

**К.І.Дяговець**

ДЗ «Дніпропетровська  
медична академія МОЗ  
України»

**Ключові слова:** хрома-  
фінна тканина, клітини  
нервового гребеня, кар-  
діоембріогенез.

*Надійшла: 16.11.2015*

*Прийнята: 10.12.2015*

УДК: 611.12:611.131/.132:616.151.1]-092. 9

## **ГІСТОТОПОГРАФІЯ ХРОМАФІННОЇ ТКАНИНИ СЕРЦЯ МИШІ НА КРИТИЧ- НИХ ЕТАПАХ КАРДІОГЕНЕЗУ В УМОВАХ НОРМИ**

**Реферат.** З метою визначення гістотопографії хромафінної тканини ембріонального серця миші було використано серця мишачих ембріонів лінії C56BL/6 з 10,5-ю по 13,5-ю доби кардіоембріогенезу. Було визначено особливості розташування хромафінних клітин у складі популяції конденсованої мезенхіми ендокардіальних структур та міокарда ембріонального серця. Встановлено формування субендокардіальної фракції феохромних клітин з ознаками скупченості.

**Morphologia.** – 2015. – Т. 9, № 4. – С. 26-30.

© К.І.Дяговець, 2015

✉ katdyaga@gmail.com

**Dyagovets K.I. Histotopography of the chromaffin tissue of the mouse heart on critical stages of the normal cardioembryogenesis.**

**ABSTRACT. Background.** Pheochromocytoma is tumor of chromaffin tissue, which is very hard to diagnose. Chromaffin tissue present not only in the adrenal gland, but also some cells determined in all organs of the head, neck and body. Heart population of chromaffin tissue has signs of the high developmental level during the embryonic period. It's known, that chromaffin cells develop from neuroectoderm, like neural crest cells. There is an opinion that neural crest cells differentiate into the chromaffin tissue. **Objective.** Determine histotopography of the chromaffin tissue of the mouse heart on critical stages of the normal cardioembryogenesis. **Methods.** Embryonic mice hearts line C56BL/6 were fixed by 10%-formalin and then were subjected to the standard histological procedures. The sections 5 μm thickness were stained by the Vizel. **Results and conclusion.** It was established that among neural crest cells or condense mesenchyma determined cells with specific granules. These granules had specific semilunar shape and bilberry color. Cells which have same granules named like chromaffin cells. They differentiate from neural crest cells according to the opinions of some scientists. These cells have much less proliferation activity than neuroblasts. Chromaffin cells still had a few of phenotypic differences during the migration from the aortic arches. They might to be determined since the beginning of this migration. We observed that in our results. Summing up, there were defined two populations of chromaffin cells in embryo heart during the critical rotation and septation stages. They were located on subendocardial regions of the embryo heart mostly and had focal signs.

**Key words:** chromaffin tissue, neural crest cells, cardioembryogenesis.

### **Citation:**

Dyagovets KI. [Histotopography of the chromaffin tissue of the mouse heart on critical stages of the normal cardioembryogenesis]. *Morphologia*. 2015;9(4):26-30. Ukrainian.

### **Вступ**

За статистикою ВООЗ згідно з результатами міжклінічних аутопсійних даних [1], пухлини хромафінної тканини (надниркові та ненадниркові парагангліоми) виявляються в середньому у 0,005 % випадків. Однак, відносно цієї статистики, лише у 50% випадків вони діагностуються за життя. Таким чином, дана нозологічна одиниця зустрічається у клінічній практиці подібно до айсбергу, значна частина якого прихована під водою. Складності своєчасної діагностики першочергово зумовлені різноманітністю гістотопографії хромафінної тканини, особливостями ембріогенезу та відмінностями функціональної активності феохромних ділянок, розкиданих по всьому організму. Достатньо давно відомо, що хро-

мафінні клітини можуть розташовуватися майже влюбій частині голови, шії та тулуба поодинокі або вузлами. Протягом ембріонального періоду екстраадrenalна популяція феохромної тканини має значні розміри та ступінь функціональної активності. Після народження починають активно працювати хромафінні клітини коркової речовини надниркових залоз, функціонально замінюючи ненадниркову популяцію, яка з віком значно зменшується. Ембріональним джерелом походження цієї популяції клітин є нейроектодерма. Більш клінічно показовими та добре вивченими є парагангліоми черевного відділу аорти (пухлини Цуккеркандля), але можуть траплятися також випадки зосередження новоутворень поряд із вузлами симпатичної нервової системи,

біля основи мозку, у епідермісі та у серці.

