

М.А.Волошин¹
Ю.Б.Чайковський²

¹ Запорізький державний
медичний університет

² Національний медичний
університет імені О.О.Бо-
гомольця

Ключові слова: міокард,
нейрофіламенти, клітини
крові, міграція, ембріо-
нальне серце людини.

Надійшла: 02.09.2010

Прийнята: 21.09.2010

УДК 611.127:57.017.22:54.113

ШЛЯХИ МІГРАЦІЇ КЛІТИН РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ В ЕМБРІОНАЛЬНЕ СЕРЦЕ ЛЮДИНИ

Резюме. За допомогою імуногістохімічного методу з використанням антитіл до нейрофіламентів були досліджені серця ембріонів людини у термін з 4 до 8 тижня пренатального розвитку. Було встановлено, що в ембріональному серці людини присутні нейрофіламент-позитивні клітини, які заселяють його територію двома шляхами: шляхом міграції за механізмом пересування по міжклітинних просторах та за механізмом занурення із порожнини серця. Нейрофіламент-позитивні клітини у складі крові ембріона через ендотелій судин та ендокарда потрапляють у товщу міокарда та у мезенхімні ділянки серця. Мезенхіма містить маркерні клітини, які мігрують у її структуру за обома механізмами. Схожі клітини були знайдені у структурі печінки ембріона, починаючи з 5 тижня гестації.

Морфологія. – 2010. – Т. IV, № 3. – С. 14-17.

© М.А.Волошин, Ю.Б.Чайковський, 2010

Voloshin N.A., Chaykovsky Yu.B. Migration paths of cells different origins in the embryonic human heart.

Summary. Hearts of human embryos were investigated using immunohistochemical method with antibodies to neurofilaments from 4 to 8 week of prenatal development. It was found that the embryonic human heart there are NF-positive cells, which occupy its territory by two mechanisms: through the migration of intercellular spaces and on the mechanism immersion out of heart cavity. In the second case neurofilaments-positive cells through the endothelium of blood vessels or endocardium immersion into the myocardium or mesenchymal areas. Mesenchyme in the heart contain neurofilament-positive cells, migrating here from both mechanisms. Similar cells have been found by us in the liver of human embryo, beginning at 5 weeks of prenatal development.

Key words: myocardium, neurofilaments, blood cells, migration, embryonic human heart.

Вступ

Перше десятиріччя XXI сторіччя виявилось багатим на відкриття, які піддають сумнівам фундаментальні наукові положення – наприклад, про неможливість регенерації нейронів чи кардіоміоцитів, або про те, що швидкість світла є сталою, а параметри кривизни часу та простору взаємозалежними. Останні роки з'являються все нові свідчення про можливість стовбурових клітин створювати популяції (Вермель А.Е., 2004), які не присутні у нормі в тому чи іншому органі, але під дією певних чинників вони здатні відтворювати фенотип та, логічно, функцію клітин "органа-реципієнта" (Young H. et al., 2004). Так, було встановлено, що нервові стовбурові клітини можуть бути джерелом клітин крові (Davenport R., 2002), а клітини кістково-мозкового походження здатні диференціюватися в клітини міокарда (Orlic et al., 2002), овальні гепатоцити (Leo A., Grande D., 2006), а також клітини нервової тканини (Mazzini L. et al., 2003; Priller J., 2003). Ідентифікація таких клітин можлива при використанні моноклональних антитіл, які, однак, не є кластерними маркерами, а є тропними до специфічних цитозольних протеїнів. Наприклад, результати одного з досліджень (Mezey E.,

Chandross K., 2000) вказують на позитивну реакцію клітин кісткового мозку із гліальним фібрилярним кислим протеїном (GFAP), антитілами до нейрональних білків, а також до важкої субодиниці триплету нейрофіламентів (200 кДа).

Дані інших літературних джерел, отримані за допомогою використання вказаних детермінант, описують експерименти із введенням мічених стовбурових клітин кістково-мозкового генезу у різні ділянки мозку щурів, після чого були констатовані можливості їхнього диференціювання у нейроноподібні та гліальні клітини (Zou X., 2004). Крім того, існує низка експериментальних досліджень з трансплантації мононуклеарних клітин кісткового мозку з метою лікування ішемічної хвороби серця та інфаркту міокарда (Бузиашвили Ю.И. и соавт., 2005; Афанасьев С. А. и соавт., 2007). Таким чином, вивчення характеристик стовбурових клітин із широким спектром детермінаційних можливостей дозволить сподіватися на результативні пошуки способів використання аутологічних клітин в лікуванні дегенеративних, післятравматичних, гострих запальних та інших захворювань нервової і серцево-судинної систем.

