуючи часу,

потрібного для аналізу.

Розроблений метод дозволяє дати об'єктивну оцінку нативного стану хрящової моделі кістки та її диференціації (зона окостеніння).

Визначені та вивчені нативні довжини кісток та розміри їх зон окостеніння поясів верхніх та нижніх кінцівок ембріонів та плодів людини в період від 6 до 12 тижнів внутрішньоутробного розвитку. Враховуючи наявність лінійної залежності між довжиною кістки та розміром її зони окостеніння, представляється можливим за допомогою певних перерахункових коефіцієнтів за розмірами однієї кістки відновити весь скелет ембріона або плода людини в період від 6 до 12 тижнів розвитку у випадку нормального перебігу вагітності. Це особливо важливо в тих випадках, коли класичні методи визначення ступеню аріості зародка неможливі у зв'язку з тим, що він зруйнований.

Запропоновано та апробовано метод екологічного моніторингу популяції людини на моделі кісткової системи ембріона та плода людини 6 - 12 тижнів розвитку.

Впровадження результатів дослідження в практику. Результати дослідження були впроваджені в практику МПК м. Рівне, Чернівецькому пологовому будинку N 1 і N 2, Львівському НДІ спадкової патології та Українському науковому центрі медичної генетики, що дозволило оцінювати на нативному матеріалі вплив шкідливих чинників зовнішнього середовища на зародок людини, а також дає можливість проведення скрінінгу абортивного матеріалу для виявлення тератогенних навантажень на популяцію.

Основні положення, що виносяться на захист.

1. Розроблено та впроваджено новий метод нативного виявлення зон окостеніння хрящових моделей кісток у абортованих ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку, який порівняно з існуючими (методи фарбування за Доусоном та Петерсом) має переваги у часі обстеження та простоті виконання. Виявлено, що при фарбуванні скелету ембріонів під дією реактивів достовірно змінюються лінійні розміри кісток. Вперше на нативному матеріалі встановлені абсолютні розміри хрящових моделей дефіцитивних кісток поясу верхніх і нижніх кінцівок та їхніх зон окостеніння у ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку в нормі.

2. За допомогою морфометрії встановлено наявність

міжіндивідуальних відмінностей як в розмірах нативних кісток, так і в розмірах зон окостеніння ембріонів і плодів людини 6-12 тижнів розвитку; виявлено явище латеральної асиметрії в розмірах зон окостеніння при нормальному перебігу вагітності.

3. Метод дослідження динаміки остеогенезу нативних кісток ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку є адекватною та інформативною тест-системою для вивчення ембріотоксичного впливу шкідливих факторів зовнішнього середовища на зародок, що розвивається.

4. Досліджено можливість використання методу оцінки осифікації кісток зародків людини в системі екологічного моніторингу. Продемонстрована висока інформативність методу в умовах дії малих доз радіації (Чернігівська область), де визначено деформації у 5% ключиць, 5% плечових, 20% великих гомілкових та 10% малих гомілкових кісток, а також і випадок ексостозу ключиці. При альтеруючій дії хімічних чинників (м. Чернівці) виявлено випадки аномалій остеогенезу - ділянки "розірхленої" кісткової тканини по типу остеопорозу в центральній частині зони окостеніння. У 1991 році ця патологія заторкнула 44% ключиць, 53% лопаткових і 35% тагових кісток.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися і обговорювалися на конференції молодих вчених інституту медичної генетики АМН СРСР (Москва, 1987), I з'їзді медичних генетиків УРСР (Львів, 1988), XX науковій конференції молодих вчених МГУ (Москва, 1989), II Всесоюзному з'їзді медичних генетиків (Алма-Ата, 1990), на Європейській асоціації акушерів і гінекологів (Москва, 1991), I Європейському Конгресі Українських лікарських товариств / СКУЛТ / (Івано-Франківськ, 1991), IV з'їзді Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. Вавилова (Полтава, 1992).

Публікації. По темі дисертації опубліковано 18 друкованих праць.

Об'єм та структура дисертації. Робота викладена на 134 стор. машинописного тексту і включає наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи, результати власних досліджень, обговорення, заключення, висновки, список літератури. Робота містить 22 таблиці і 14 рисунків. Список літератури складається з 154 назв.

ЗМІСТ РОБОТИ.

1. Матеріал і методи дослідження. Дослідження проведено на 350 ембріонах та плодах людини 6-12 тижнів розвитку, які були отримані при медичних абортах у практично здорових жінок львівської популяції. Праця подружніх пар не була пов'язана з контактом зі шкідливими речовинами. Ці ембріони склали контрольну групу, на якій було встановлено основні закономірності морфогенезу осифікації та динаміки росту кісток поясу верхніх та нижніх кінцівок.

Нами було вивчено кісткову систему 23 ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку, отриманих від жінок львівської популяції, які приймали різні гормональні препарати (мікрофолін, фолікулін, синестрол, прогестерон та ін.) з метою переривання небажаної вагітності. Причому дози, які вживалися жінками, значно перевищували терапевтичні.

