

О.О.Яковець

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: серце,
людина, імуногістохі-
мія.

Надійшла: 14.08.2014

Прийнята: 11.09.2014

УДК 618.29=611.013:616.125:611.13-037

СУДИННО-ТКАНИННІ ВІДНОШЕННЯ В СТІНЦІ ЛІВОГО ПЕРЕДСЕРДЯ ПЛОДІВ ЛЮДИНИ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Розвиток і становлення органів і тканини експериментальних тварин та людини в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх чинників» (номер державної реєстрації 0112U002124).

Реферат. Метою роботи було дослідження морфологічних особливостей взаємовідношень артеріальної, венозної та лімфатичних вінцевих ланок з тканинними та клітинними елементами в стінці передсердь плодів людини. Для дослідження використані первинні моноклональні антитіла Ki-67, Prox-1. Стінка передсердь у плодів людини має всі ознаки дефінітивної будови з ділянками різного ступеню проліферативної активності клітинних елементів, відносною детермінованістю інтрамуральних ланок судинного руслу.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 3. – С. 76-81.

© О.О.Яковець, 2014

✉ yalenka@i.ua

Yakovets O.O. Vascular-tissue interrelations in the wall of the left atrium of human fetus.

ABSTRACT. Background. Heart diseases are characterized by increased incidence and insufficient knowledge of the mechanism of their development. **Objective.** The aim of the work was to study the morphological features of the interrelations of arterial, venous and lymphatic coronal vessels with tissue and cellular elements in the wall of the left atrium of human fetuses. **Methods.** Hearts of human fetuses from 20th to 32th week of prenatal development in the number 20 were investigated. The sections were processed with primary monoclonal antibodies Ki-67, Prox-1. For the identification of the immunocytochemical reaction chromogen diaminobenzidine tetrachloride 3 solution was applied; positive reaction was detected by the rich brown coloring of specific cells. **Results and conclusion.** The wall of the atria in human fetuses has all the hallmarks of the definitive structure with areas with different degrees of proliferative activity of cellular elements, relative determinism of intramural vascular bed. The proliferative activity of the cellular elements of the atria in fetuses has topological features with excessive level of proliferative activity in subendocardial and middle layers of the myocardium and a low degree in the subepicardial layer of the myocardium. In the fetal period all the elements of the morphological differentiation of vascular elements are present in the wall of the atria, it is confirmed by histological and molecular markers.

Key words: heart, human, immunohistochemistry.

Citation:

Yakovets OO. [Vascular-tissue interrelations in the wall of the left atrium of human fetus]. *Morphologia*. 2014;8(3):76-81. Ukrainian.

Вступ

Дослідження серця та судин серця мають багатовікову історію [1, 2]. Але незважаючи на всі відомі факти, кількість робіт, присвячених вивченню вінцевої судинної системи не тільки не зменшується, але й, навпаки, збільшується з кожним роком [3-5]. З одного боку це пов'язано з тим, що відомості про серце та його судини вже не відповідають сучасним діагностичним вимогам та кардіохірургічним запитам. З іншої сторони фундаментальні, а саме морфологічні, дослідження значно розширюють свої межі за рахунок нових методів, які дозволяють на молекулярному та клітинному рівнях організації інакше оцінювати відомі дані та отримати новий погляд на морфогенез структурних компонентів серця та його судин [6].

У зв'язку з виникненням в останні роки нової лікувальної стратегії у хворих на ішемічну хворобу серця, а саме, клітинної терапії, що містить використання ембріональних стовбурових клітин, є очевидним та актуальним дослідження з метою уточнення та розуміння механізмів розвитку, диференціювання ендотеліальних клітин [3, 7].

У вітчизняній літературі домінують морфологічні дослідження, які стосуються розвитку серця у людини у віковому аспекті, переважно в постнатальному періоді, тоді ж як у англійській науковій періодиці дослідження формоутворення серця та його судин в пренатальному періоді вивчають на тваринах [8, 9].

