

**О.Ю.Потоцька
Н.С.Петрук
К.І.Шаповал**

Дніпропетровська державна
медична академія

УДК 616.12-092.9

ПРОЛІФЕРАЦІЯ КАРДІОМІОЦИТІВ В АСПЕКТІ ПРЕНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ КОРОНАРНИХ СУДИН СЕРЦЯ ЛЮДИНИ

Дослідження проведене у рамках науково-дослідної роботи „Аналіз нормального й аномального гістогенезу тканинних компонентів серцево-судинної системи людини та експериментальних тварин” (номер державної реєстрації 0105U007837).

Ключові слова: кардіоміоцити, ендотелій, коронарні судини, проліферативний індекс.

Резюме. Метою наших досліджень було виявлення взаємозв'язку між розвитком коронарних судин міокарда людини та проліферативною активністю кардіоміоцитів. Нами було досліджено 20 сердець ембріонів людини з 4 по 8 тижнів ембріогенезу та 4 плоди людини до 12 тижня пренатального розвитку. Для ідентифікації ендотелію використовували специфічний маркер – CD34, для встановлення проліферативної активності кардіоміоцитів – моноклональні антитіла Ki-67 (MIB-1), окрім того, проводилось визначення віментину з метою виявлення гладких міоцитів, фібробластів, перицитів. Імуногістохімічні реакції проводили з використанням системи візуалізації LSAB. На основі отриманих даних проводили морфометричні дослідження та їх статистичну обробку. В результаті дослідження було встановлено, що максимальна проліферативна активність кардіоміоцитів спостерігалась в момент відсутності клітинних компонентів стінки коронарних судин в міокарді. Натомість, максимальний вміст ендотелію та віментин-позитивних клітин в міокарді супроводжувався мінімальними значеннями індексу проліферації кардіоміоцитів, що дає змогу вважати сумнівним існування позитивного ефекту коронарних судин на активність поділу клітин серцевого м'язу. До того ж зниження активності поділу кардіоміоцитів супроводжувалося підвищенням вмісту коронарних компонентів, що також підтверджує попередні висновки. Це суперечить даним, отриманим під час вивчення аналогічних процесів у мишей, що має бути врахованим під час подальших наукових пошуків.

Надійшла: 13.04.2007

Прийнята: 25.05.2007

Pototskaya O.Yu, Petruk N.S., Shapoval E.I. Proliferation of cardiomyocytes in relation to coronary vessels prenatal development in human heart.

Suumary. The objectives of our exploration were to define the relationship between the cardiomyocytes proliferative activity and coronary vessels development. We have examined 20 embryos from 4 up to 8 weeks of embryogenesis and 4 human foetus up to 12 weeks of prenatal development. For identification of endothelium we used specific marker CD34; for estimation of proliferative activity of cardiomyocytes - monoclonal antibodies Ki-67 (MIB-1); besides, we assigned vimentin for identification of smooth myocytes, fibroblasts and pericytes. Immunohistochemical reactions carried out with using of the system of visualization LSAB. In the consequence of investigations, the highest cardiomyocyte proliferative activity has been seen at the moment of the absence of cellular component of coronary vessels. Furthermore, the highest amount of endothelia and vimentin-positive cells in the myocardium correlated with the lowest values of cardiomyocyte proliferative index. This fact casts some doubt of the positive coronary vessels effect upon division activity of myocardial cells. Furthermore, decrease in myocardiocyte divisions accompanied by the increase of the coronary components, that confirms previous conclusion. This contradicts to the data of similar processes in mice, what must be taken in account in further investigations.

Key words: cardiomyocytes, endothelium, coronary vessels, proliferative index.

Вступ

Ембріогенез серця є надзвичайно актуальною темою наукових досліджень останнього часу, що обумовлено значним відсотком вроджених серцевих аномалій та великою кількістю смертей серед дорослого населення, пов'язаних з порушеннями діяльності серцево-судинної системи (Bhattacharya S. et al., 2006). Більшість останніх є результатом дисфункції коронарного кровообігу, що робить актуальними дослідження в цьому напрямку.

