

Ю.В.Сілкина

Дніпропетровська державна
медична академія

УДК 611.013:611.12:591.412]:575.87

ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ МІОКАРДА ЯК РЕЗУЛЬТАТ РЕАЛІЗАЦІЇ ПОШУКОВИХ РЕАКЦІЙ КЛІТИН-МІГРАНТІВ

Ключові слова: міокард, міграція, кардіогенез, ембріон людини, епікард

Надійшла: 03.10.2006

Прийнята: 26.10.2006

Резюме. У дослідженні проведено аналіз процесів міграції клітин-дериватів епікарду (КДЕ), а також визначення їхньої ролі у формуванні сполучнотканинного та судинного компонентів міокарда. Об'єкт - серця ембріонів та плодів людини у період з 5 до 12 тижні пренатального розвитку. Були використані імуногістохімічні маркери ендотелію (CD34) та віментину, відповідні первинні антитіла (ДАКО) та система візуалізації LSAB. Було встановлено, що на 5-му тижні в компактному шарі міокарда шлуночків спостерігалася невелика кількість віментин-позитивних клітин з кластерним характером розташування у глибоких зонах міокарда та поодиноким - у субепікардальних ділянках компактного міокарда. CD34-позитивні клітини у цей період характеризувалися високим ступенем проліферативної активності. На 8-му тижні спостерігалися численні тяжі CD34-позитивних КДЕ у трабекулярному міокарді, але функціонуючих судин ще не спостерігалося. У плодовому періоді віментин-позитивні КДЕ виявляли ознаки формування сполучнотканинного диферону у складі стінки судин та ендомізію. Таким чином, міграція КДЕ має спрямований характер у бік заселення глибоких ділянок компактного, а у подальшому і трабекулярного, міокарда. Завершення міграції КДЕ індукує зростання проліферативної активності клітин, після чого спостерігаються процеси диференціювання віментин-позитивних клітин у бік сполучнотканинного диферону, а CD34-позитивних - у бік формування ендотелію судин міокарда.

Silkina U.V. The formation of structural components of myocardium as a result of searching reaction of migrating cells.

Summary. The analysis of the migration of cells which are derivatives of the epicardium (CDE) and determination their role in the formation of connective tissue and vascular components of the myocardium was carried in our research. The objects were the hearts of human embryos and fetuses from 5 to 12 weeks of prenatal development. The immunohistochemical markers of endothelium (CD34), vimentin and corresponding primary antibodies (DAKO) and system of visualization LSAB were used. It was determined that vimentin-positive cells in compact layer of the myocardium of ventricle were present in small quantity and characterized by cluster distribution in deep zone of myocardium on 5th week. The single vimentin-positive cells were present in the subepicardial zone of the ventricle myocardium on 5th week. CD34-positive cells showed the high proliferate index in this period. Number of prongs of CD34-positive CDE were determined in trabecular myocardium on 8th week, however, working vessels weren't observed. The vimentin-positive CDE differentiated in cells of connective tissue of the vessels wall and endomysium in fetal period. Thus, the migration of CDE induces the proliferate activity. Then the differentiation vimentin-positive into connective tissue differon take place and CD34-positive cells develop the vessels endothelium of myocardium.

Key words: myocardium, migration, cardiogenesis, human embryo, epicardium.

Вступ

Ембріональним клітинам притаманні так звані пошукові реакції, до яких відносяться пошукова міграція, апоптоз, дисемінація клітин та інші (Васильєв Ж.М., Гельфанд І.М., 2006). Завдяки пошуковому характеру клітинних реакцій морфофункціональна основа закладки будь-якого органу може бути модифікована, іншими словами - набувати ознак більш високого ступеня диференціювання. Реалізація пошукових реакцій, таким чином, забезпечує можливість еволюціонування систем та набуття органами нових функціональних можливостей. Пошукові міграційні процеси проходять за декількома механізмами. Частіше це відбувається шляхом формування на поверхні мігруючих клітин молекул адгезії (селектинів), контакту їх з протеїнами міжклітинного матриксу і поступового пересування з формуванням псевдоподій на передньому краї (Bershadsky A. et. al.,

1997). Інший механізм пошукової міграції - дисемінація нефіксованих клітин. Обидва процеси тривають з накопиченням активного кисню у зонах міграції та секрецією ряду цитокінів (Каленикова Е.І. та співавт., 2004).

