

**М.А.Машталір  
І.В.Твердохліб**

Дніпропетровська державна  
медична академія

**Ключові слова:** серце, етанол, ретиноева кислота, нервовий гребінь, вади розвитку.

*Надійшла: 05.10.2006*

*Прийнята: 28.10.2006*

УДК 611.12:611.012-02:547.262]-092.9

## **НОРМАЛЬНИЙ ТА АНОМАЛЬНИЙ КАРДІОГЕНЕЗ: УЧАСТЬ ПОЗАСЕРЦЕ- ВИХ КЛІТИННИХ ПОПУЛЯЦІЙ**

**Резюме.** Метою дослідження було виявлення морфологічних ознак участі нервового гребеня (НГ) у процесах аномального кардіогенезу під впливом ретиноевої кислоти (РК) та етанолу. Курячі зародки були оброблені 0,2-0,25 мл 50% етанолу на 72 години інкубації, а також 1 мкг повного трансізомеру РК на 15 стадії розвитку. Було проведено макроскопічне дослідження сердець нормальних та оброблених зародків, сердець після тотального забарвлення на сульфатовані глікозаміноглікани, а також гістологічне та лектингістохімічне дослідження серійних зрізів. Феноменом, який свідчить про участь НГ у аномальному розвитку серця, був рівень міграції щільної мезенхіми, що походить з НГ; розповсюдження її було затриманим у оброблених зародків. Внаслідок цього щільна мезенхіма була розташована більш дистально, ніж у нормі, в обох моделях. Непрямим свідченням було зниження апоптотичних процесів у конусі та стовбурі серця, аномальний розвиток їх ендокардіальних подушок, а також подушок атріовентрикулярного каналу. РК та етанол викликали затримку у рості подушок, пригнічення синтезу глікозаміногліканів, зниження проліферації мезенхімних клітин та кардіоцитів. Одним з важливих механізмів розвитку аномалій є зміни у властивостях позаклітинного матриксу.

**Mashtalir M.A., Tverdokhle I.V. The normal and abnormal heart development: participation of extracardiac cell population.**

**Summary.** The purpose of the current study was the elucidation of the neural crest (NC) participation in the abnormal heart development after retinoic acid (RA) and ethanol treatment. The chick embryos were treated by 0,2-0,25 ml 50% ethanol at 72 hours of incubation and also by 1 mkg of all-trans RA at 15 stage. The macroscopic study of the hearts of the normal and treated embryos, hearts after whole staining for sulfated glycosaminoglycans, the histological and lectin histochemical study of serial sections were carried. The phenomenon suggesting for the participation of NC in the abnormal heart development was the level of migration of dense mesenchyme originated from NC, its movement was delayed. As a result the dense mesenchyme was located more distal than in normal in both models. The decrease of apoptotic processes in the conus and trunk of the heart, the abnormal development its endocardial cushions as well as atrioventricular cushions were the indirect confirmations. RA and ethanol caused the diminish of endocardial cushions growth, suppressed the synthesis of glycosaminoglycans, mesenchyme cells and cardiomyocytes proliferation. One of the important mechanisms of abnormal development is the changes of the extracellular matrix properties.

**Key words:** heart, neural crest, retinoic acid, ethanol, abnormal development

### **Вступ**

Вади розвитку серця та серцево-судинної системи є одними з найпоширених уроджених аномалій пренатального онтогенезу людини. Вивчення подій та механізмів, що лежать в основі нормального та аномального розвитку серця зберігає високу інтенсивність у наш час. Експериментальні дослідження (Le Douarin N., 1982), що уперше визначили роль нервового гребеня у формуванні серцево-судинної системи зародка, призвели до формування напрямку в кардіоембріології, пов'язаного з подальшим з'ясуванням ролі цієї структури. Було встановлено, що нервовий гребінь бере участь в розвитку середньої оболонки судин, що походять із зябрових артерій, аортопульмональної перегородки, а також утворює всі структури, що належать до автономної іннервації серця (Kirby M., Waldo K., 1986a, 1995b; Waldo K. et al., 1998; Hutson M., Kirby M., 2003). Важливим моментом порушень після видалення НГ є ранні зміни у функціональній здатності міокарда (Kirby M., Waldo K., 1995), що призводить до розширення серцевих камер. Вважається, що компенсаторні реакції міокарда у вигляді дилатації шлуночків