Катастрофа на ЧАЕС обумовила необхідність проведення морфологічних досліджень ембріонів та плодів людини в зоні радіаційного забруднення оточуючого середовища. Досліджено 40 ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку, які були отримані під час медичних абортів у жінок м.Чернігова.

У період епідеміологічного спалаху алопеції у дітей м. Чернівці у 1988 році проведено дослідження кісткової системи 35 ембріонів та плодів 6-12 тижнів розвитку, отриманих при медичних абортах у жінок, які постійно мешкають у м.Чернівцях. Для спостереження за динамікою тератогенних ефектів в популяції у 1991 році було досліджено кісткову систему 30 ембріонів та плодів людини, а у 1992- 25.

Вік зародка визначається по тим'яно-куприковій довжині (ТКД) з використанням таблиць [Фалин Л.И., 1976]. В тих випадках, коли зародок був зруйнований при кюретажі і ТКД виміряти не представлялося можливим, вік визначався по сукупності ознак будови кінцівок [Абрамов В.Д. и др., 1975; O'Rahilly R., Gardner E., 1975., Kellemann E., Janossa M. et al., 1984; Nessman C., 1985], а також анамнезу.

Всі необхідні відомості про жінку заносили у розроблену картку дослідження ембріона.

Вивчення нативних кісток ембріонів та плодів людини здійснювалося запропонованим нами методом мікроскопії нативних інтактних препаратів з використанням ефекту темного поля при

загальному збільшенні у 8 разів [Созанський О.О. та ін., 1988]. Оскільки даний метод запропоновано нами, його детальний опис винесено в результати досліджень. Морфометрія нативних хрящових моделей кісток та Іх зон ендохондрального окостеніння проводилася за допомогою окулярмікрометра (ціна поділки = 0,1 мм), тому при проведенні морфометрії вважали, що порівнювальні величини відрізняються, кс і відмінність у розмірах була 0,2 мм та більше.

В роботі крім авторського методу використовували гістологічні дослідження та методи забарвлення червоним алізарином за Доусоном [Dawson A., 1926], та метод подвійного забарвлення червоним алізарином і альціановим синім за Петерсом [Peters P., 1977].

II. Результати дослідження та Іх обговорення. Враховуючи особливості процесу непрямого остеогенезу - скупчення мезенхімних клітин в точці петрифікації хряща, солей кальцію, оптична густина в зоні ендохондрального окостеніння повинна бути вища, ніж безпосередньо у хрящовій тканині. Тому ми передбачили, що в умовах темного поля при наявності джерела світла знизу, зони ендохондрального окостеніння повинні виглядати непрозорими ділянками чорного кольору на фоні прозорого гіалінового хряща.

Для перевірки цього припущення проводилося дослідження абортивного матеріалу таким чином.

Ембріон, одержаний при виконанні артифіціального аборту, поміщали в чашку Петрі з поживним середовищем (розчин Хенкса або фізіологічний розчин) і відділяли кінцівки або інші частини скелета, необхідні для вивчення. Отримані таким чином нативні інтактні препарати поміщали на предметний столик біокулярної лупи. В умовах темного поля навіть через м'які тканини зразу стають помітними темні ділянки зон окостеніння на відповідних кістках ембріонів. Для кращої візуалізації і запобігання помилки оптичного характеру відділяють м'які тканини. В темному полі мікроскопа за допомогою окулярмікрометра (загальне збільшення дорівнює 8) вимірювалися лінійні розміри хрящових моделей кісток та Іх зон ендохондрального окостеніння - ділянки чорного кольору з чіткими межами на фоні прозорої хрящової тканини.

Для точної ідентифікації ділянок чорного кольору, виявлених в умовах темного поля, ми відділяли їх від хрящової частини кістки і проводили гістологічне дослідження. У всіх випадках з 50 досліджених кісток від 10 ембріонів темні зони були ідентифіковані як кісткова тканина, а світлі - як хрящова.

Таким чином, ми переконалися в тому, що виявлені нами чорні ділянки на хрящових моделях кісток ембріонів людини є зонами ендохондрального окостеніння.

Для досягнення поставленої в роботі мети в цій частині дослідження ми ставили перед собою завдання вивчити можливий вплив методичних факторів на розміри кісток скелета ембріона, а також порівняти запропонований нами метод з класичними і вибрати оптимальний з них для проведення подальших досліджень.

Вивчалися нативні інтактні препарати кісток від 10 ембріонів (ключиця, плечова, ліктьова, променева, стегнова, велика гомілкорова та мала гомілкорова). Після попередньої морфометрії вищеназаних кісток проводилося їх фарбування за методикою Доусона. Після вимірювання нативних кісток поясу верхніх та нижніх кінцівок 30 ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку вони підлягали фарбуванню за методом Петерса.