Кінцева стадія пошукової реакції - організація багатоклітинних та функціонально інтегрованих одиниць. Важливу роль при цьому відіграє апоптоз як один із компонентів механізму формування кінцевої структури. Ця стадія характеризується накопиченням антиоксидантів та синтезом спеціалізованих протеїнів, що виступають в ролі сигнальних молекул у процесах диференціювання клітин-мігрантів (Лакомкін В.Л. та співавт., 2005). Тобто, процеси, що відбуваються на стадії пошуку та у період формування структури, значно відрізняються між собою.

Формування міокарда як складної системи взаємодії гетерогенних клітинних кластерів відбу-

вається за участю регуляторних факторів, які контролюють процеси транскрипції при розвитку серця. GATA-фактори є одними з ключових у контролюванні структурних перебудов міокарда (Chargon F., Nemer M., 1999). Наприклад, GATA-4 є регулятором процесів проліферації та диференціювання кардіоміоцитів (Jiang Y. et al., 1998). Наряду з цим, вказаний транскриптивний фактор приймає участь у забезпеченні міграції кардіогенних клітин, а також у взаємодії мезодермальних та ентодермальних похідних на ранніх етапах кардіогенезу. Є припущення, що фактори сімейства GATA регулюють міграційні процеси клітин різного походження, що входять до складу міокардіального шару серця, у тому числі ендотеліальних та клітин-дериватів епікарду.

Формування вторинної системи кровопостачання міокарда, а також сполучнотканинного компоненту останнього є результатом реалізації міграційних та адгезивних властивостей ендотеліоцитів та клітин-похідних епікарду, детермінованих у напрямку епітеліального та сполучнотканинного диференціювання (Mikawa T., Gourdie R.G., 1996), але механізми цього процесу залишаються до кінця не вивченими.

Сполучнотканинна дисплазія є одним з морфологічних проявів малих вад серця, що складають вагомую долю у переліку вроджених вад серцево-судинної системи. Це може бути результатом невідповідності контролюючої дії з боку кардіогенних регуляторних факторів, або невірноваженості процесів міграції-адгезії клітин-резидентів міокарда у морфо-функціональному та терміновому аспектах. Тому глибоке вивчення означених реакцій у нормі допоможе у подальшому з'ясувати формування вроджених вад серця.

Метою нашого дослідження було вивчення процесів міграції клітин-дериватів епікарду (КДЕ), а також визначення їхньої ролі у формуванні сполучнотканинного та судинного компонентів міокарда.

Матеріали та методи

Були досліджені серця ембріонів людини на ранніх етапах онтогенезу – з 5-го по 12-й тижні пренатального періоду розвитку. Ембріональний і плодовий матеріал одержували в гінекологічних відділеннях м. Дніпропетровська після медичних абортів. Визначення віку ембріонів і плодів проводили за вимірами тім'яно-куприкового і тім'яно-п'яткового розмірів відповідно до рекомендацій Л.І.Фаліна (1976).

Процеси міграції КДЕ вивчали за допомогою використання антитіл до віментину (Balsoni G. et al., 2000). Процеси неоваскулогенезу досліджували з використанням маркера CD34, специфічного для судинного ендотелію (Garlanda C. et al., 1997). Імуногістохімічні реакції проводили на парафінових тканинних зрізах при використанні відповідних первинних антитіл (DAKO) та системи візуалізації LSAB.

Результати та їх обговорення

На 5-му тижні ембріонального розвитку людини в компактному шарі міокарда правого та лівого шлуночків спостерігалася невелика кількість віментин-позитивних клітин, що є клітинами-мігрантами епікардіального походження. У глибоких зонах компактного міокарда, а також у ділянках, що межують з трабекулярним шаром, спостерігалася кластерне розташування клітин з позитивною імуногістохімічною міткою. Клітини-деривати утворювали поздовжні структури, розміщені між групами кардіоміоцитів. Деякі описані групи містили клітини, що знаходилися на різних стадіях мітотичного поділу. При дослідженні кластерів КДЕ було встановлено, що вони мали морфологічні характеристики, притаманні мезенхімним клітинам: наявність відростків, слабобазофільну цитоплазму, овальної форми ядро, розміщене у центрі тіла клітини.