Тривалий час існувала думка про те, що коронарні судини формуються з вип'ячувань стінки основи аорти. Це уявлення було спростоване наприкінці 80-х років серією робіт, які встановили, що коронарне сплетення починає формуватися в субепікарді, а згодом інфільтрує міокард (Bogers A.J. et al., 1989). В подальшому в цій галузі було зроблено багато уточнень, значною мірою пов'язаних з розвитком молекулярної біології.

Натепер відомо, що попередником клітинних компонентів коронарних судин є проепікар-

діальний орган, або поперечна перегородка (у ссавців), яка являє собою тимчасову ембріональну структуру у вигляді ворсинчатого виросту та побудована з мезотеліальних клітин, що походять з печінкового примордіуму. Клітини цієї структури мігрують у напрямку до міокарда, розповсюджуються по його поверхні в краніо-каудальному напрямку та, випластовуючись, утворюють шар епікарду. Значну роль в цьому процесі відіграють молекули адгезії – інтегрини- $\alpha 4\beta 1$ (Lavine J. et al., 2006), а також компоненти позаклітинного матриксу – фібронектини. Синхронізація процесів міграції та узлагодженість діяльності в межах популяції забезпечується щільними контактами клітин між собою та, можливо, з клітинами нервового гребеня, який також бере участь в формуванні компонентів судин міокарда; контакти побудовані з конексинів, специфічних для кардіогенезу – Cx43 $\alpha 1$ (Li W. et al., 2002). Колонізація міокарда мезенхімними клітинами відбувається в два способи: по-перше, шляхом формування клітинних містків, що сполучаються з міокардом, по поверхні яких відбувається міграція; по-друге, в результаті відбрунькування групи мезотеліальних клітин у вигляді пухирців, які, „перепливаючи” перикардіальну порожнину, стикуються із серцем (Nesbitt I. et al., 2006).

Мезенхімні клітини субепікарду, що дають початок коронарним судинам, з'являються або шляхом епітеліо-мезенхімної трансформації (EMT) клітин епікарда (Muñoz-Chápuli R. et al., 2002), або в результаті міграції з поперечної перегородки. Міокард виробляє низку факторів, що визначають характер клітинних перебудов. Так, синтезуючи фактор росту фібробластів (FGF), кардіоміоцити сприяють EMT, результатом якої є утворення субепікардіальних клітин, які в подальшому, занурюючись в міокард, зазнають впливу двох найбільш вагомих регуляторів васкулогенезу – фактору росту судинного епітелію (VEGF) та тромбоцитарного фактору росту (PDGF) (Lavine J. et al., 2006). Під дією першого з них клітини розвиваються у напрямку ендотелію, який, синтезуючи другий регулятор, спрямовує диференціювання наступних клітин в гладкі міоцити, що також використовуються для побудови стінки коронарних артерій. Не дивлячись на те, що на тваринних моделях було вдало індуковано коронарну неоваскуляризацію під впливом FGF2 та VEGFA, клінічні випробування на людях зазнали поразки, що пов'язують з більш складною регуляцією процесу на молекулярному рівні (Lavine J. et al., 2006).

Цікаво, що не всі автори погоджуються з екстракардіальним походженням ендотелію судин міокарда, навіть стверджують про його утворення з ендокарду, наприклад, у мишей (Merki E. et al., 2005), що суперечить більшості новітніх досліджень.

Певні генетичні мутації, що порушують розвиток ендотелію, призводять до пригнічення формування міокарда, що вказує на зв'язок між ци-

ми двома процесами. За результатами певних експериментів на мишах було показано, що потовщення компактного міокарду та розвиток коронарних судин починається одночасно та тісно пов'язані між собою (Bhattacharya S. et al., 2006).

Серед останніх розробок на шляху боротьби із захворюваннями серця необхідно зазначити дослідження здатності до поділу зрілих кардіоміоцитів (Nadal-Ginard B. et al., 2003; Mummery C. L., 2005). Поки що результати досліджень є неоднозначними, але їх загальні висновки свідчать, що навіть за наявності подібної активності у зрілих клітин, навряд чи з її допомогою буде можлива компенсація значних пошкоджень міокарда. Отже, зростає інтерес та актуальність у вивченні регуляції утворення та поділу кардіоміоцитів під час ембріонального розвитку людини.