Відсутність цілісного та єдиного уявлення про ембріональний кардіогенез, полярні думки

щодо походження та розвитку вінцевих судин, термінів їх спеціалізації, регіональних судинно-тканинних взаємовідношень на етапах пренатального розвитку, – все це потребує подальших наукових досліджень з метою упорядкування накопичених та нових морфологічних даних. Зрозуміло, що розвиток науки та техніки значно розширює арсенал методів та інструментів для дослідження біологічних об'єктів. Зокрема поява електронно-мікроскопічних, імуногістохімічних молекулярно-генетичних методів дослідження призвело до виявлення нових морфологічних фактів, які потребують пояснення та порозуміння [10]. Якщо не аналізувати роботи, присвячені кардіогенезу за останнє століття, а поглянути на відомі наукові огляди та оригінальні дослідження, то питання спеціалізації артеріального, венозного та лімфатичного вінцевих сегментів залишається повністю невичерпаним [11, 12]. Як джерела, етапність та послідовність формування та становлення різних судинних компонентів в серці, що розвивається, досі не зрозумілі.

Метою роботи було дослідження морфологічних особливостей взаємовідношень артеріальної, венозної та лімфатичної вінцевих ланок з тканинними та клітинними елементами в стінці передсердя плодів людини.

Матеріали та методи

Для реалізації мети нашої роботи були досліджені серця плодів людини з 20-го по 32-й тиждень пренатального періоду розвитку у кількості 20 об'єктів (10 – терміном 20-22 тижні, 10 – 28-32 тижні).

Серця та фрагменти сердець плодів людини одержували в гінекологічних відділеннях МКЛ №2 та МКЛ №9 м. Дніпропетровська, патолого-анатомічному відділенні обласної дитячої лікарні у відповідності з існуючими нормативно-правовими актами, а також використовували архівний матеріал цих закладів. Отриманий вологий матеріал занурювали у 5% розчин нейтрального забуференого формаліну терміном на 24 години з метою фіксації та стабілізації клітинно-тканинних структур. Проводку у спиртах морфоматеріалу проводили після фіксації за стандартною методикою. Після проводки матеріал заливали у парафін. Зрізи товщиною 5-7 мкм виготовляли на мікромомі та забарвлювали гематоксиліном-еозином. Після отримання мікропрепаратів оцінювали їх з метою подальшого імуногістохімічного дослідження. Для цього були використані первинні моноклональні антитіла, а саме Ki-67, Pгох-1. Для ідентифікації реакції наносили розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлоїду який проявлявся у вигляді коричневого насиченого забарвлення специфічних клітин. Для оцінки імуногістохімічної реакції використовували напівкількісний аналіз за чотирьохбальною шкалою: 0 – клітини без забарвлення; 1 – слабка реакція (<2% забарвлених клітин); 2 – помірна

реакція (3-10%); 3 – висока (11-50%) та 4 – надмірна реакція (> 50% забарвлення клітин). Проліферативну активність оцінювали також шляхом підрахунку Ki-67-позитивних клітин по відношенню до загальної кількості клітин стінки передсердя та виразили це відношення у відсотках, тобто за формулою:

$$PA = \frac{\sum Ki-67}{\sum \text{клітин}} \times 100\%$$

Отримані статистичні дані аналізували за допомогою комп'ютерної програми Statistica+2005. Достовірність середніх значень порівнювали з використанням критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення

Мікроскопічна картина лівого передсердя у плодів мала різноморфний характер. Товщина стінки лівого передсердя змінювалися за рахунок наявності пазух та випинань вздовж стінки. Пазухи були вислані одним шаром ендотелію та на зрізах мали переважно дві форми будови. Можна було відмітити пазухи з широким та вузьким входом. З широким входом пазухи, як правило були неглибокі, а з вузьким входом – формували порожнини. З усіх сторін пазухи були оточені сполучно-тканинно-м'язовим виростами. В товщі цих випинань, якщо розглядати ззовні до середини, стромальні елементи розташовувалися у вигляді «язиків полум'я». По периметру їх оточували 6-8 шарів кардіоміоцитів, які місцями, переважно пухко, та, у меншій мірі, щільно межували один з одним. В стромальному відділі містилися переважно веретеноподібні клітини, які з'єднувалися між собою волокнами та утворювали міжклітинні та міжтканинні простори, більша частина яких була оптично порожня, в інших зустрічалися судинні структури у вигляді ендотеліальних трубок та ендотеліальних каналів круглої, овальної форми або у вигляді «пісочних годинників».

В інших ділянках можливо було чітко розмежувати м'язові пучки. За своєю орієнтацією м'язові пучки ззовні стінки мали переважно поздовжній напрямок, пучки, які формували внутрішній шар, – переважно поперечний напрямок. Товщина цих шарів вздовж стінки також змінювалися з переваженням або поздовжніх, або поперечних м'язових пучків (рис. 1).