У субепікардіальних зонах міокарда шлуночків клітини епікардіального генезу мали поодинокі розташування, в той час як трабекулярний міокард у цей період розвитку взагалі залишався вільним від КДЕ (рис. 1а, 1б).

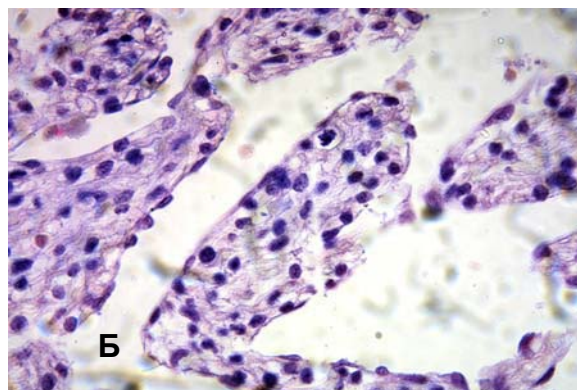
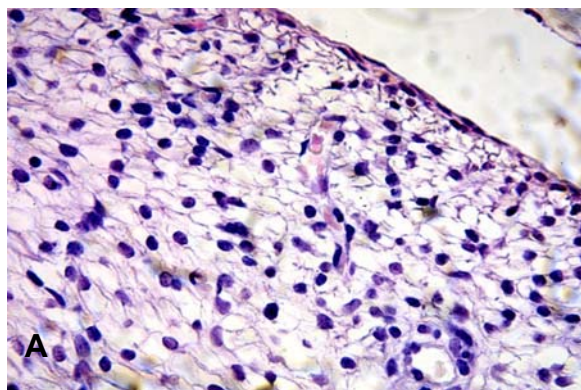


Рис.1. А – компактний міокард лівого шлуночка серця людини на 5 тижні гестації. Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$. Б – трабекулярний шар міокарда лівого шлуночка серця людини на 5 тижні гестації. Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$.

Експресію CD34 на ендотеліоподібних КДЕ протягом 5 тижня ембріонального періоду розвитку людини ми спостерігали лише в ділянках компактного міокарда шлуночків, що межували з епікардіальною оболонкою. Маркер-позитивні ділянки були утворені невеликими групами відростчастих клітин без певної просторової орієнтації, що були розташовані у міжміоцитарних просторах. При порівнянні кількості CD34-позитивних клітин, локалізованих у компактному міокарді правого та лівого шлуночків, істотних відмінностей виявлено не було (рис.2). На цьому етапі кардіогенезу не було встановлено ознак перебігу процесів диференціювання віментин-позитивних клітин у бік формування сполучнотканинного диферону.

На наш погляд, така схема розподілення віментин-позитивних та CD34-позитивних клітин-резидентів міокарда пояснюється загальними принципами міграційних процесів. Просування вглиб міокарда по міжміоцитарних просторах через компактний міокард клітини здійснюють поодинокі, після чого, досягнувши свого кінцевого розташування, проліферують, утворюючи клітинний кластер. Активізація проліферативних процесів КДЕ відбувається саме після втрати клітиною здатності реалізації міграційних механізмів внаслідок, наприклад, зміни рецепторного апарату клітини у бік формування міжклітинних контактів.

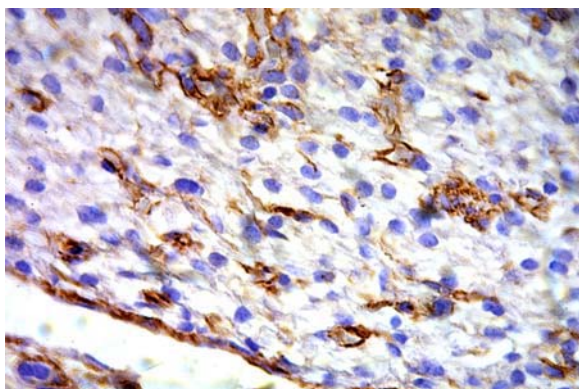


Рис.2. Субепікардіальна зона міокарда серця людини на 5 тиждень гестації. Забарвлення маркером ендотелію CD34. ×400.