При дослідженні кісток скелета 10 ембріонів, що були пофарбовані червоним аліварином по методу Доусона, було встановлено, що відмінності в лінійних розмірах зон ендохондрального окостеніння нативних та пофарбованих кісток були недостовірними ($P > 0,05$). Виміряти довжину хрящової моделі будь-якої з досліджуваних кісток виявилось неможливим, оскільки тканина хряща під дією застосованих реактивів перетворилася в густий прозорий гель і внаслідок чого межі кістки чітко не візуалізувалися. Наші спостереження підтверджуються роботами інших дослідників [Muther Thomas F., 1988].

Після попередньої морфометрії кісток 30 ембріонів людини нами було використано метод подвійного фарбування за методом Петерса. Повторне вимірювання лінійних розмірів кісток після пофарбування виявило значні відмінності у розмірах довжини хрящової моделі дефінітивної кістки в порівнянні з нативним препаратом (таблиця 1). Виняток склали тільки ключиця і променева кістка, де відмінності в довжинах нативних та пофарбованих кісток були несуттєвими ($P > 0,05$). Ми вважаємо, що це явище можна пояснити неспецифічністю та неспрогнозованою дією

реактивів, які застосовуються в процесі фарбування. Для ключиці також це явище може бути пов'язане з тим, що на цьому етапі розвитку вона окостеніння займає значну частину кістки, тому вона більш стійка до впливу реактивів (відмінності у розмірах

Таблиця 1

Порівняльна характеристика нативних та пофарбованих по методу Петерса кісток ембріонів людини 6-12 тижнів розвитку.

Назва кістки	Кількість вивчених кісток	Довжина кістки I		I
		I нативна	I пофарбована	
Ключиця	26	4,22 ± 0,38	3,65 ± 0,41	> 0,05
Плечова	19	7,81 ± 1,50	4,72 ± 0,75	< 0,05
Ліктова	16	5,99 ± 0,65	4,99 ± 0,67	> 0,05
Променева	15	5,32 ± 0,62	4,27 ± 0,59	< 0,05
Стегнова	21	5,32 ± 0,41	4,37 ± 0,35	< 0,05
Велика гомілквова	13	4,78 ± 0,47	3,42 ± 0,49	< 0,05
Мала гомілквова	12	4,03 ± 0,49	2,95 ± 0,54	< 0,05

Примітка : всі розміри подані в мм.

зона окостеніння у всіх досліджених кісток були несуттєвими ($P > 0,05$). Ми припускаємо, що це явище пов'язане з особливостями будови кісткової тканини, яка більш стійка до впливу різних реактивів, які застосовуються для її фарбування (етанол 96, КОН, льодяна оцтова кислота та інші).

В доступній нам літературі ми виявили достатню кількість робіт, де цей метод використовується для встановлення основних закономірностей розвитку кінцівок. Наприклад, автором на основі отриманих даних приводяться рівняння, за якими на підставі довжин окремої пофарбованої кістки можна визначити гестаційний вік ембріона [Кабак С.Л., 1988; Кабак С.Л., Феценко С.Н., Аниськова Е.П., 1990]. Отримані нами дані (достовірною різницею між довжинами нативних кісток та пофарбованих за методом Peters'a) свідчать про недоцільність проведення морфометрії пофарбованих кісток з метою встановлення основних закономірностей росту у зв'язку з ризиком отримання значної помилки визначення віку зародка на основі довжини пофарбованої кістки.

Таким чином, запропонований нами метод вивчення нативних кісток ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку значно скорочує час, необхідний для дослідження: 0,5 - 1 година замість 25-30 днів при фарбуванні за методами Доусона або Петерса. Також нами встановлено, що реактиви, які використовуються при фарбуванні, впливають на результати оцінки розмірів кісток, тим самим змінюючи співвідношення довжини кістки до розміру зони окостеніння, що має бути враховано при аналогічних дослідженнях.

Методом морфометрії нативних інтактних препаратів кісток скелета ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку було вивчено взаємозв'язок розмірів хрящових моделей кісток та їх зони окостеніння. Хрящові моделі кісток починають осифікуватися при досягненні певної довжини і терміну розвитку, що є відмінним для кожної з досліджуваних кісток. В подальшому ріст зони окостеніння відбувається прямо пропорційно збільшенню довжини самої кістки, про що свідчать високі коефіцієнти кореляції - від 0.95 у стегнової кістки до 0.99 у ключиці. Встановлена нами лінійна залежність росту та диференціації нативних кісток в період від 6 до 12 тижнів внутрішньоутробного розвитку людини підтверджується результатами робіт інших авторів [Абрамов В.Д. и др., 1975; Munsick R.A., 1984; Кабак С.Л. и др., 1990]. Враховуючи високі коефіцієнти кореляції, нам представляється можливим по одній з досліджуваних кісток моделювати весь скелет ембріона або плода людини в період від 6 до 12 тижнів розвитку.