Мета

Метою наших досліджень було виявлення взаємозв'язку між розвитком коронарних судин міокарда людини та проліферативною активністю кардіоміоцитів на ґрунті вивчення кількісної динаміки в становленні клітинних популяцій міокарда.

Матеріали та методи

Нами було досліджено 20 сердець ембріонів людини від 4 до 8 тижня ембріогенеза та 4 плоди людини до 12 тижня пренатального розвитку. Визначення віку проводили за методиками, описаними Л.І.Фалінім (1976).

Матеріал фіксували в розчині Буена, надалі проводили стандартні процедури проводки та заливки в парапласт. Напівтонкі зрізи фарбували гематоксиліном-еозином. Для ідентифікації клітин ендотелію використовували специфічний маркер – CD34 (Garlanda C. et al., 1997), для встановлення проліферативної активності кардіоміоцитів – моноклональні антитіла Ki-67 (MIB-1), окрім того, проводилось визначення віментину з метою виявлення складових компонентів стінки коронарних судин – гладких міоцитів, фібробластів, перицитів (Balsoni G. et al., 2000). Імуногістохімічні реакції проводили з використанням системи візуалізації LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin).

Морфометричні дослідження проводили згідно з Г.Г.Аванділовим (1990), статистичну обробку результатів – за Г.Ф.Лакінім (1990).

Результати та їх обговорення

Результати кількісного дослідження наведені в діаграмах (рис. 1-4) окремо по кожному з відділів серця. Проліферація кардіоміоцитів в усіх відділах серця на початкових строках дослідження (4 тижень) була максимальною, та в подальшому її темпи зменшувались. Максимальні значення індексу проліферації припадали на компактний міокард проміжної частини лівого шлуночка, мінімальні – на праве передсердя. На 12 тижні розвитку мінімальна проліферація, тобто майже її відсутність, спостерігалась в трабекулярному міокарді обох шлуночків, а максимальна – у компактному міокарді проміжної частини лівого

шлуночка.

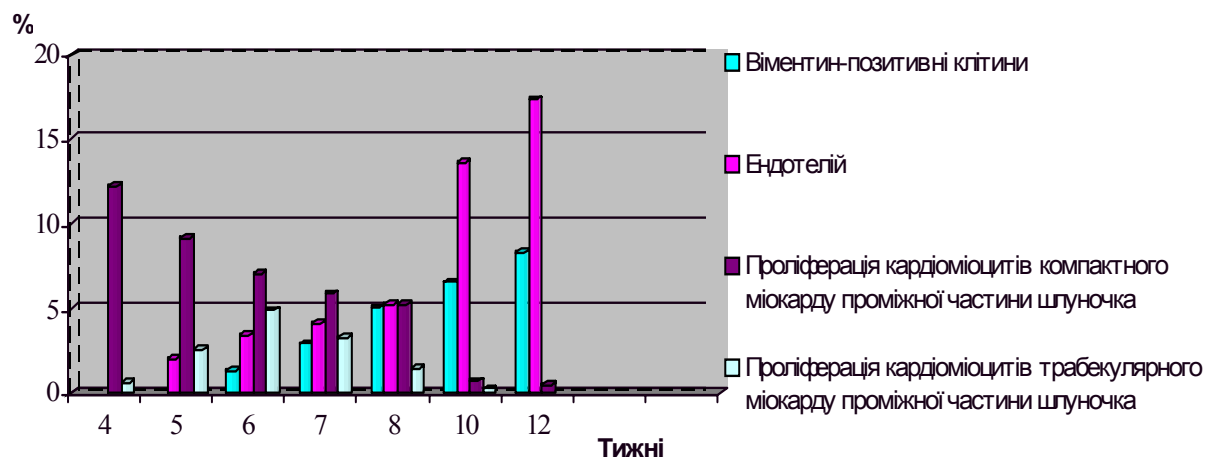


Рис. 1. Динаміка змін параметрів у складі клітинної популяції міокарда правого шлуночка серця людини від 4 до 12 тижня пренатального розвитку.