Специфічне топологічне розподілення клітин-мігрантів і, насамперед, CD34-позитивних клітин, що приймають участь у формуванні судинної системи, формується, на нашу думку, завдяки експресії сигнальних молекул міграції як відповідь на накопичення активного кисню у глибоких зонах міокарда в результаті високої швидкості перебігу гістогенетичних процесів кардіоміоцитів (рис.3).

6 тиждень ембріонального періоду розвитку людини характеризувався прогресивним збільшенням кількості віментин-позитивних КДЕ у компактному міокарді правого та лівого шлуночків серця. Найбільш активно в цей період міграційні та проліферативні процеси відбувалися у

стулці мітрального клапану - зоні активного заселення віментин-позитивних КДЕ (рис.4). Морфологічно ці клітини характеризувалися витягнутою формою ядра і щільним розташуванням у групах.

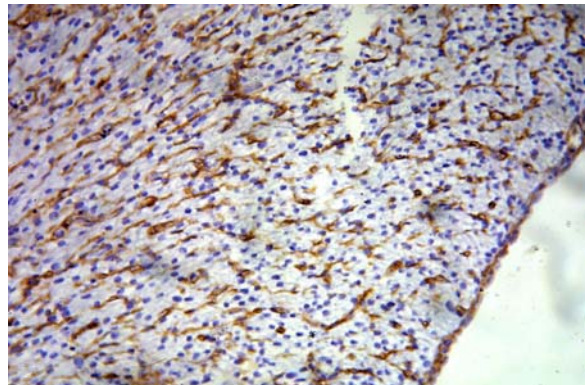


Рис.3. Субепікардіальна та глибока зони компактного міокарда серця людини на 5 тиждень гестації. Забарвлення маркером ендотелію CD34. ×400.

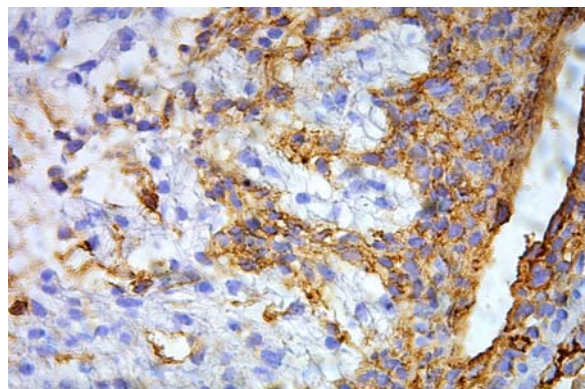


Рис.4. Серце людини на 6 тижні гестації. Зона мітрального клапану, що формується. Забарвлення маркером віментину. ×400.

Кількість КДЕ активно зростала у всіх ділянках компактного шару, а також у трабекулярному міокарді. Але в даний період кардіогенезу експресія CD34 в інтратрабекулярному міокарді виявлялася лише в окремих ділянках.

На 8-му тижні ембріогенезу людини спостерігалися численні тяжі CD34-позитивних КДЕ, що локалізувалися в міжкардіоміоцитарних просторах в напрямку від основи трабекул до їхньої верхівки. Функціонально активних протокапілярів з форменими елементами крові у внутрішньотрабекулярному міокарді не виявлялося (рис.5). І навпаки, наприкінці ембріонального періоду у компактному міокарді обох шлуночків серця спостерігалося розвинуте протокапілярне русло.

Початок плодового періоду характеризувався помірним зростанням кількості клітин-резидентів у компактному міокарді правого та лівого шлуночків і МШП. Експресія віментину в право- і лівошлуночкової частинах МШП відповідала показникам компактного міокарда вільних стінок пра-

вого і лівого шлуночків.