Описана морфологічна картина стінки передсердя в цілому узгоджується з даними [13], які отримали при дослідженні клітинно-тканинних взаємовідношень та особливостей розташування м'язових пучків та волокон.

Судинні елементи зустрічалися в усіх шарів міокарду, але найбільша їх концентрація було зосереджена в міжпучкових ділянках. На препа-

ратах, забарвлених гематоксилін-еозіном, доволі просто можна було визначити артеріальні та венозні судини. Артеріальні судини на поперечних зрізах мали більш товщу стінку з 2-3 шарами гладко-м'язових клітин та одним шаром ендотеліальних клітин. Венозні судини, які розташовувалися поряд з артеріальною судиною, мали один шар ендотелію та ззовні 1-2 шари волоконних елементів, діаметр їх порожнин був значно більшим у порівнянні з просвітом артеріальних судин. Окрім міжпучкових просторів значна концентрація судинних елементів була зосереджена в субепікардіальних ділянках.

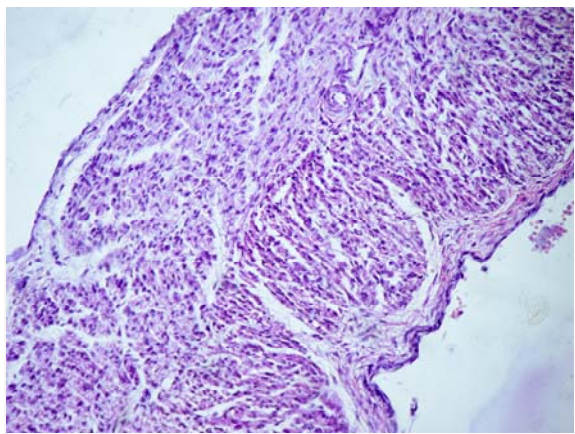


Рис. 1. Стінка лівого передсердя плода людини віком 20 тижнів. Забарвлення гематоксиліном та еозіном. $\times 200$.

В субепікардіальному просторі вздовж стінки лівого передсердя судинні елементи в деяких ділянках нагадували муфтоподібні структури з артеріальними, венозним, а в деяких і лімфатичним представництвом, а місцями і нервовими волокнами, тобто за всіма ознаками представляли собою судинно-нервові пучки (рис. 2).

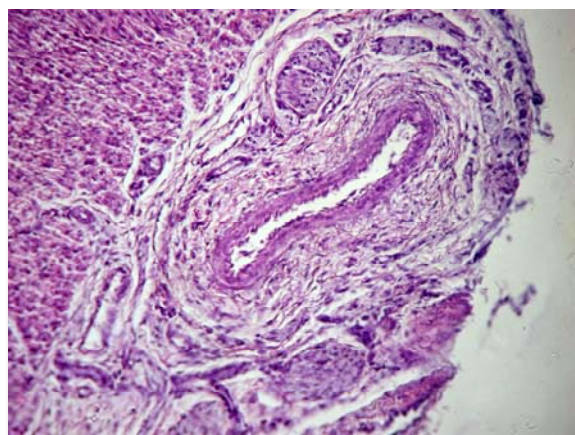


Рис. 2. Стінка лівого передсердя плода людини віком 22 тижня. Забарвлення гематоксиліном-еозіном. $\times 200$.

Наші дослідження особливостей розташування судинних елементів в стінці передсердь значно розширюють результати, які були отримані в ембріональному періоді [14].

Оцінку мітотичної активності клітин лівого передсердя проводили шляхом підрахунку кількості Ki-67 позитивних клітин на 100 клітин. Аналіз мікропрепаратів показав топологічні відмінності в ступені експресії білків, які свідчили про проліферативну активність клітин. Причому у внутрішньому шарі міокарду та в субендокардіальних відділах рівень Ki-67 позитивних клітин перевищував 50%, що свідчить про надмірний ступень проліферативних процесів. А на відмінність від цих ділянок субепікардіальний відділ та зовнішній шар міокарду лівого передсердя кількість Ki-67 позитивних клітин не перевищувала 2% (рис. 3).