Популяції серцевої хромафінної тканини на сьогодні присвячена відносно невелика кількість робіт, в основному стосовно фізіології феохромних клітин зрілого серця та їхнього взаємозв'язку з наднирковими залозами. В умовах складності діагностування хромафінних пухлин важливим та відкритим залишається питання гістотопографічних особливостей хромафінної тканини саме ембріонального серця, кількісно-якісного корелювання з іншими популяціями клітин відповідно до джерела походження.

Питання візуалізації та відповідного внеску клітин нервового гребеня у процеси кардіогенезу беззаперечно підлягало з'ясуванню багатьма світовими вченими, в тому числі і представникам дніпропетровської школи морфологів. Дану популяцію клітин ототожнювали з конденсованою мезенхімою, виявляли за допомогою імуногістохімічних маркерів (NF, neuregulin) [2]. Різні способи ідентифікування клітин нервового гребеня в процесі кардіогенезу в результаті підтверджували їх наявність в зрілому серці. Це і підштовхнуло нас до пошуку подальшої долі цих клітин. З'ясувалося, що існує думка стосовно часткового диференціювання даної популяції клітин у феохромні. Отже, спільне джерело походження та наявність хромафінних гранул при ультрамікроскопічному дослідженні клітин нервового гребеня, подібних до специфічної зернистості хромафінних клітин надниркових залоз, вказують на родинність цих двох клітинних популяцій.

**Мета роботи** визначити топографію хромафінної тканини ембріонального серця миші під час критичних етапів гістогенезу.

#### **Матеріали та методи**

Матеріалом для роботи стали ембріональні серця миші лінії C56BL/6, вирощені в умовах норми та взяті з 10,5-ю по 13,5-ю доби ембріогенезу. Дослідження на тваринах проводили у відповідності до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001), які узгоджуються з Європейською конвенцією про захист експериментальних тварин (Страсбург, 1985). Матеріал фіксували в розчині 10%-ого забуференого формаліну, зневоднювали та заливали в парапласт. Гістологічні зрізи товщиною 5 мкм забарвлювали за Візелем з метою визначення хромафінних клітин.

#### **Результати та їх обговорення**

Клітини нервового гребеня – далеко мігруюча популяція клітин-попередників, підлягає широкому спектру диференціювання. Один з ключових попередників вегетативної нервової системи, хромафінної тканини мозкової речовини надниркових залоз та позанадниркової феохромної популяції клітин [3].

Протягом нашого дослідження спостерігалася певна хімічна реакція, але не класична. Справа в тому, що специфіка проводки для дано-

го типу забарвлення, а саме використання біхро-матів калію, можливо, не дала нам класичного триколову хімічної реакції. Все одно в результаті нашої роботи спостерігалася яскрава відмінність ядерно-цитоплазматичного забарвлення всіх клітин та хромафінних гранул феохромних клітинних популяцій. Останні мали яскраво чорничний колір, який чітко контурував межі специфічних гранул у вигляді півмісяця на полюсах клітин. Якісним контрольним критерієм цієї хімічної реакції стало ідентичне забарвлення хромогену еритроцитів.

На 10,5-й добі ембріогенезу спостерігалася наявність клітин зі специфічними гранулами у складі ендокардіальних утворень конусо-стовбурового відділу ембріонального серця. Дані клітини можна було розділити на дві групи. До першої ми відносили ті, що знаходилися в подушках стовбура та мали мігруючий характер. Другу групу представляли клітини субендокардіального шару, які мали більш яскраву специфічну реакцію. Хромафінні гранули другої групи клітин саме формували півмісяцеві утворення та займали значну частину цитоплазми. Субендокардіальна фракція клітин поблизу міокардіальної манжетки фракція на цьому терміні мала слабо виражене забарвлення гранул. Їхні контури не візуалізувалися, але колір цитоплазми різнився від інших кардіоміоцитів. Не всі мігруючі клітини мали специфічність реакції (рис. 1А).