Міграція у структуру тканинних компонен-

тів серця поліпотентних різних за походженням клітин в період ембріонального розвитку може мати на меті не тільки формування нервової, провідної, судинної систем, але і створення певного банку малодиференційованих клітин для майбутнього забезпечення фізіологічної, а можливо і репаративної, регенерації. Однак увагу кардіоембріологів привертають частіше клітини нервового гребеня (як активного учасника нормального кардіогенезу і процесів розвитку деяких вад), ніж шляхи міграції та доля істинно стовбурових клітин, які залишаються малодиференційованими і у зрілому серці. Їх важко фенотипувати з тієї причини, що майже весь клітинний масив раннього серця має ембріональні властивості, а тому маскує заселення клітин іншого походження.

Метою нашого дослідження було вивчення характеристик клітин-мігрантів в ембріональному серці людини.

Матеріал та методи дослідження

Були досліджені серця ембріонів людини у термін з 4 до 8 тижня пренатального розвитку. При дослідженні біологічного матеріалу були дотримані етичні та законодавчі норми та вимоги, які пред'являються до наукових морфологічних досліджень органів людини (Кулініченко В.Л. та співавт., 2007). У дослідженні були використані антитіла до білків триплету нейрофіламентів (NF, клон 2F11, LabVision). При діагностиці препаратів на світлооптичному рівні антиген-позитивні клітини ідентифікувалися за їхнім коричневим забарвленням. У якості контролю позитивної реакції слугували нервові волокна, які активно накопичували маркер. Реакцію оцінювали напівкількісним методом за наступними критеріями: 0 балів – відсутність реакції, 1 бал – слабо позитивна реакція, 2 бали – помірно позитивна, 3 бали – різко позитивна.

Результати та їх обговорення

Ембріональні тканини, у тому числі міокард, характеризуються високою активністю процесів клітинних реакцій, завдяки яким відбувається формоутворення та гістогенез органів і систем. В процесі реалізації цієї мети клітини можуть долати значні відстані, створюючи нові осередки своєї популяції всередині інших клітинних мультисистем. Найбільш яскравим прикладом подібних пошукових реакцій є міграція клітин нервового гребеня (НГ), який є джерелом багатьох різних за кінцевою структурою та функцією клітинних популяцій (шваннівських клітин, меланоцитів, С-клітин щитоподібної залози, остеоцитів кісток черепа, сполучної тканини серця та багатої інших). Механізми міграції клітин НГ описані дуже добре, причому вважається, що, внаслідок втрати контактного зв'язку із основним масивом клітин, вони набувають ознак мезенхіми і за допомогою молекул клітинної адгезії (МКА) мігрують шляхом пересування по міжклі-

тинним просторам завдяки специфічній взаємодії із міжклітинним матриксом.

За даними літератури, клітини нервового гребеня, незважаючи на їхнє маскування під мезенхіму, експресують нейрональні протеїни, що і дозволяє їх ідентифікувати. Наше дослідження ембріонального серця людини із використанням одного з маркерів таких протеїнів дозволило спостерігати клітини, які, з одного боку, були NF-позитивними, а з іншого - мігрували у стінку серця не за загальноприйнятним механізмом, описаним вище, а шляхом занурення у стінку серця з його порожнини. Ці клітини мали розміри, подібні до NF-негативних ядерних клітин крові (рис. 1А), округлу форму та експресували епітоп по всій цитоплазмі з рівномірним характером його розподілення. Визначити параметри ядра було майже не можливо з причини значного накопичення маркеру.