відіграють етіологічну роль для подальшого розвитку вад серця. Видалення частини НГ викликає порушення структури серця майже у всіх випадках, а специфічні часткові видалення призводять до специфічних дефектів. Два найбільш часто виникаючих дефекти – артеріальний стовбур без перегородки і подвійний випускний тракт правого шлуночка (Yelbuz T., 2002). Порушення в атріовентрикулярному (АВ) каналі і повна транспозиція магістральних судин рідко виникають після видалення НГ у курей.

Одним з важливих механізмів формування серця вважаються апоптотичні перетворення (Fisher S. et al., 2000). Останніми роками з'ясувалося, що апоптози мають ключову роль у розвитку конусу та стовбуру серця (Watanabe M. et al., 1998), АВ каналу (Keyes W., Sanders E., 2002), клапанів серця (Fisher S. et al., 2000). В огляді Poelmann R. та Gittenberger-de Groot A. (2005) узагальнені результати численних експериментів, які показали, що при розвитку аномалій серця модель апоптозів порушується. При аномальному перебігу апоптотичних процесів розвиток перегородок серця, зябрових дуг, коронарних артерій

порушується; також розвиваються аномалії, що нагадують синдром Ді-Джорджі. Велике значення апоптозів встановлено на кінцевих етапах септації серця (Sharma P. et al., 2004). Формування провідної системи серця також пов'язано з клітинами НГ та апоптозами, що вони стимулюють у прилеглому міокарді (Poelmann R. et al., 2004). Міграція клітин НГ відбувається не лише у стовбур серця, а й в зоні міжшлуночкового отвору та клапанів серця (Poelmann R., Gittenberger-de Groot A., 1999). У зазначеній роботі висловлюється думка про те, що всі апоптотичні процеси у серці відбуваються при наявності клітин, що походять з НГ.

Хімічні тератогени викликають спектр аномалій, що має схожість із моделями з мікрomanipуляційним видаленням НГ. Це спостерігали у моделі з порушенням кардіогенезу з використанням етилового алкоголю у мишей (Daft P. et al., 2004). Ембріопатії, викликані похідним вітаміну А – ретиноевою кислотою (РК), у людини, мають спектр аномалій, також схожих із синдромом Ді-Джорджі (Sinning A., 1998). Автор висуває гіпотезу про зв'язок генетичних порушень при синдромі Ді-Джорджі і регуляцією РК диференціювання НГ. За даними (Daft P. et al., 2004), спектр аномалій в цій моделі нагадував ті, що спостерігались при алкогольному синдромі та при синдромі Ді-Джорджі. У цій роботі вказано на можливу роль ураження клітин НГ після впливу етанолу. Істотний зв'язок вад після впливу етанолу, що об'єднують у фетальний алкогольний синдром, виявлявся у відношенні до строків та ступеня ураження клітин НГ (Hutson M., Kirby M., 2003).

В дослідженнях впливу повного трансізомеру РК на розвиток серця курячих зародків автори роблять припущення, що РК впливає безпосередньо на кардіоміоцити та ендокардіальні подушки (Bowman H. et al., 1995a, 1998b). Як в попередній серії експериментальних робіт, так і в дослідженнях з використанням 13-цис ізомеру РК (Hart R. et al., 1990), максимальний тератогенний ефект на розвиток серця спостерігається при дії після завершення міграції НГ у зяброві дуги. Згідно з припущенням авторів, він пов'язаний з пригніченням диференціювання клітин краніальної частини НГ.