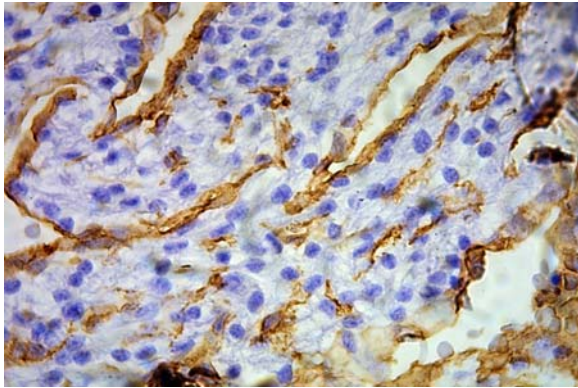


Рис.5. Трабекулярний міокард серця людини на 8 тиждень гестації. Забарвлення маркером ендотелію CD34. $\times 400$.

У цей період розвитку спостерігалось не лише збільшення популяції CD34- та віментин-позитивних КДЕ, а й активізація процесів їхнього диференціювання. Так, віментин-позитивні клітини-деривати епікарду виявляли ознаки формування фіброblastних клітин у стінці примітивних судин, а також між сформованими волокнами кардіоміоцитів, утворюючи тонкі прошарки ендомізії. Крім того, деякі клітини епікардіального генезу групувалися навколо просвіту широких судин у субепікардіальних ділянках та набували морфологічних ознак приналежності до гладких міоцитів. Навколо сформованих коронарних артерій, фіброblastні клітини утворювали значні циркулярні прошарки сполучної тканини.

У серці 10-тижневих плодів людини у трабекулярному шарі міокарда людини поряд з неканалізованими тяжами CD34-позитивних КДЕ визначалися вже сформовані судини (рис.6).

Протягом наступних двох тижнів пренатального розвитку людини відбувалося зниження темпів зростання CD34-позитивних клітин у компактному міокарді шлуночків; навпроти, в інтра-трабекулярному міокарді активно відбувалися проліферативні процеси.

Висновки

Міграційні процеси клітин-дериватів епікарду мають спрямований характер у бік заселення глибоких ділянок компактного, а у подальшому і трабекулярного, міокарда. Топологічне та кількісне розподілення клітин-мігрантів має специфічні

рис, характеризуючись кластерним розподіленням у глибоких ділянках та поодиноким розташуванням у зовнішніх ділянках міокарда.

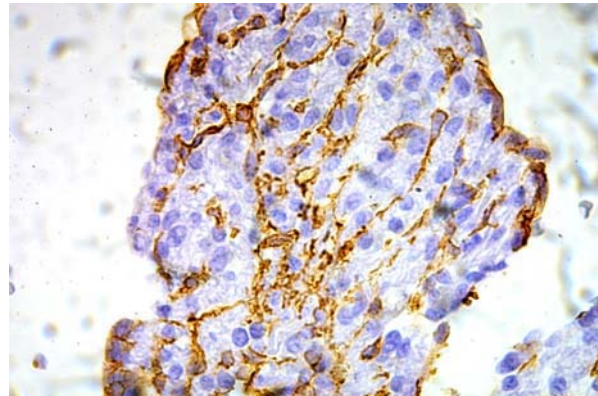


Рис.6. CD34-позитивні клітини у трабекулах правого шлуночку серця людини на 10 тиждень гестації. $\times 400$.

Реалізація клітинних механізмів програми життєдіяльності клітин-дериватів епікарду відбувається за чіткою схемою: завершення міграційних процесів індукує зростання проліферативної активності клітин, спад якої характеризується набуттям віментин-позитивними клітинами ознак початку процесів диференціювання у бік клітин сполучнотканинної детермінації, а CD34-позитивних - у бік формування ендотеліального вистелення судин коронарного русла.

Диференціювання клітин-дериватів епікарду у клітини сполучнотканинної (фіброblastи і гладкі міоцити стінки судин) та епітеліального диферонів починається з 8-го тижня ембріогенезу людини. Найбільш активно процеси міграції та проліферації віментин-позитивних КДЕ відбуваються у цей час у стулці мітрального клапану, а експресуючих CD34 – у компактному міокарді обох шлуночків.