Під час 11,5-ю доби спостерігалася подібна картина в ендокардіальних структурах конусо-стовбурового відділу. Субендокардіально починалося формування скупчень клітин, що мали специфічні гранули. Від еритроцитів їх вирізняв міжклітинний зв'язок або зв'язок з кардіогелем та веретеноподібна форма. Звертали на себе увагу клітини, що концентрувалися поблизу міокардіальної манжетки та виявляли інтенсивну реакцію (рис. 1Е).

Протягом 12,5-ю доби відбувався критичний етап ротації та септаційних перебудов конусо-стовбурового відділу. Наявність вищеописаних клітин була очевидною, також спостерігалась певна тенденція до утворення скупчень. Найбільш яскраво вирізнялися специфічні клітини, що заповнювали порожнини аортальних дуг, виповнюючи їхню люменальну поверхню та стовбурово-конусний люмен також. Ніби “тонкою ниткою”, що спадала з аортальних дуг, вони зшивали стовбурові подушки та конусні гребені. Звичайно, даний характер розташування клітин мав певні аналогії з клітинами конденсованої мезенхіми, або нейробластами. Але очевидно, що під час специфічного виявлення хромафінної популяції можна було спостерігати певні фенотипічні відмінності. По-перше, клітини, що “зшивали” ендокардіальні структури мали досить слабку реакцію, вони справді мали яскраво забарвлену цитоплазму, як і клітини конденсова-

ної мезенхіми. Серед них часто виднілися ознаки апоптозу. По-друге, більш яскрава хімічна реакція визначалася серед субендокардіально розта-

шованих клітин, які групувалися та утворювали певні скупчення (рис. 1Б).