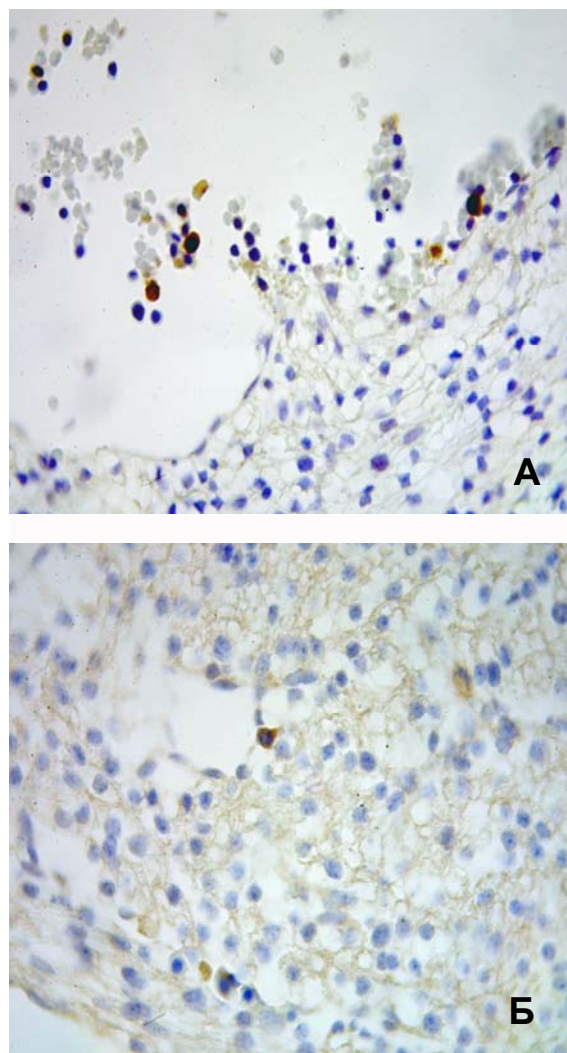


Рис. 1. Ділянка шлуночка серця людини на 5 тижні ембріонального розвитку. Обробка антитілами до нейрофіламентів. А - NF-позитивні клітини у порожнині серця; Б - занурення NF-позитивної клітини через ендотелій у товщу міокарда. $\times 400$.

Заселення клітин відбувалося як у міокард (рис. 1Б), так і у мезенхіму ендокардіальних подушок (рис. 2), які виконують на ранніх строках кардіогенезу роль стулок у передсердно-шлуночковому каналі, а пізніше є субстратом для аорто-пульмональної та шлуночкової септації.

Важливим було те, що поряд з описаними NF-позитивними клітинами, спостерігалися також кластери, які експресували епітоп, у міжклітинних просторах мезенхімних ділянок серця, потрапляючи у хню структуру шляхом "традиційної" міграції – пересуванням через широкі міжклітинні простори.

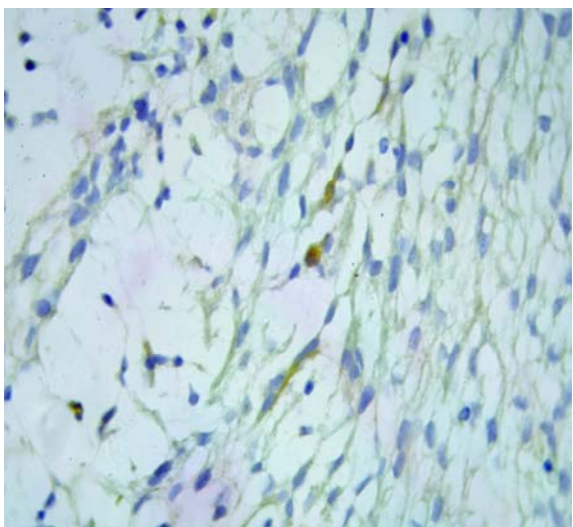


Рис. 2. Ділянка ендокардіальної подушки серця людини на 6 тижні ембріонального розвитку. Обробка антитілами до нейрофіламентів. $\times 400$.

Цей процес здійснюється за допомогою МКА, які дозволяють створювати короткотермінові контакти із міжклітинним матриксом або оточуючими клітинами. МКА присутні, скоріше за все, і на поверхні NF-позитивних клітин крові з метою адгезії до ендотеліоцитів (рис. 3А) та занурення у міокард (рис. 3Б), або пласт мезенхімних клітин (рис. 3В). Подальша їхня доля поки що не встановлена.

Постає низка питань – описані NF-позитивні клітини мають єдине чи різне походження? Якщо єдине – чому реалізують міграційний потенціал за різними механізмами? А якщо різне – яке походження мають NF-позитивні клітини, знайдені в крові?