У існуючих роботах з використанням експериментальних моделей аномального кардіогенезу на тваринах не були виділені морфологічні ознаки участі НГ.

**Метою** нашого дослідження було встановлення морфологічних феноменів, що пов'язані з участю нервового гребеня, в експериментальних моделях порушення кардіогенезу під впливом етанолу та РК у курячих зародків.

#### **Матеріали і методи**

Матеріалом для даного дослідження були серця курей породи білий леггорн. Досліджено 157 ембріонів курки породи білий леггорн від 3 до 6 доби інкубаційного розвитку (з них 32 – у нормі, 62 – після дії етанолу, 63 – після дії РК). Для з'ясування порушень у формуванні серця курячих

зародків використовували моделі, які поєднують вплив на клітини НГ до початку їх міграції у серце та викликає спектр вад серця, близький до того, що спостерігається після видалення НГ. Для цього (Fang T.T. et al., 1987) вводили у повітряну камеру курячих яєць, також зародки були оброблені повним трансізомером РК у кількості 1 мкг у 1 мл 2%-ного диметилсульфоксиду на стадії 15 за НН (Hamburger, Hamilton) (Bowman H. et al., 1995).

Яйця курей інкубували при 38°C та за відносної вологості 80%. Дослідження зовнішньої форми серця щойно вилучених зародків, після фіксації рідиною Буену та після тотального забарвлення на сульфатовані глікозаміноглікани (ГАГ) (Pei-Rong W. et al., 1998), проводили при світлі, що падає, та при світлі, що проникає.

Виготовлення серійних гістологічних зрізів, світлова мікроскопія (фарбування гематоксиліном-еозином, залізним гематоксиліном за Гейденгайном), виготовлення гістотопографічних зрізів використовувалась для всіх зародків. Визначення кислих глікозаміногліканів (ГАГ) як вуглеводних компонентів протеогліканів проводили з використанням альціанового блакитного 8GX за Сідменом. Для вивчення вуглеводної специфічності клітинних мембран в серці зародків вивчали розподілення рецепторів до лектинів зав'язей пшениці (WGA), насіння сочевиці (LCA), кори бобівника (LAL), гороху (PSA), картоплі (STA), ікри окуня (PFA), сої (SBA), арахісу (PNA), рицини звичайної (RCAI), кори бузини чорної (SNA). Підготовку зрізів та етапи реакції проводили за рекомендаціями Луцика О.Д. та співавторів (1989).

#### **Результати та їх обговорення**

На 3 добу інкубації в інтактних зародках у передній АВ подушці поблизу міокарда АВ каналу визначалися окремі мезенхімні клітини, які за багатьма ознаками не були пов'язані з процесом епітеліо-мезенхімної трансформації (ЕМТ) з тієї обставини, що вони мали іншу форму (рис.1). Можливо, вони не так активно пересувалися, як клітини після ЕМТ. Це дозволяє зробити припущення, що дані клітини мають позасерцеве походження та мігрують через дорсальний мезокард. Найбільш вірогідний шлях їх міграції до передньої АВ подушки – пересування по міокарда АВ каналу. Можливо також, що виявлені нами клітинні скупчення верхньої частини задньої АВ подушки значною мірою складаються з клітин, що мігрували через дорсальний мезокард, бо в інших відділах задньої АВ подушки кількість мезенхімних клітин була набагато меншою та вони мали іншу локалізацію – субендокардіальну. Саме звідси можуть починати свій шлях мезенхімою АВ каналу клітини, які ніби повзуть по міокарда всередині подушки. У зародків, що зазнали впливу РК, ці клітини не виявлялися у більшості випадків. Цей факт підтверджує нашу думку про їх позасерцеве походження. Механізм впливу тератогенів у цьому випадку співпадає з тим, що відбувається після видалення НГ.