При вивченні кісток ембріонів та плодів людини ми зауважили випадки відмінностей розмірів зони окостеніння при однаковій довжині хрящових моделей кісток у різних індивідів і навпаки. Дані, приведені в таблиці 2, вказують на наявність міжіндивідуальних відмінностей росту кісток ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку, що свідчить про те, що не дивлячись на тісний взаємозв'язок процесів росту кістки та її диференціації, існує явище достатньо виражених міжіндивідуальних відмінностей як за довжиною хрящові моделі кістки, так і за розмірами зони окостеніння. Особливо чітко воно демонструється в тих випадках, коли у одного індивіда при певному розмірі хрящові моделі кістки наявна зона окостеніння, а у іншого при такому ж самому розмірі вона відсутня. При

Таблиця 2

Міжіндивідуальні відмінності довжин кісток і розмірів зон окостеніння ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку.

Найменування кістки	Кількість випадків	Довжина кістки		Розмір зони	
		І	І	І	І
		І	% варіабельності	І	% варіабельності
Ключиця	140	16.4 ± 6.1		15.0 ± 6.0	
Плечова	156	16.0 ± 5.8		10.8 ± 4.9	
Ліктьова	139	12.9 ± 5.6		7.9 ± 6.8	
Променева	126	19.1 ± 6.8		23.8 ± 7.4	
Стегнова	106	16.0 ± 7.0		13.2 ± 6.4	
Велика гомілквова	108	28.7 ± 9.0		25.0 ± 8.2	
Мала гомілквова	75	17.3 ± 8.6		21.3 ± 9.3	

дослідженні скелета деяких зародків нами було виявлено явище латеральної асиметрії по розмірах зон окостеніння на парних кістках в одного й того ж індивіда (таблиця 3).

Як видно з таблиці, найбільшу кількість випадків асиметричності розвитку окостеніння виявлено на лопатковій (48 %) та тазовій (34 %) кістках, що може бути пов'язано з особливостями будови цих кісток.

Значна кількість дослідників звертає увагу на появу стадій асиметричності розвитку процесів нормального морфогенезу [Bagnall K.M. et al., 1982; Balseiro J. et al., 1988; Shankland M., Martindale M., 1989;]. Причини цього явища до кінця не розкриті, але ми підтримуємо думку тих авторів, які вважають, що на певних етапах розвитку людини явище латеральної асиметрії є нормою [Астауров В.Л., 1974; Jacob H.J., Hinrichsen K., 1984; Newman S.A., 1988].

Невважаючи на значну кількість робіт, залишається нерозв'язаним питання, чому один і той же пошкоджуючий чинник, який діє на весь організм на певних етапах розвитку, викликає наявність аномалій різного ступеню проявів з правої і лівої сторони тіла. Не можна заперечувати, що при дії будь-якого

Латеральна асиметрія розмірів зон окостеніння
нативних кісток ембріона та плода людини.

Назва кістки	I	I	I	I	I
	I	Кількість	I	Кількість	I
	I	вивчених	I	асиметри-	I
	I	пар кісток	I	чних пар	I
				%	
Ключиця		31		7	23
Плечова		21		6	29
Ліктова		17		2	12
Променева		18		5	28
Стегнова		33		9	27
Велика гомілквова		18		4	22
Мала гомілквова		18		5	28
Лопаткова		40		19	48
Тазова		44		15	34
Пальці рук		14		2	14
Пальці ніг		17		1	5

пошкоджуючого агента (ексагенного або ендогенного походження в ТТП (тератогенний термінаційний період) розвитку кісткової системи зародка людини можна очікувати виникнення різноманітних вад розвитку. Нам представляється можливим припустити, що міжіндивідуальні відмінності та латеральна асиметрія росту та диференціації кісток ембріона людини може бути матеріальною основою виникнення клінічного поліморфізму вад розвитку кісткової системи.

Нами були вивчені нативні інтактні препарати кісток поясу верхніх та нижніх кінцівок 8-12 тижневих ембріонів та плодів людини. Зародки були одержані при медичних абортах жінок, які приймали різні гормональні препарати (мікрофолін, фолікулін, синестрол, прогестерон та ін.) з метою переривання небажаної вагітності. Причому дози, які вживалися жінками, значно перевищували терапевтичні. Проведено морфологічний аналіз та морфометрію за двома основними параметрами: довжина кістки і розмір зони окостеніння. Аномалій морфогенеза вищеназваних кісток не було виявлено. Статистична обробка отриманих даних (порівняння з нормальною виборкою) виявила достовірні

відмінності як в довжині кісток, так і в розмірах зон окостеніння. Наприклад, середня довжина ключиці в контролі була 5.24 ± 0.21 мм, тоді як в досліджуваній групі вона складала 4.41 ± 0.58 мм. Отримані нами дані свідчать про несприятливий ендогенний вплив на динаміку остеогенезу кісток ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку гормональних препаратів, що виражається у зменшенні середніх розмірів кісток та їх зон окостеніння порівняно з нормою (порівнювалися ембріони та плоди людини однакових термінів розвитку). Разом з тим, ці дані дозволили припустити можливість використання моделі осифікації кісткової системи плодів людини як тест-системи оцінки альтеруючої дії чинників навколишнього середовища на внутрішньоутробний розвиток.