Якщо припустити, що це є мононуклеарні клітини кісткового мозку, описані в літературі як стовбурові із поліпотентними можливостями (у тому числі кардіоміоцитарними), то зазначимо, що у цей період онтогенезу кістковий мозок ще відсутній, а джерелом гемопоетичних клітин є печінка та селезінка. Це, однак, не скреслює припущення щодо їх гемопоетичного походження, але у такому разі змінює уявлення про детер-

мінаційні характеристики клітини крові гепатолієнального періоду кровотворення.

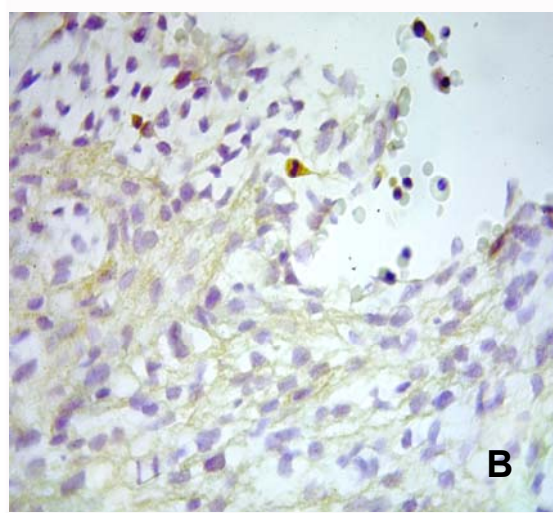
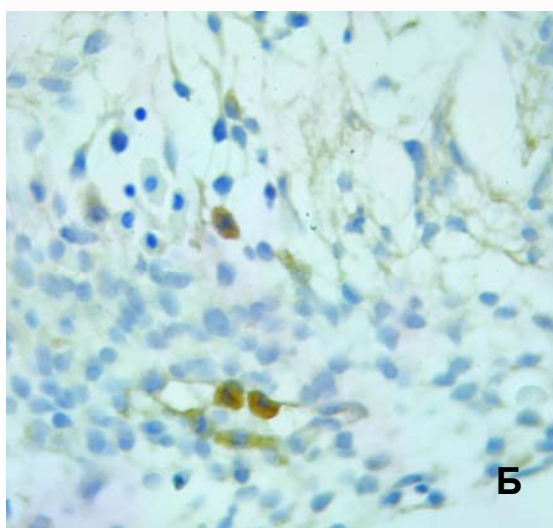
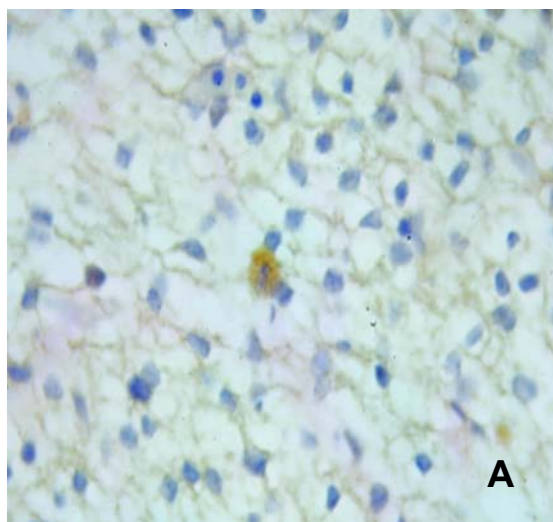


Рис. 3. Серце людини на 8 тижні ембріонального розвитку. Обробка антитілами до нейрофіламентів. А – адгезія NF-позитивних клітин до ендотелію; Б – занурення NF-позитивної клітини у товщу міокарда; В – міграція NF-позитивних клітин у мезенхіму з порожнини серця. $\times 400$.

Ми дослідили структуру печінки у період з 4 до 8 тижня гестації людини і встановили присутність у її складі подібних NF-позитивних клітин, що додає аргументів до теорії гемопоетичного походження описаних клітин.

Висновки

1. В ембріональному серці людини присутні NF-позитивні клітини, які заселяють його територію двома шляхами: шляхом міграції за механізмом пересування по міжклітинних просторах та за механізмом занурення із порожнини серця.