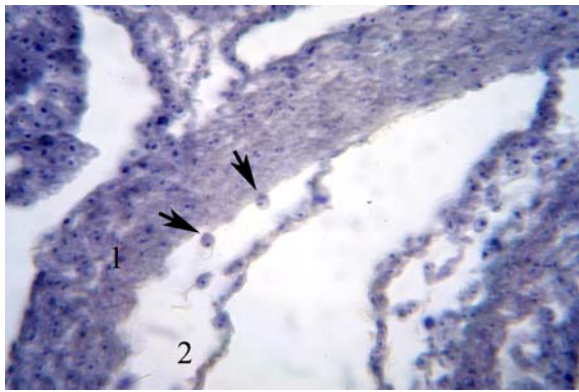


Рис.1. Ділянка передньої АВ подушки серця курячого зародка на 22 стадії за НН (3 доба інкубації) у нормі. Забарвлення гематоксилином Гейденгайна.  $\times 400$ . Головками стрілок позначені клітини, що мігрують по міокарда АВ каналу: 1 – міокард; 2 – матрикс подушки.

Після впливу РК та етанолу також виявлялася затримка у загальному розвитку зародків на усіх досліджених стадіях. У більшості зародків протягом 3-6 діб ми спостерігали розширення передсердь та шлуночків, більшу, ніж у нормі, видовженість відділів АВ каналу і конусно-стовбурового відділу (рис.2).

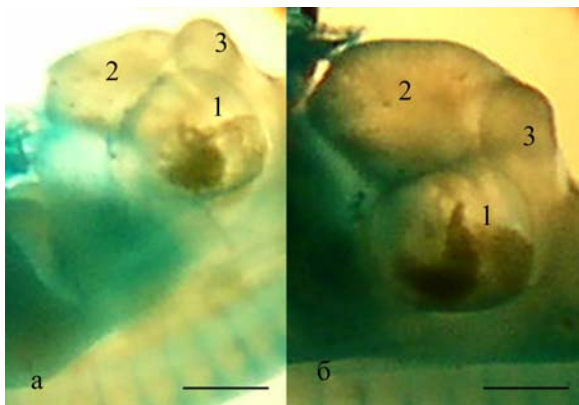


Рис.2. Зовнішня будова серця курячого зародка на 5 добу інкубації у нормі (а), після впливу РК (б). Вид з лівого боку. Тотальне забарвлення зародка на сульфатовані ГАГ. Довжина масштабної смужки - 700 мкм: 1 – ліве передсердя; 2 – шлуночковий відділ; 3 – стовбур.

Ми вважаємо, що свідченням безпосереднього впливу тератогенів на клітини серця було затримання розвитку перегородок – міжшлуночкової та міжпередсердної – та стоншення стінок камер внаслідок пригнічення клітинної проліферації. Розширення передсердь та шлуночків, можливо, було обумовлено ті ж самими механізмами, що призводять до дилатації серця у моделях з відділенням НГ (Kirby M., Waldo K., 1995). Також ми спостерігали зменшення об'єму позаклітинного матриксу в ендокардільних подушках АВ каналу, а також впускної частині серця на усіх досліджених стадіях. Це в більшому ступені відносилось до зародків, що зазнали впливу

РК. Поряд з цим після дії як етанолу, так і РК, затримувалась швидкість формування мезенхімної популяції ендокардільних подушок. Накопичення кислих ГАГ було затриманим в обох експериментальних групах.

Протягом 4-6 доби розвитку ми спостерігали числені апоптотичні клітини у міокарді основи конуса та дистального кінця стовбуру серця, ендокардільних подушках конуса та стовбура. Максимальна виразність процесів загибелі клітин спостерігалась на 5 добу інкубації. Кількість апоптотичних клітин після злиття АВ подушок за умов нормального кардіогенезу була суттєво більшою, ніж це необхідно для редукції ендокарду, який потрапив усередину АВ перегородки. Апоптотичні клітини були добре помітні при забарвленні гематоксилином-еозином та при реакції з лектинами зав'язей пшениці, ікри окуня, картоплі (рис.3).