Перспективи подальших розробок

Подальші дослідження спрямовані на вивчення рецепторного апарату клітин-похідних епікарду на етапах реалізації пошукових реакцій, а також визначення та порівняльний аналіз хімічних характеристик різних зон міокарда на предмет встановлення індуктивної ролі оксидантних та антиоксидантних систем міокарда у забезпеченні механізмів міграції, адгезії, проліферації та диференціювання.

Літературні джерела

Васильев Ж.М., Гельфанд И.М. Поисковые миграции в нормальном развитии // Биохимия.- 2006.- Т.71, №8.- С.1014-1019.

Изменение антиоксидантного статуса миокарда под влиянием коэнзима Q10 при окислительном стрессе / Лакомкин В.Л., Коновалова Г.Г., Каленикова Е.И. и др. // Биохимия.- 2005.- Т.70, №1.- С.96-105.

Роль свободных радикалов кислорода в повышенной чувствительности гипертрофированного миокарда крысы к ишемии / Каленикова Е.И., Городецкая Е.А., Мурашев А.Н. и др. // Биохимия.- 2004.- Т.69, №3.- С.386-392.

Фалин Л.И. Эмбриология человека.- М.: Медицина, 1976.- С.35-37.

Balsoni G., Spanguolo R., Dejana E. Develop-

ment of endothelial cell lines from embryonic stem cells // *Vasc. Biol.*- 2000.- Vol.27.- P.1443-1451.

Characterization of MEC 14.7, new monoclonal antibody recognizing mouse CD34: a useful reagent for identifying and characterizing blood vessels and hematopoietic precursors / Garlanda C., Berthier R., Garin J. et al. // *Eur. J. Cell Biol.*-1997.-Vol.73.- P.368-377.

Charron F., Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development // *Semin. Cell. Dev. Biol.*- 1999.- Vol.10, №1.- .85-91

Common role for each of the cGATA-4/5/6

genes in the regulation of cardiac morphogenesis / Jiang Y., Tarzami S., Burch J., Evans T. // *Dev. Genet.*- 1998.- Vol.22, №3.- P.263-277.

Cyclins and cyclin dependent kinases during cardiac development / Bershadsky A., Chausovsky A., Becker E. et al. // *Mol. Cells.*- 1997.- Vol.5.- P.1279-1289.

Mikawa T., Gourdie R. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ // *Develop. Biol.*- 1996.- Vol.4, №2.- P.221-232.

Силкина Ю.В. Формирования структурных компонентов миокарда как результат реализации поисковых реакций клеток-мигрантов.

Резюме. В исследовании проведен анализ процессов миграции клеток-дериватов эпикарда (КДЭ), а также определения их роли в формировании соединительнотканного и сосудистого компонентов миокарда. Объект - сердца эмбрионов и плодов человека в период с 5 по 12 недели пренатального развития. Были использованы иммуногистохимические маркеры эндотелия (CD34) и виментина, соответствующие первичные антитела (ДАКО) и система визуализации LSAB. Было установлено, что на 5-й неделе в компактном слое миокарда желудочков наблюдалось небольшое количество виментин-положительных клеток с кластерным характером расположения в глубоких зонах миокарда и поодиочным - в субэпикардиальных участках компактного миокарда. CD34-положительные клетки в этот период характеризовались высокой степенью пролиферативной активности. На 8-й неделе наблюдались многочисленные тяжи CD34-положительных КДЭ в трабекулярном миокарде, но функционирующих сосудов еще не наблюдалось. В плодовом периоде виментин-положительные КДЭ проявляли признаки формирования соединительнотканного дифферона в составе стенки сосудов и эндомизия. Таким образом, миграция КДЭ имеет направленный характер в сторону заселения глубоких участков компактного, а в дальнейшем и трабекулярного миокарда. Завершение миграции КДЭ индуцирует увеличение пролиферативной активности клеток, после чего наблюдаются процессы дифференцировки виментин-положительных клеток в сторону соединительнотканного дифферона, а CD34-положительных - в сторону формирования эндотелия сосудов миокарда.

Ключевые слова: миокард, миграция, кардиогенез, эмбрион человека, эпикард