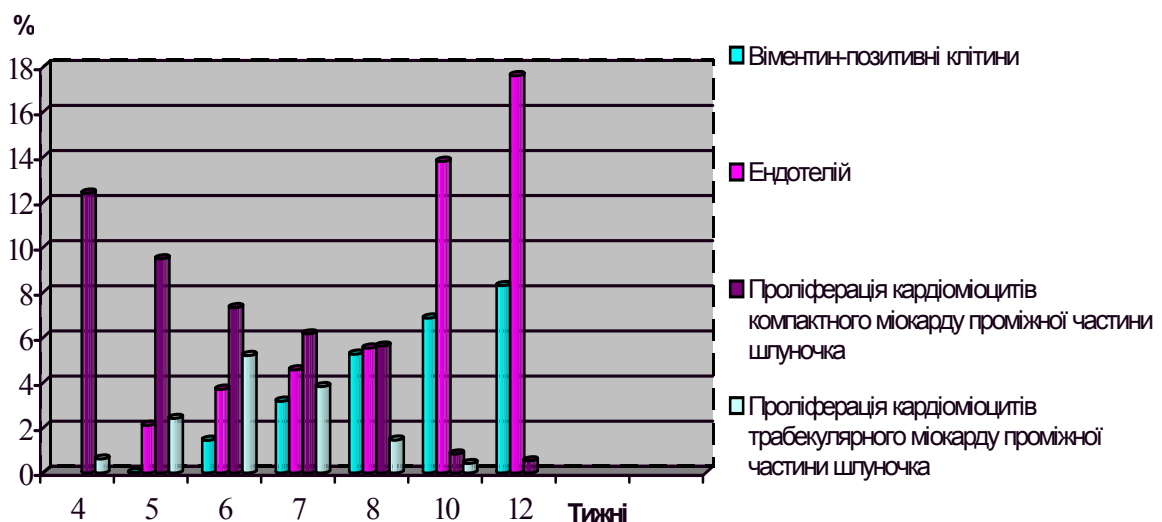


Рис. 2. Динаміка змін параметрів у складі клітинної популяції міокарда лівого шлуночка серця людини від 4 до 12 тижня пренатального розвитку.

Щодо CD34-позитивних клітин, то вони починали визначатися на 5 тижні ембріонального розвитку, з найбільшим показником відносного вмісту у проміжній частині лівого шлуночка та найменшим – у передсердях, де вони були зовсім відсутні. Від 5 до 12 тижня розвитку було відмічено значне зростання кількості цих клітин. На останньому досліджуваному терміні розвитку найбільша кількість ендотелію була зафіксована в проміжній частині лівого шлуночка, найменша – у правому передсерді.

Достовірне збільшення вмісту CD34-позитивних клітин протягом досліджуваних термінів розвитку, як в шлуночках, так і в передсердях, узгоджується з сучасними уявленнями щодо міграції клітин-попередників ендотелію. Між різними відділами шлуночків не відзначалося достовірної різниці у відносному вмісті ендотеліальних клітин, що дає змогу зробити припущення про рівномірне заселення ними цих ділянок міо-

карда. Натомість подібна різниця відзначалася між передсердями та шлуночками; за однакових темпів збільшення відносного вмісту клітин ендотелію в їхніх стінках, різниця залишалася однаковою на кожній з досліджених стадій. Цікаво, що для показників активності проліферації кардіоміоцитів передсердь та шлуночків спостерігалась така ж відмінність, лише з тією різницею, що інтенсивність даного процесу знижувалась. Останнє додатково підтверджує припущення щодо сумнівності позитивного впливу ендотелію на проліферацію кардіоміоцитів.

Кількість віментин-позитивних клітин протягом досліджуваного періоду суттєво зростала; перші клітини визначались на 5 тижні в базальній частині лівого шлуночка, в усіх інших відділах серця були відсутні. На 12 тижні за їх вмістом випереджувала базальна частина лівого шлуночка, найменший вміст відзначався в правому передсерді.