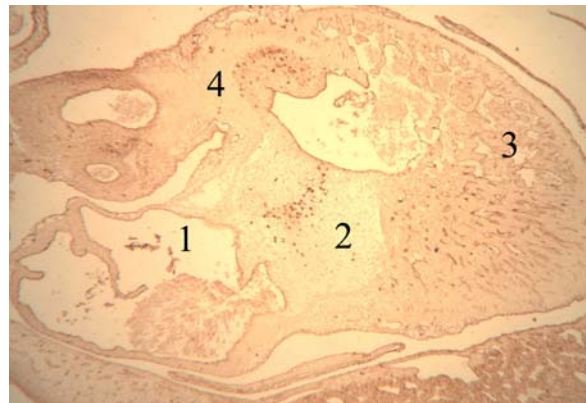


Рис.3. Сагітальний зріз курячого зародка на 28 стадії за НН у нормі. Реакція з лектином зав'язей пшениці (WGA).  $\times 40$ : 1 – праве пересердя; 2 – АВ перегородка; 3 – правий шлуночок; 4 – конус.

Після впливу тератогенів кількість апоптотичних клітин у міокарді та ендокардільних подушок конусно-стовбурового відділу та у АВ перегородці значно знижувалась. Заслугує на увагу концепція, що всі апоптотичні процеси у серці контролюються клітинами НГ (Poelmann R., Gittenberger-de Groot A., 1999). Отже, зниження кількості апоптотичних клітин після впливу тератогенів, можливо, обумовлено первинним впливом на клітини НГ. Істотне зменшення інтенсивності апоптотичних процесів саме у конусі та стовбурі серця безумовно має значення у формоутворенні вад серця після використаних тератогенів, але в нашому дослідженні постійно зустрічались ділянки (наприклад, між аортальним присінням та зоною міжпередсердної перегородки), де виразність апоптозів, навпроти, посилювалася або мала нетипове положення. Це дозволяє припустити, що вплив тератогенів на ініціацію апоптотичної активності не є однозначним.

Формування перегородки стовбуру починалося з міграції щільної мезенхіми, що мала походження з НГ та розповсюджувалася у вигляді

тяжів, що прямували від аортального мішка у гребені стовбуру (рис.4). Завдяки подальшому розповсюдженню щільної мезенхіми утворювалася перегородка між аортою та легеневим стовбуром у стовбуровому відділі ембріонального серця.

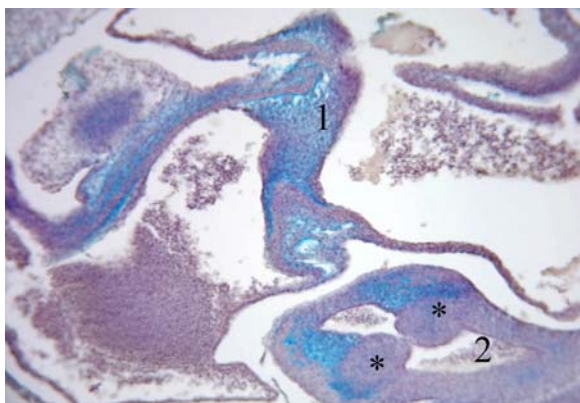


Рис.4. Передсердний відділ та стовбур серця курячого зародка на 24 стадії за НН (4 доба інкубації) у нормі. Забарвлення за Сідменом.  $\times 100$ . Зірками позначена щільна мезенхіма, що походить з нервового гребеня: 1 – міжпередсердна; 2 – стовбур.

Протягом 5-6 доби ми спостерігали затримку розповсюдження щільної мезенхіми, що походить з НГ, від області зябрових артерій і аортального мішка в мезенхіму стовбура. У подальшому це призводить до формування дефекту міжшлуночкової перегородки. Перегородки конусу та стовбуру відставали у рості від нормі при порівнянні стадії розвитку нормального зародка та зародка після впливу тератогенів. Ми вважаємо, що обидва тератогени впливали на популяцію клітин НГ, що мігрують до серця, протягом дослідженого періоду.