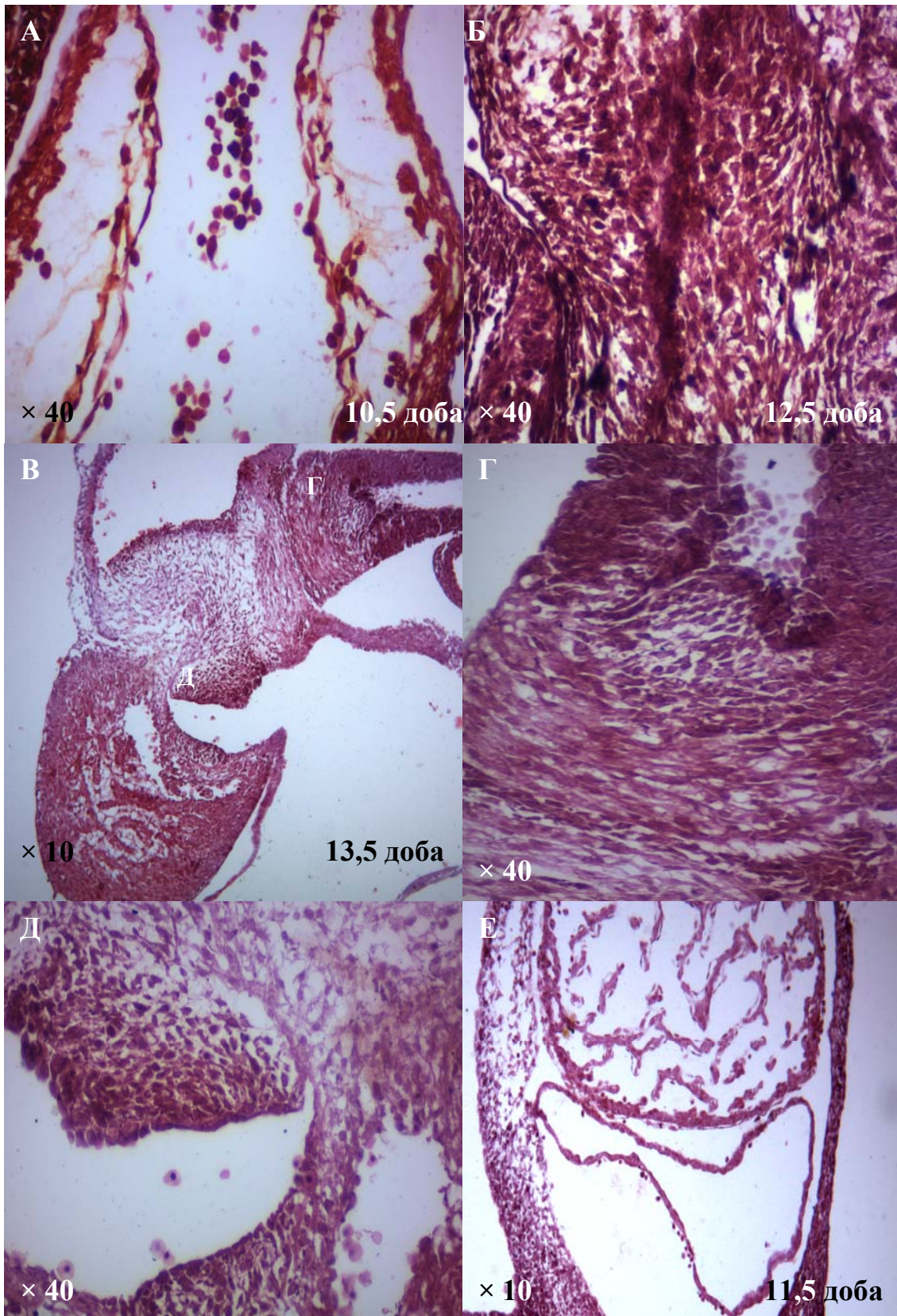


Рис. 1. Гістологічні зрізи ембріонального серця миші. Забарвлення за Візелем. А, Б – фронтальні зрізи конусовидного відділу; В-Д – сагітальні зрізи серця; Е – горизонтальний зріз серця.

На цьому терміні більш яскраво контурувалися гранули саме тих хромафінних клітин, що розташовувалися поблизу міокарда.

Протягом наступної доби визначалися остаточно септація конуса та початок септаційних перебудов атривентрикулярного сектору. Специфічно забарвлені клітини спостерігалися субендокардально. Їхні гранули мали дуже яскраве забарвлення та займали майже всю частину цитоплазми. Спостерігалася певна тенденція до зменшення їхньої кількості та більших ознак скупченості (рис. 1 В-Д).

Отже, згідно нашим результатам відмічався розподіл клітин конденсованої мезенхіми на ті, що мають специфічні гранули та на ті, що їх не мають. Скоріш за все, нам саме і вдалося вирізнити серед клітин нервового гребеня хромафінні. Згідно даним досліджень [4] фенотипічна сегрегація між цими двома популяціями клітин з'являлася на 12,5-ю добу ембріогенезу. При цьому обидва типи клітин були позитивні до тирозингідроксилази, тоді як клітини нервового гребеня виявляли ще позитивність реакції до амфетамін-регулюючого транскрипційного пептиду, а хромафінні клітини мали Sox+ реакцію. Проліферативна активність всіх клітин зростала з 10,5-ї доби, але на 11,5-ю добу хромафінні клітини виходили з клітинного циклу та лише 20% від їхньої кількості поверталися на 12,5-й день ембріогенезу. Отже, як і під час нашого дослідження, відмінності проліферативної поведінки між цими двома популяціями були помітні з самого початку.

Дослідження паттерну фенотипічних маркерів та динаміки клітинного циклу нейробластів та хромафінних клітин показали, що останні виявляють значно меншу проліферативну активність аніж попередні [5]. На нашу думку, це є свідченням того, що перша порція клітин нервового гребеня, збільшується у кількості під час критичних періодів кардіогенезу, виконуючи регулюючий вплив та підлягаючи подальшій редукції шляхом апоптозу.

Ряд сучасних досліджень підтверджує певний ступінь диференціювання клітин нервового гребеня у хромафінні клітини [6]. При вивченні

персистуючої експресії BMP-4 кортикальних клітин надниркових залоз зародка курки та їхнього впливу на розвиток хромафінної тканини вчені дійшли висновку, що аналогічна ситуація в серці відбувається при експресії BMP-4 дорсальною аортою. Зростання кількості BMP-4 призводить до зростання тирозингідроксилази в мігруючих клітинах, що робить їх фенотипічно іншими. Це відбувається на 23-ю стадію за Гамбургером-Гамільтоном у курки та 12,5-ю добу у миші. Більш того, інгібування кісткового морфогенетичного протеїну не відображується на проліферативній активності клітин нервового гребеня [7, 8]. Зміна фенотипу клітин-попередників, можливо, свідчить про початок синтезу хромафінних гранул, які дають позитивну специфічну реакцію. До речі, дослідження [8] вказують на те, що відмінність у фенотипі спостерігається вже на початку міграції клітин нервового гребеня, під час відокремлення від нервового стовбура.