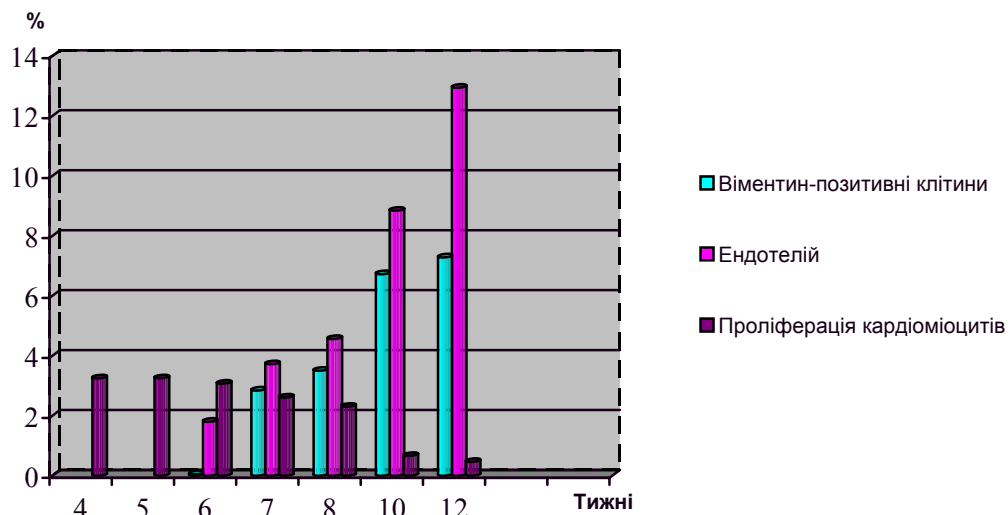


Рис. 3. Динаміка змін параметрів у складі клітинної популяції міокарда лівого передсердя серця людини від 4 до 12 тижня пренатального розвитку.

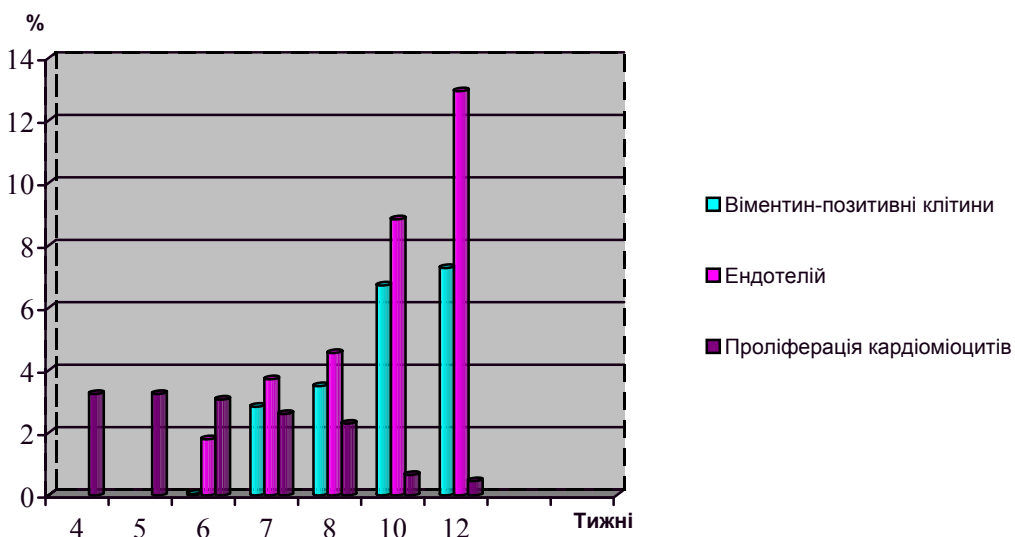


Рис. 4. Динаміка змін параметрів у складі клітинної популяції міокарда правого передсердя серця людини від 4 до 12 тижня пренатального розвитку.