Період з 4 по 6 добу характеризувався максимально виразними аномаліями форми ме-

зенхімних структур серця. Це свідчить про порушення процесів клітинної міграції і заміщення мезенхімної тканини, що можливо, зв'язано зі зміною в синтезі та розподілі ГАГ й інших компонентів позаклітинного матриксу. Часто аномалії мезенхімних структур поєднувалися з нетиповим розподілом кислих ГАГ, що є додатковим свідченням на користь значної ролі матриксу у формуванні вад серця. Можливо припустити, що ці дистантні сигнали контролюють розвиток мезенхімного компоненту ембріонального серця не лише у випускному тракті, куди мігрують клітини НГ, але й в інших відділах – АВ подушках і міжпередсердній перегородці. Наші дані свідчать не тільки про безпосередній вплив тератогенів на клітинну проліферацію, але і вказують на більш складний механізм, опосередкований популяцією клітин, що мігрували в серце, - похідних НГ.

#### Підсумок

Морфогенетичні зміни, встановлені в експериментальних моделях аномального кардіогенезу на курячих зародках з використанням РК та етанолу, а саме - затримка міграції клітин НГ у стовбур серця, зменшення інтенсивності апоптозів, що призводить до затримки редукції міокарда конусу та стовбуру, а також значні порушення у формуванні мезенхімних структур серця та міокарда - свідчать про первинне ураження клітин НГ у генезі аномалій. Одним з важливих механізмів у формуванні вад є порушення метаболізму позаклітинного матриксу, що обумовлює затримку міграції, проліферації й інтеграції клітин серця і НГ.

#### Перспективи подальших розробок

Подальші дослідження мають виявити молекулярні закономірності взаємодії клітин НГ та ембріонального серця, а також інші морфогенетичні механізми аномального розвитку серця при дії хімічних тератогенів.

#### Літературні джерела

Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектины в гистохимии. - Львів: Вища школа, 1989.- 144 с.  
 Avian model for 13-cis-retinoic acid embryopathy: demonstration of neural crest related defects / R.C.Hart, P.A.McCue, W.L.Ragland et al. // *Teratology*.- 1990.- Vol.41, №4.- P.463-472.  
 Cardiac neural crest provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure / K. Waldo, S.Miyagawa-Tomita, D.Kumiski, M.Kirby // *Dev.Biol.*- 1998.- Vol.196.- P. 129-144.  
 Daft P.A., Johnston M.C., Sulik K.K. Abnormal heart and great vessels development following acute ethanol exposure in mice // *Teratology*.- 1986.- Vol.33, №1.- P.93-104.  
 Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death / M. Watanabe, A.Choudhry, M.Berlan et al. // *Development*.- 1998.- Vol.125.- P.3809-3820.

Diminished growth of atrioventricular cushion tissue in stage 24 retinoic acid-treated chicken embryos / H.G.Bouman, M.L.Broekhuizen, A.M.Baasten et al. // *Dev. Dyn* .- 1998.- Vol.213, №9.- P. 50-58.  
 Ethyl alcohol-induced cardiovascular malformations in the chick embryo / T.T.Fang, H.J.Bruijere, S.A.Kargas et al. // *Teratology*.- 1987.- Vol.35, №1.- P. 95-103.  
 Fisher S.A., Langille B.L., Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development // *Circ. Res.*- 2000.- Vol.87.- P. 856.  
 Hutson M.R., Kirby M.L. Neural crest and cardiovascular development: a 20-year perspective // *Birth Defects Res. C. Embryo Today*.- 2003.- Vol.69, №1.- P.2-13.  
 Keyes W.M., Sanders E.J. Regulation of apoptosis in the endocardial cushions of the developing chick heart // *Am J. Physiol. Cell Physiol*.- 2002.- Vol.282.- P.1348-1360.