#### Підсумок

Можна діагностувати наявність феохромних клітин серед популяції клітин нервового гребеня та встановити певні гістотопографічні закономірності розташування хромафінної тканини у мишачому серці протягом критичних етапів кардіо-ембріогенезу:

1. Формування субендокардіальної популяції з переважним розташуванням поблизу міокарда.

2. Утворення певних скупчень, що з віком набувають оформленості.

Про наявність хромафінної тканини в серці необхідно пам'ятати, оскільки це може бути місцем малігнізації в разі онкологічної настороженості. Ця обставина має велике практичне значення для топічної діагностики хромафінних пухлин.

#### Перспективи подальших розробок

Визначити топографію серцевої хромафінної клітинної популяції на подальших строках ембріогенезу, а також у постембріональному періоді. Провести кількісно-якісне корелювання з популяцією клітин нервового гребеня. Використати нові засоби ідентифікації феохромних клітин ембріонального серця.

#### Літературні джерела References

1. Beltsevich DG, Kuznetsov NS, Lysenko MA, Tsalikova AT. [Pheochromocytoma]. *Consilium medicum Ukraina*. 2008;2(5):18-23. Russian.
2. Silkina YuV. [Some aspects of developmental conjugation of heart's nervous and conductive systems]. *World of medicine and biology*. 2013; (3, Pt 2):17-9. Russian.
3. Lumb R, Schwarz Q. Sympathoadrenal neural crest cells: the known, unknown and forgot-

ten? *Dev Growth Differ*. 2015 Feb;57(2):146-57. doi: 10.1111/dgd.12189.

4. Unsicker K. The chromaffin cell: paradigm in cell, developmental and growth factor. *J Anat*. 1993 Oct;183 ( Pt 2):207-21. PMID: 8300412.

5. Hei Chan W, Gonsalvez DG, Young HM, Michelle Southard-Smith E, Cane KN, Anderson CR. Differences in CART expression and cell cycle behavior discriminate sympathetic neuroblast

from chromaffin cell lineages in mouse sympathoadrenal cells. *Dev Neurobiol.* 2015 May 18. doi: 10.1002/dneu.22304. PMID: 25989220.

6. Huber K, Franke A, Brühl B, Krispin S, Ernsberger U, Schober A, von Bohlen und Halbach O, Rohrer H, Kalcheim C, Unsicker K. Persistent expression of BMP-4 in embryonic chick adrenal cortical cells and its role in chromaffin cell development. *Neural Dev.* 2008 Oct 22;3:28. doi: 10.1186/1749-8104-3-28.

7. Huber K, Kalcheim C, Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Auton Neurosci.* 2009 Nov 17;151(1):10-6. doi: 10.1016/j.autneu.2009.07.020.

8. Shtukmaster S, Schier MC, Huber K, Krispin S, Kalcheim C, Unsicker K. Sympathetic neurons and chromaffin cells share a common progenitor in the neural crest in vivo. *Neural Dev.* 2013 Jun 18;8:12. doi: 10.1186/1749-8104-8-12.

**Дяговец Е.И. Гистотопография хромаффинной ткани сердца мыши на критических этапах кардиоэмбриогенеза в условиях нормы.**

**Реферат.** С целью определения гистотопографии хромаффинной ткани эмбрионального сердца мыши были использованы сердца мышинных эмбрионов линии C56BL/6 с 10,5-й по 13,5-й день кардиоэмбриогенеза. Были определены особенности расположения хромаффинных клеток в составе популяции конденсированной мезенхимы в эндокардиальных структурах и миокарде эмбрионального сердца. Установлено формирование субэндокардиальной фракции феохромных клеток с признаками очаговости.

**Ключевые слова:** хромаффинная ткань, клетки нервного гребня, кардиоэмбриогенез.