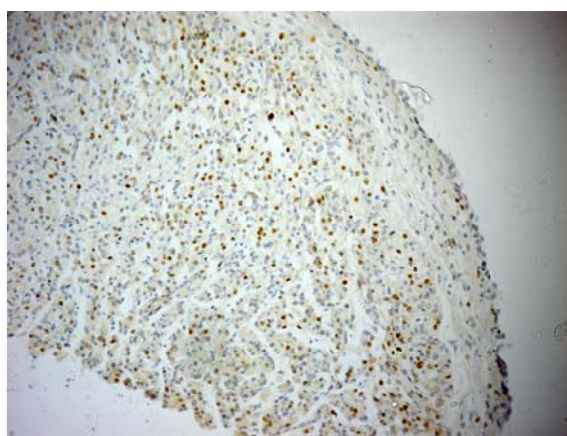


Рис. 3. Стінка лівого передсердя плода людини віком 22 тижня. Імуногістохімічна реакція з маркером Ki-67. $\times 200$.

Мітотична активність нами також було виявлена серед клітин, які були складовими елементами стінки судин. Ki-67 позитивні клітини переважно були розташовані в прилеглих до ендотелію ділянках, мали нерівномірний розподіл по периметру судин. Території периметру з високою експресією коливалися від 1/4 до 2/3 від усього кола або овалу на поперечних та косопоперечних зрізах артеріальних судин.

У плодів 28-32 тижнів внутрішньоутробного розвитку будова судинного русла в передсердях мала низку особливостей, які були обумовлені, на наш погляд, відповідною структурною організацією стінки передсердь, а саме відносна тонкостінність за рахунок відсутності на деяких ділянках м'язових волокон, значний обсяг сполучної тканини, мозаїчність у співвідношеннях м'язової та сполучної тканин, тощо. Артеріальний та венозний сегменти сполучалися між собою за рахунок капілярів, які в прошарках сполучної тканини формували одно- або дворядні коміркові багатоугольні структури, в ділянках з м'язовим

компонентом – розташовувалися переважно вздовж м'язових волокон. Артеріальні та венулярні відділи судинного русла можна було розмежувати на мікропрепаратах за рахунок наявності в артеріальному фрагменті м'язової оболонки та меншим діаметром у порівнянні з венулярним відділом (рис. 4).

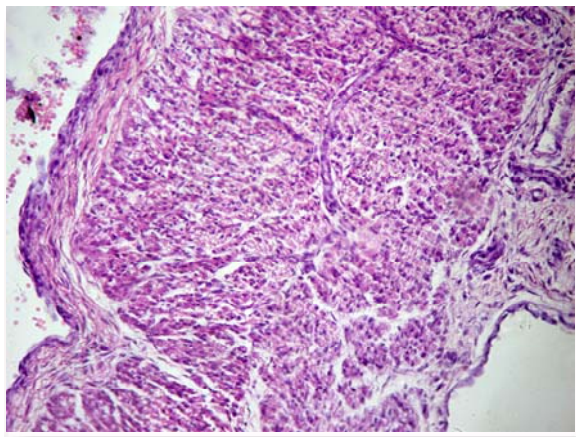


Рис. 4. Стінка лівого передсердя плода людини віком 28 тижня. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$.

Розрахунок в цей віковий період артеріоло-венулярного коефіцієнту в передсердях показав, що в середньому він наближався до 0,76%. Виявлені в стінці передсердь вище наведені особливості будови вінцевої системи також можуть пояснюватися недостатнім диференціюванням судинного компоненту та збереженням проліферативної активності серед клітинних елементів стінки передсердя (табл. 1, рис. 5).

Таблиця 1

Проліферативна активність клітин стінки передсердя за даними експресії Ki-67

Клітинні елементи	20-22 тижня	28-32 тижня
	M \pm m%	M \pm m%
Кардіоміоцити	71,5 \pm 2,6	45,3 \pm 2,3
Ендотеліоцити	38,3 \pm 1,1	19,6 \pm 1,2

Примітка: відмінності між кількісними параметрами Ki-67-позитивних клітин у вивчених вікових періодах достовірні ($P \leq 0,05$).

З метою ідентифікації лімфатичного ендотелію в лівому передсерді нами проводились імуногістохімічні дослідження з використанням антитіл до білка Pгох-1. Цікавими, на наш погляд, морфологічні знахідки, були продемонстровані на рисунку 6.