Kirby M.L., Waldo K.L. Neural crest and cardiovascular patterning // *Circ. Res.*- 1995.- Vol.77, №7.- P.211- 215.

Kirby M.L., Waldo K.L. Role of neural crest in congenital heart disease // *Circulation.*- 1986.- Vol.82, №10.- P.322-340.

Le Douarin N. *The Neural Crest.*- Cambridge, England: Cambridge University Press; 1982.- P.54-55.

Poelmann R.E., Gittenberger-de Groot A.C. Apoptosis as an instrument in cardiovascular development // *Birth. Defects Res. C. Embryo Today.*- 2005.- Vol.75, №4.- P.305-313.

Poelmann R.E., Gittenberger-de Groot A.C. A Subpopulation of apoptosis-prone cardiac neural crest cells targets to the venous pole: multiple functions in heart development? // *Dev. Biol.*- 1999.- Vol.207.- P.271-286.

Shortened outflow tract leads to altered cardiac looping after neural crest ablation / T.M. Yelbuz, K.L.Waldo, D.H.Kumiski et al. // *Circulation.*- 2002.-

Vol.106, №4. P.504-510.

Sinning A. Role of vitamin A in the formation of congenital heart defects // *Anat. Rec.*- 1998.- Vol.253, №5.- P.147-153.

Spatiotemporal analysis of programmed cell death during mouse cardiac septation / P.R. Sharma , R.H.Anderson, A.J.Copp, D.J.Henderson // *Anat. Rec.*- 2004.- Vol.277, №2.- P.355-369.

Spectrum of looping disturbances in stage 34 chicken hearts after retinoic acid treatment / H.G.Bouman, M.L.Broekhuizen, A.M.Baasten et al. // *Anat. Rec.*- 1995.- Vol.243, №9.- P.101-108.

The neural crest is contiguous with the cardiac conduction system in the mouse embryo: a role in induction? / R.E.Poelmann, M.R. Jongbloed, D.G. Molin et al. // *Anat. Embryol.*- 2004.- Vol.- 208, №5.- P.389-393.

Visualization of sulfated glycoconjugates in the chicken embryonic heart by whole mount alcian blue staining / W.Pei-Rong, K.Isocawa, J.Yi et al. // *J.Oral Sci.*- 1998.- Vol.40, №4.- P.153-157.

#### **Машталир М.А., Твердохлеб И.В. Нормальный и аномальный кардиогенез: участие внесердечных клеточных популяций.**

**Резюме.** Целью исследования было выявление морфологических признаков участия нервного гребня (НГ) в процессах аномального кардиогенеза под влиянием ретиноевой кислоты (РК) и этанола. Куриные зародыши были обработаны 0,2-0,25 мл 50% этанола на 72-м часу инкубации, а также 1 мкг полного трансизомера РК на 15 стадии развития. Было проведено макроскопическое исследование сердец нормальных и обработанных зародышей, сердец после тотальной окраски на сульфатированные гликозаминогликаны, а также гистологическое и лектиногистохимическое исследования серийных срезов. Феноменом, который свидетельствует об участии НГ в аномальном развитии сердца, был уровень миграции плотной мезенхимы, которая происходит из НГ; распространение ее было нарушено у обработанных зародышей. Вследствие этого плотная мезенхима была расположена более дистально, чем в норме, в обеих моделях. Косвенным свидетельством было снижение апоптотических процессов в конусе и стволе сердца, аномальном развитии их эндокардиальных подушек, а также подушек атриовентрикулярного канала. РК и этанол вызывали задержку в росте подушек, угнетение синтеза гликозаминогликанов, снижение пролиферации мезенхимных клеток и кардиомиоцитов. Одним из важных механизмов развития аномалий являются изменения в свойствах внеклеточного матрикса.

**Ключевые слова:** сердце, этанол, ретиноевая кислота, нервный гребень, порок развития.