2. Маркер-позитивні клітини у складі крові ембріона через ендотелій судин та ендокарда

попадають як у товщу міокарда, так і у мезенхімні ділянки серця.

3. Мезенхіма ембріонального серця містить NF-позитивні клітини, які мігрують у її структуру за обома механізмами.

4. NF-позитивні клітини, присутні у складі крові, мають схожі характеристики із клітинами печінки ембріона людини, починаючи з 5 тижня гестації.

Перспективи подальших розробок: вивчити можливість подальшої долі NF-позитивних гемопоетичних клітин в міокарді.

Літературні джерела

Вермель А. Е. Стволовые клетки: общая характеристика и перспективы применения в клинической практике / А. Е. Вермель // Клини. медицина. - 2004. - № 1. - С. 5-11.

Влияние интрамиокардиальной трансплантации мононуклеарных клеток костного мозга на электромеханическое сопряжение кардиомиоцитов крыс после криодеструкции миокарда / С. А. Афанасьев, И. Н. Свиридов, В. П. Шахов [и др.] // Вест. аритмологии. - 2007. - № 47. - С. 38-41.

Дотримання етичних та законодавчих вимог при виконанні наукових морфологічних досліджень (методичні рекомендації) / [В. Л. Куліниченко, В. Д. Мішалов, Ю. Б. Чайковський та ін.]. - Київ, 2007. - 29 с.

Сілкіна Ю. В. Імуногістохімічна ідентифікація провідних кардіоміоцитів в ембріональному серці / Ю. В. Сілкіна, І. В. Твердохліб // Вісник морфології. - 2009. - № 1. - С. 51-54.

Острый коронарный синдром и клеточные технологии / Ю. И. Бузиашвили, С. Т. Мацкеплишвили, Б. Г. Алекаян [и др.] // Вест. Российской АМН. - 2005. - № 4. - С. 65-69.

Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering / Н. Young, С. Duplaa, М. Romero-Ramos [et al.] // Cell Biochem. Biophys. - 2004. -

Vol. 40, № 1. - P. 1-80.

Davenport R. Lucky or Good? Stem cells' all-around talent disputed (Stem cells) / R. Davenport // Sci. Aging Knowl. Environ. - 2002. - Vol. 120, № 11. - P. 36-45.

Differentiation of bone marrow-derived stem cells in injured rat brain tissue / X. Zou, H. Zhang, C. Zhao [et al.] // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. - 2004. - Vol. 24, № 10. - P. 1102-1106.

Leo A. Mesenchymal stem cells in tissue engineering / A. Leo, D. Grande // Cells Tissues Organs. - 2006. - Vol. 183, № 3. - P. 345-352.

Mezey E. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system / E. Mezey, K. Chandross // Europ. J. of Pharmac. - 2000. - Vol. 405, № 1-3. - P. 297-302.

Orlic D. Stem cells for myocardial regeneration / D. Orlic, J. Hill, A. Arai // Circ. Res. - 2002. - Vol. 91. - P. 1092-1099.

Priller J. Grenzgänger: adult bone marrow cells populate the brain / J. Priller // Histochemistry and Cell Biology. - 2003. - Vol. 120, № 2. - P. 85-91.

Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans / L. Mazzini, F. Fagioli, R. Boccaletti [et al.] // Amyotrophic Lateral Sclerosis. - 2003. - Vol. 4, № 3. - P. 158-161.

Волошин Н.А., Чайковский Ю.Б. Пути миграции клеток различного генеза в эмбриональное сердце человека.

Резюме. С помощью иммуногистохимического метода исследования с использованием антител к нейрофиламентам были исследованы сердца эмбрионов человека с 4 по 8 неделю пренатального развития. Было установлено, что в эмбриональном сердце человека присутствуют нейрофиламент-позитивные клетки, которые заселяют его территорию по двум механизмам: путем миграции по межклеточным пространствам и по механизму проникновения из полости сердца. Во втором случае нейрофиламент - позитивные клетки через эндотелий сосудов или эндокарда проникают в миокард или в мезенхимные участки. Мезенхима в сердце содержит нейрофиламент позитивные клетки, мигрирующие сюда по обоим механизмам. Похожие клетки были найдены нами в составе печени эмбриона человека, начиная с 5 недели пренатального развития.

Ключевые слова: миокард, нейрофиламенты, клетки крови, миграция, эмбриональное сердце человека.