У зв'язку зі значним забрудненням оточуючого середовища особливої актуальності набуває оцінка наслідків впливу шкідливих факторів на зародок, що розвивається. Одним з проявів тератогенних ефектів, в тому числі і у людини, є дефекти кісткової системи, що складають значну частину в спектрі вроджених вад розвитку. Аварія на ЧАЕС обумовила необхідність проведення морфологічних досліджень ембріона та плода людини з метою визначення впливу хронічних малих доз радіації на зародок. Досліджено 40 ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку, одержаних при медичних абортах у жінок популяції м. Чернігова. За авторською методикою вивчалися нативні інтактні препарати кісток поясу верхніх та нижніх кінцівок. Проведено морфологічний аналіз та морфометрію хрящових моделей 300 кісток та їх зон ендохондрального окостеніння. При одержанні кожного препарату проводилася верифікація можливих відхилень морфогенезу кожної з досліджених кісток: ключиці, плечової, ліктьової, променевої, лопаткової, стегнової, великої та малої гомілкових, тазової, пальців рук та ніг. Одержані дані склали основу для побудови, у першу чергу, індивідуальної характеристики морфологічних відхилень розвитку кісткової системи ембріона та плода людини.

При вивченні характеру взаємозв'язку між довжиною кістки та розміром її зони окостеніння нами відмічено збереження лінійної залежності як в контрольній, так і в дослідній групі. Для всіх вивчених кісток, крім стегнової, коефіцієнт кореляції коливався в межах від 0.97 до 0.99. За норму ми обра-

ли розвиток кісткової системи ембріонів та плодів людини Львівської області, оскільки вона вважається радіаційно чистою.

В процесі досліджень нами виявлено різноманітні відхилення процесу нормального морфогенезу такі як деформації кістки, екзостози. Деформації кісток зустрічалися у 5% ключиць, 5% плечових, 20% великих гомілкових та 10% малих гомілкових кісток. Відмічено 1 випадок остеопорозу на ключиці.

При порівнянні частот випадків асиметрії по розмірах зон окостеніння нами не виявлено достовірної різниці між ембріонами і плодами львівської та чернігівської популяцій. Слід відзначити, що і в дослідній групі найбільша кількість виявлених випадків асиметричності розмірів зон окостеніння припадає на лопаткову (57%), і тазову (40%) кістки. При статистичній обробці отриманих даних нами виявлено достовірні відмінності як в довжині кісток, так і в розмірах зон окостеніння в порівнянні з контролем. В дослідній групі нами спостерігалось, як правило, пропорційне зменшення довжин кісток та Іх зон ендохондрального окостеніння порівняно з контролем (львівська популяція). Наприклад, якщо у львівської популяції ембріонів та плодів того ж самого терміну розвитку середня довжина ключиці складала 5.04 ± 0.16 мм, а розмір зони окостеніння 3.84 ± 0.14 , то у чернігівської популяції відповідно 4.22 ± 0.38 мм і 3.06 ± 0.32 .

Відповідно до ретроспективного аналізу спектру вроджених вад розвитку по системах органів новонароджених у м.Чернігові за 1986 рік та за перше півріччя 1987 року, проведеного співробітниками НДІ СП, виявлено, що у першому півріччі 1986 року народилося 29 дітей (на 2371 новонароджених) з вродженими аномаліями кінцівок, у другому півріччі Іх було зареєстровано вже 76 на 2812 новонароджених, а у І півріччі 1987 року - 165 на 2686 новонароджених, що складає 69% питомої ваги всіх виявлених вроджених аномалій. Отримані в нашій роботі дані ретроспективного аналізу вроджених вад розвитку новонароджених, морфологічного аналізу кісткової системи ембріонів та плодів людини 6 - 12 тижнів розвитку чернігівської популяції та робота А.П.Крисюка з співавт. (1993) свідчать на користь припущення, що низькодозове хронічне опромінення викликає виникнення морфологічних змін в кістковій системі людини.

Визначення частоти та спектру хромосомних аберацій в ембріональних лімфоїдних клітинах печінки (за методикою Со-

занського О.О. та ін., 1989) також виявило 3.7 % аберантних клітин в Чернігівській популяції [Гаврилюк Ю.Л., Саванський О.О. та ін., 1992]. Зростання числа вроджених аномалій розвитку, рівня хромосомних аберацій та підвищення пошкоджень кісткової системи ембріонів вказують на генетично обумовлену нестабільність в Чернігівській популяції, що виникла після аварії на ЧАЕС.

У 1988 році в м.Чернівцях вперше було зареєстровано випадки тотальної алопеції у дітей, що дає підстави висунути гіпотезу про наявність шкідливого впливу факторів зовнішнього середовища, можливо, хімічної природи. Нами проведено дослідження кісткової системи 35 ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів внутрішньоутробного розвитку, які були отримані при медичних абортах жінок чернівецької популяції. З метою спостереження за динамікою тератогених ефектів в популяції у 1991 році нами була досліджена кісткова система 30, а у 1992 - 25 ембріонів та плодів.