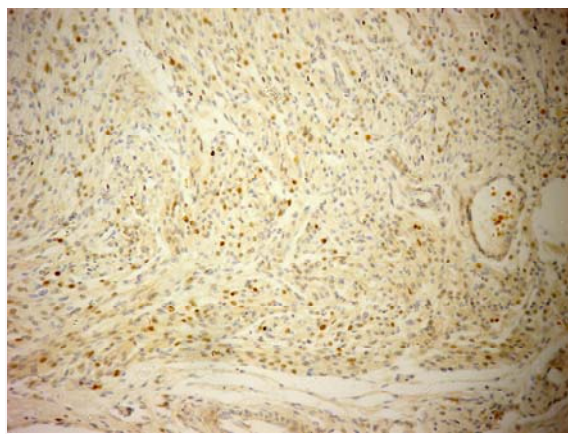


Рис. 5. Стінка лівого передсердя плода людини віком 32 тижня. Імуногістохімічна реакція з маркером Ki-67. $\times 200$.

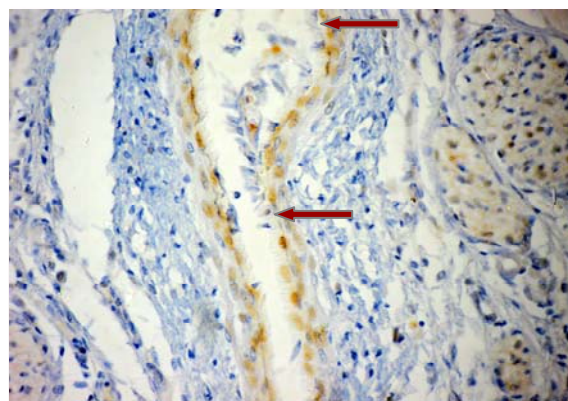


Рис. 6. Стінка лівого передсердя плода людини віком 20 тижнів. Імуногістохімічна реакція з маркером Pгох-1. $\times 400$. Стрілками позначені Pгох-1 позитивні ендотеліальні клітини.

Ми звертали увагу тільки на ті судини, ендотелій яких був на всьому протязі пофарбований у коричневий пігмент. Виявлення цих судин дозволило нам віднести їх до лімфатичного сегменту. Ці судини відрізнялися від інших переважачуючою площею просвіту, різноманітною формою, топологічними характеристиками. Лімфосудини були розташовані як в субепікардіальному просторі, інтраміокардіально, так і субендокардіально. Причому в залежності від локалізації лімфосудин мали регіональні відмінності. Морфологічною знахідкою на демонстрованих препаратах була наявність лімфатичного ендотелію в субендоміокардіальних каналах (рис. 7) та міжтрабекулярних просторах.

Враховуючи достатню кількість досліджень [1,3,7,8,13,15,16] формування, диференціації судинної системи серця, які дозволили накопити значний обсяг фактичних даних з використанням сучасних морфологічних методик, нами, з однієї сторони, були підтверджені та в якійсь мірі розширені уявлення про судинно-тканинні

відношення в стінці передсердя упродовж плодового періоду, а з іншого боку, становлення судинної вінцевої системи нами було розглянуто з урахуванням всіх його ланок, що дозволило нам представити більш цілісну картину структурних перетворень у відповідності з їх проліферативною активністю.

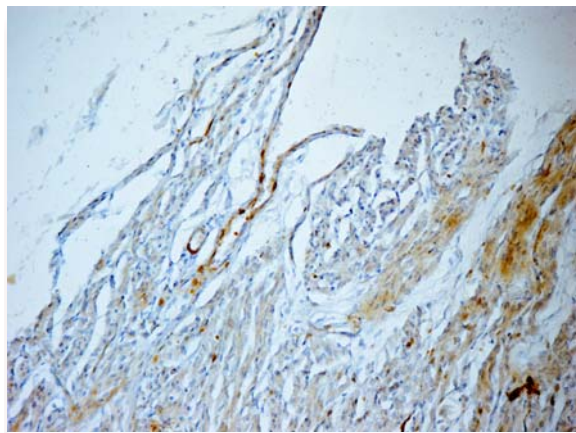


Рис. 7. Стінка лівого передсердя плода людини віком 20 тижнів. Імуногістохімічна реакція з маркером Prox-1. $\times 400$.

Висновки

1. Стінка лівого передсердя у плодів людини має всі ознаки дефінітивної будови з ділянками з різним ступенем проліферативної активності клітинних елементів, відносно детермінованістю інтрамуральних ланок судинного русла.

2. Проліферативна активність клітинних елементів передсердя у плодів має топологічні особливості з надмірним ступенем проліферативної активності в субендокардіальних та середніх шарах міокарду та з низьким ступенем в субепікардіальному шарі міокарду.

3. В плодовому періоді є всі елементи морфологічного диференціювання судинних елементів в стінці передсердя, які підтверджуються гістологічними та молекулярними маркерами. Ланки вінцевої судинної циркуляції в плодовому періоді вже представлені артеріальним, венозним та лімфатичним сегментами.

Перспективи подальших розробок

Планується подальше дослідження судинного русла серця людини в онтогенезі з використанням сучасних морфологічних методів.

Літературні джерела References

1. Chang CP, Bruneau BG. Epigenetics and cardiovascular development. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:41-68. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153242. PMID: 22035349.
2. Francois M, Koopman P, Beltrame M. SoxF genes: Key players in the development of the cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Mar;42(3):445-8. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.017. PMID: 19733255.
3. Leri A, Hosoda T, Kajstura J, Anversa P, Rota M. Identification of a coronary stem cell in the human heart. *J Mol Med (Berl).* Oct 2011;89(10):947-59. doi: 10.1007/s00109-011-0769-8. PMID: PMC3171564.
4. Bearzi C, Leri A, Lo Monaco F, Rota M, Gonzalez A, Hosoda T, Pepe M, Qanud K, Ojaimi C, Bardelli S, D'Amario D, D'Alessandro DA, Michler RE, Dimmeler S, Zeiher AM, Urbanek K, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 15;106(37):15885-90. doi: 10.1073/pnas.0907622106. PMID: 19717420; PMID: PMC2747213.
5. Cui C, Filla MB, Jones EAV, Lansford R, Chevront T, Roubaie S, Rongish BJ, Little CD, Xiong JW. Embryogenesis of the first circulating endothelial cells. *PLoS One.* 2013;8(5):694-699.
6. Kuhn EN, Wu SM. Origin of cardiac progenitor cells in the developing and postnatal heart. *J Cell Physiol.* 2010 Nov;225(2):321-5. doi: 10.1002/jcp.22281. PMID: 20568226; PMID: PMC3620291.
7. Olivey HE, Svensson EC. Epicardial – myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. *Circ Res.* 2010 Mar 19;106(5):818-32. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209197. PMID: 20299672; PMID: PMC2843003.
8. Harris IS, Black BL. Development of the endocardium. *Pediatr Cardiol.* 2010 Apr;31(3):391-9. doi: 10.1007/s00246-010-9642-8. PMID: 20135106; PMID: PMC2836465.
9. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):946-53. PMID: 16355212.
10. Wajesky MW. Development of coronary vessels. *Current Topics in Developmental Biology.* 2004;62:225-59.
11. Srinivasan RS, Oliver G. Prox1 dosage controls the number of lymphatic endothelial cell progenitors and the formation of the lymphovenous valves. *Genes Dev.* 2011 Oct 15;25(20):2187-97. doi: 10.1101/gad.16974811. PMID: 22012621; PMID: PMC3205588.
12. Pototskaya OYu. [Histogenesis of epicardium and coronary vessels endothelium of chick embryo on early stages of prenatal ontogenesis at

normal conditions and during liver bud ablation]. *Morphologia*. 2011;5(4):50-5. Ukrainian.

13. Rosenthal N, Harvey R. Heart development and regeneration. Hardbound; 2010. 978 p.

14. Gorelova NI. [The characteristic of histogenetic processes in the human heart during early cardiogenesis]. *Morphologia*. 2007;1(1):59-62. Ukrainian.

15. Antipov VN. [The peculiarities of vascular-capillary bed formation of the cardiac conduction system in pre- and early postnatal ontogenesis]. *Morphologia*. 2009;3(3):32-6. Russian.

16. Mashtalir MA, Tverdokhlebov IV. [Histochemical, lectin histochemical and immunohistochemical methods in embryological heart researches]. *Morphologia*. 2010;4(2):39-44. Russian.

Яковец Е.А. Сосудисто-тканевые отношения в стенке левого предсердия плодов человека.

Реферат. Целью работы было исследование морфологических особенностей взаимоотношений артериального, венозного и лимфатического венечных звеньев с тканевыми и клеточными элементами в стенке предсердий плодов человека. Для исследования были использованы первичные моноклональные антитела Ki-67, Pгоx-1. Стенка предсердий у плодов человека имеет все признаки дефинитивного строения с участками разной степени пролиферативной активности клеточных элементов, относительной детерминированностью интрамуральных звеньев сосудистого русла.

Ключевые слова: сердце, человек, иммуногистохимия.