Вивчалось по 200-250 кісток в кожній з репрезентативних груп ембріонів та плодів. З метою створення банку даних всі ембріони і плоди після дослідження підлягали фарбуванню альціановим синім та червоним аліваріном за методикою Peters'a (1977) .

Слід відзначити, що характер взаємозв'язку між довжиною кістки та розміром її зони окостеніння зберігає лінійну залежність у всіх досліджених групах ембріонів чернівецької популяції. У 1988 та 1991 рр. у всіх досліджених кісток коефіцієнт кореляції був в межах від 0.97 до 0.99, а у 1992 р. - від 0.93 (стегнова кістка) до 0.9. Такі високі коефіцієнти кореляції свідчать про збереження пропорційності процесів росту та диференціації кісток, незважаючи на несприятливий вплив факторів зовнішнього середовища.

При проведенні морфологічного аналізу кісток ембріонів та плодів нами виявлено випадки аномалій остеогенезу - ділянки "розривленої" кісткової тканини по типу остеопорозу в центральній частині зони окостеніння. На сьогодні немає єдиної теорії, яка би пояснювала це явище, а існуючі поодинокі гіпотези суперечливі. В одному випадку остеопороз розглядається як наслідок первинного порушення метаболізму кальцію [Перепуст

Л.А., 1972; Сметник В.П., Кангельдієва А.А., 1988]. За гіпотезою інших авторів [Биркун А.А., 1989], в основі остеопорозу лежить порушення процесів проліферації та диференціації клітин, які приймають участь в процесах осифікації. Остеопороз в центральній ділянці кістки характерний для дії хімічних тератогенів, що підтверджується отриманими нами результатами.

Спостерігаючи це явище в динаміці (1988, 1991 та 1992 роки), нами відмічено значне збільшення випадків такого типу аномалій у 1991 році - 26 % від загальної кількості вивчених кісток (таблиця 4). Якщо у 1988 році у 25 % досліджених лопаткових кісток було виявлено аномалію остеогенезу, то у 1991 році вже було 53 %, а у 1992 році спостерігалось зниження цієї патології майже до рівня 1988 року - 29%. Ми припускаємо, що у 1991 році відбулося накопичення шкідливих агентів у зовнішньому середовищі даного району, яке проявилось через пошкодження процесу остеогенезу в ембріональному розвитку людини. У групі ембріонів, досліджених у 1992 році, мало місце зниження кількості виявленої аномалії до 10 %, але об'єктивної оцінки цього явища ми не можемо дати, оскільки об'єм експериментальної вибірки є меншим, ніж у 1991 році - майже у 2 рази (таблиця 4).

Необхідно підкреслити, що всі випадки виявленої патології зустрічалися у ембріонів і плодів 9-12 тижнів розвитку, тобто у період найбільшої активності процесів диференціації хрящової моделі дефінітивної кістки.

Слід відзначити, що у період спалаху алопеції у дітей у 1988 році, спектр виявленої патології кісткової системи ембріонів і плодів був ширший, ніж в наступні роки. Нами було виявлено випадки кісткової деформації, екастози, остеопорози а також 3 випадки асиметрії довжини кісток.

Статистична обробка отриманих даних дозволила виявити достовірні відмінності як в довжині кісток, так і в розмірах зон окостеніння в порівнянні з контролем (львівська популяція) у всіх досліджених групах ембріонів та плодів чернівецької популяції. В дослідній групі ембріонів та плодів, отриманих нами у 1988 році, спостерігалось аменшення середньої довжини кісток та їх зон окостеніння порівняно з контрольними показниками (львівська популяція). Наприклад, середня довжина ключиці ембріонів та плодів людини львівської популяції була 6.25 ± 0.21 мм, а чернівецької - 4.52 ± 0.75 ; розмір зони

окостеніння 5.92 ± 0.26 мм та 4.28 ± 0.73 мм відповідно.

У 1991 та 1992 роках нами спостерігалось зворотнє явище: середні довжини ембріонів та плодів Чернівецької популяції були достовірно більшими від середніх розмірів кісток та їх зон окостеніння контрольної групи. Гістологічний аналіз кісток, отриманих від ембріонів та плодів людини Чернівецької популяції, проведений сумісно зі співробітниками НДІ медико-екологічних проблем (м.Чернівці), підтвердив наявність остеопорозу в кістках, виявленого при морфологічному аналізі.

Таблиця 4

Випадки виявлених аномалій остеогенезу ембріонів та плодів людини при динамічному спостереженні чернівецької популяції.

Назва кістки	ІК-сть вивчених кісток			К-сть випадків патології*		
	1988 р	1991 р	1992 р	1988 р	1991 р	1992 р
Ключиця	21	25	16	1 (5)	11 (44)	3 (19)
Плечова	21	25	14	2 (10)	1 (4)	1 (7)
Ліктьова	20	23	12	0 (0)	2 (9)	0 (0)
Променева	22	24	10	0 (0)	4 (17)	0 (0)
Стегнова	17	22	14	1 (6)	5 (27)	0 (0)
Велика гомілквова	14	21	12	0 (0)	3 (14)	0 (0)
Мала гомілквова	15	23	11	0 (0)	5 (21)	2 (18)
Лопаткова	16	32	14	4 (25)	17 (53)	4 (29)
Тазова	22	27	17	3 (14)	10 (37)	2 (12)
Всього:	168	222	120	11 (7)	58 (26)	12 (10)

* в дужках подано питому вагу виявленої патології у в'сотках.

В той же час відзначено, що темпи осифікації кісток дещо випереджують норму. Про це опосередковано свідчить посилення каріопікнозу в хондроцитах. Результати морфометрії, морфологічного та патологічних досліджень дають можливість припустити, що хімічні чинники, які діють в даній популяції, впливають на порушення протікання процесів нормального осте-

генеу, викликаючи остеопороз, а, з іншого боку, вони посилюють процеси осифікації, що фіксується у збільшенні середніх довжин кісток та їх зон окостеніння порівняно з контролем (львівська популяція). Причому зменшення кількості остеобластів, яке спостерігалось при аналізі гістологічних препаратів, може свідчити не тільки про порушення проліферації в сторону її пригнічення, а і про посилення процесів осифікації [Gimmermann B., 1992].

Динамічне спостереження за частотою та спектром хромосомних аберацій в ембріональних лімфоїдних клітинах печінки ембріонів та плодів людини чернівецької популяції виявило значне збільшення метафазних пластин з абераціями хромосом у 1992 році - 14,1%, що більше, ніж у два рази перевищує ідентичні показники попереднього року [Гулек Н.Л., Седнева І.А., 1994].

Таким чином, зростання рівня хромосомних аберацій та підвищення пошкоджень кісткової системи ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку вказують на генетично обумовлену нестабільність, що виникла в результаті дії хімічних чинників в чернівецькій популяції.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено та впроваджено новий метод нативного виявлення зон окостеніння хрящових моделей кісток у абортіваних ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку, який порівняно з існуючими має переваги в часі, точності та простоті виконання.

2. При використанні класичних методів виявлення зон окостеніння (методи фарбування за Доусоном та Петерсом) змінюються лінійні розміри хрящової моделі кістки, і відповідно співвідношення довжини до розміру зони окостеніння, що свідчить про необхідність дослідження нативних препаратів кісток.

3. Вперше на нативному матеріалі встановлені абсолютні розміри хрящових моделей дефінітивних кісток посу верхніх та нижніх кінцівок та їхніх зон окостеніння у ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку в нормі. Встановлено кореляційну залежність між довжиною нативної кістки та її зоною окостеніння; в період розвитку від 6 до 12 тижнів вона має лінійний характер (коефіцієнт кореляції дорівнює 0.95 - 0.99).

4. За допомогою морфометрії встановлено наявність міжіндивідуальних відмінностей як в розмірах нативних кісток, так і в розмірах зон окостеніння ембріонів і плодів людини 6-12 тижнів розвитку; виявлено явище латеральної асиметрії в розмірах зон окостеніння при нормальному перебігу вагітності.

5. Досліджено можливість використання метода оцінки осифікації нативних кісток зародків людини як метод екологічного моніторингу. Продемонстрована висока інформативність методу при дослідженні дії малих доз радіації на зародок людини (м.Чернівецька область) і альтеруючій дії хімічних чинників (м.Чернівці). Виявлено випадки аномалій остеогенезу - ділянки "розрихленої" кісткової тканини по типу остеопорозу в центральній частині зони окостеніння. У 1991 році ця патологія затронула 44% ключиць, 53% лопаткових і 35% тазових кісток.

6. Спостереження за динамікою та спектром морфологічних змін кісткової системи ембріонів і плодів людини Чернівецької популяції дозволило виявити значне збільшення випадків остеопорозу у 1991 році, а в період розвитку від 8 до 11 тижнів ця аномалія захоплює 100% досліджених плодів. Спектр виявленої патології (деформації, екаостози, остеопорози) кісткової системи ембріонів і плодів у 1988 році був ширший, ніж у наступні роки.

7. Метод дослідження динаміки остеогенезу нативних кісток ембріонів та плодів людини 6-12 тижнів розвитку є адекватною та інформативною тест-системою для вивчення ембріотоксичного впливу шкідливих факторів зовнішнього середовища на зародок, що розвивається.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Авторское свидетельство N 1464062 Способ определения зон оссификации у абортированного эмбриона человека / Соганский О.А., Дзись Е.И., Седнева И.А., Радовский С.В., Яворивская О.М. // Бюл. Гос.ком. по изобрет. и откp. М., 1989. - N 9. - С.189.

2. Седнева И.А. Межиндивидуальные различия степени дифференциации развивающихся костей скелета эмбрионов человека // I съезд медицинских генетиков УССР: Теа. докл. - Львов, 1988. - С. 165.

3. Седнева И.А. Динамика остеогенеза нативных развивающихся костей скелета эмбриона человека 6-12 недель развития

// Труды XX научной конференции молодых ученых биологического факультета МГУ.- М., 1989.- С. 231-236.

4. Соанский О.А., Гаврилюк Ю.И., Седнева И.А., Яворивская О.М., Ковалишин В.И. Генетический мониторинг как средство оценки внутриутробного развития плода // Пленум правления НОАГ УССР: Тез. докл.- Тернополь, 1989.- С. 117-118.

5. Соанський О.О., Павловський М.П., Дибас В.В., Седнева І.А. і ін. Отримання життєздатних остеобластів та остеоцитів ембріонів тварин в експерименті // Медицина і фармація - досягнення і перспективи: Тез. доп. наукової сесії, присвяченої реорганізації медичного факультету у Львівський державний медичний інститут.- Львів., 1990.- С. 133- 134.

6. Гаврилюк Ю.И., Глинка П.А., Ковалишин В.И., Седнева И.А. и др. Клинико-эпидемиологические исследования в региональной системе генетического мониторинга популяций человека // Медицинская генетика. Республиканский межведомственный сборник.- Киев: Здоров'я, 1990.- Вып. 1.- С. 5-7.

7. Гаврилюк Ю.И., Яворивская О.М., Седнева И.А. и др. Исследование динамики мутационного процесса и тератогенных эффектов в популяции г.Черновцы // II Всесоюзный съезд медицинских генетиков: Тез. докл.- Алма-Ата, 1990.- С. 88.

8. Соанський О.О., Гаврилюк Ю.І., Седнева І.А. Генетичний моніторинг популяції в зв'язку з забрудненням навколишнього середовища // III Конгрес світової федерації Українських лікарських товариств: Тез. доп.- Чикаго, 1990, С. 60.

9. Гаврилюк Ю.І., Соанський О.О., Седнева І.А., Яворівська О.М. Чернівецька екологічна хвороба - генетичні аспекти // I Європейський Конгрес Українських лікарських товариств: Матеріали конгресу.- Івано-Франківськ, 1991, С.116-117.

10. Sozansky O., Hnateiko O., Lozynska M., Siednieva I. Mutagenic and Teratogenic Effects in tissue Human Embryo // European Association of Gynecologists and Obstetricians, 6-th Meeting.- Moscow, 1991.- P. 184.

11. Гаврилюк Ю.И., Седнева И.А., Акопян Г.Р., Лоанинская М.Р., Невзгода Н.В. Генетический мониторинг в аспекте "химической болезни" детей // VI съезд Украинского общества генетиков и селекционеров им. Вавилова. Полтава: Тез. докл.- Т.І.- Киев, 1992.- С. 56-57.

12. Гаврилюк Ю.І., Соанський О.О., Акопян Г.Р., Лоанінсь-

ка М.Р., Седнева І.А., Глінка П.А., Яворівська О.М., Грицюк І.І. Генетичний моніторинг в аспекті Чорнобильської катастрофи // Цитологія і генетика.- 1992.- Т. 26.- N 4.- С. 15-19.

13. Акопян Г.Р., Газридж Ю.Й., Гнатейко О.З., Ловинська М.Р., Сатурська А.Б., Седнева І.А., Созанський О.О., Яворівська О.М. Генетичний моніторинг населення в зв'язку з забрудненням навколишнього середовища: Методичні рекомендації.- Львів, 1992.- 14 с.

14. Созанський О.О., Седнева І.А. Нові методичні підходи до вивчення ендохондрального окостеніння ембріонів людини // Лікарський вісник J. of the Ukrainian Medical Association of North America, Inc.- 1993.- Vol. XL.- N 2.- P. 95-98.

15. Havryluk Y., Satura A., Akopyan G., Sedneva I., Davydov L., Gruzynseva N., Hlinka P. Genetic monitoring in Ukrainian regions polluted after Chernobyl accident // 2-nd World Congress of Perinatal Medicine.- Rome, 1993.- P. 211.

16. Седнева І.А. Вивчення тератогенних ефектів в популяції на моделі кісткової системи ембріона людини // Цитологія і генетика.-1993.- Т. 27.- N 4.- С. 30-34.

17. Седнева І.А., Газридж Ю.Й. Дослідження морфогенезу кісткової системи ембріона людини, яка проживає на забрудненій внаслідок аварії на ЧАЕС території // Радиационно-екологіческие и медицинские аспекты последствий аварии на Чернобыльской АЭС: Тез. докл. международной научно-практической конференции.- Киев, 1993.- С. 132.

18. Гулежк Н.Л., Седнева І.А. Вивчення частоти та спектру аберацій хромосом та морфометрія нативних препаратів кісток ембріонів людини чернівецької популяції // Актуальні питання екогенетики та імунології. Полтава: Тез. доп. республіканської наукової конференції.- Київ, 1994.- С. 45-46.

457 рс

AB 30.325
AB 30.325

Безкоштовно

Підписано до друку 23.05.94. Формат паперу 60x84 1/16.
Папір газетний. Друк офсетний. Безкоштовно.
Друкарських листів I. Зам. 621. Тираж 100.

Ротопринт Львівського ЦНТ. Вул. 700-річчя Львова, 57.