Щодо рівномірності розподілу віментин-позитивних клітин, різницею між їх відносним вмістом в стінці передсердь та шлуночків впродовж досліджуваних стадій розвитку можна зробити такі ж висновки, що і для клітин ендотелію. Зазначена вище обставина узгоджується із гіпотезами про спільне походження та тісний взаємозв'язок між цими клітинними популяціями. Слід також підкреслити, що відносний вміст ендотелію в усіх відділах шлуночків на досліджуваних строках розвитку перевищував такі показники для віментин-позитивних клітин; найменша різниця визначалася на 8 тижні ембріогенезу, а найбільша – на 12 тижні пренатального розвитку. Ці дані відображають відмінність у функціональному призначенні вищезазначених клітин, що мають спільне походження, а також про різні системи регуляції їх чисельності.

Заслужовую на увагу динаміка проліферації

кардіоміоцитів трабекулярного міокарда: на 4 тижні показники були значно меншими за такі в компактному міокарді, надалі спостерігалось їх зростання з максимальним значенням на 6 тижні, після якого відмічалось поступове зменшення до 12 тижня. Але ці зміни не демонстрували кореляції з вмістом ендотелію та віментин-позитивних клітин, тому подальшому аналізу не підлягали.

Підсумок

Від 4 до 12 тижня пренатального розвитку відбувається поступове зниження проліферативної активності кардіоміоцитів на фоні зростаючого відносного вмісту ендотелію та віментин-позитивних клітин в міокарді, що не суперечить даним інших дослідницьких груп про позитивний вплив тканини міокарда на розвиток коронарного сплетення серця. Але подібна залежність поділу клітин міокарда від кількості в ньому клітинних компонентів коронарних судин у серці людини

ставити під сумнів наявність позитивного впливу ендотелію та інших компонентів судинної стінки на проліферацію кардіоміоцитів. На підтвердження цього висновку свідчить той факт, що максимальна проліферативна активність кардіоміоцитів припадала на момент відсутності ендотелію та віментин-позитивних клітин у стінці серцевого м'яза, і навпаки, максимальний вміст клітинних компонентів коронарних судин супро-

воджувався найнижчою проліферативною активністю серцевих міоцитів в усіх вивчених відділах серця.

Перспективи подальших розробок

У подальшому доцільно більш детальне вивчення взаємодії клітин міокарда під час кардіогенезу на молекулярному рівні з метою розробки таргетної терапії при захворюваннях серця.

Літературні джерела

Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство.- М.: Медицина, 1990.- 384 с.

Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов.- 4-е изд., переработанное и дополненное.- М.: Высшая школа, 1990.- 352 с.

An essential role for connexin43 gap junctions in mouse coronary artery development / Li W., Waldo K., Linask K. et al. // Development.- 2002.- Vol.129.- P.2031-2042.

Balsoni G., Spanguolo R., Dejana E. Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells // Vasc. Biol.- 2000.- Vol. 27.- P.1443-1451.

Bhattacharya S., Macdonald S., Cassandra R. Molecular mechanisms controlling the coupled development of myocardium and coronary vasculature // Clinical Science.-2006.-Vol. 111.- P.35-46.

Cellular Precursors of the Coronary Arteries / Muñoz-Chápuli R., González-Iriarte M., Carmona R. et al. // Tex. Heart. Inst. J.- 2002.- Vol.29.- P.243-249.

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.

Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? / Bogers A., Gittenberger-de Groot A., Poelmann R. et al. // Anat. Embryol.- 1989.- Vol.180.- P.437-441.

Epicardial retinoid X receptors is required for myocardial growth and coronary artery formation / Merki E., Zamora M., Raya A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci.- 2005.- Vol.102.- P.18455-18460.

Epicardial Development in the Rat: A New Perspective / Lemley, Davis J., Michael J. et al. // Cambridge University Press.- 2006.- Vol.12.- P.390-398.

Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development / Lavine J., Andrew C., Changwon P. et al. // Genes and development.- 2006.- Vol.20.-P.1651-1666.

Mummery C.L. Cardiology: solace for the broken-hearted? // Nature (London).- 2005.- Vol.433.- P.585-587.

Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure // Circ. Res.- 2003.- Vol.92.- P.139-150.

Потоцкая О.Ю., Петрук Н.С., Шаповал Е.И. Проліферація кардіоміоцитів в аспекте пренатального розвитку коронарних судин серця.

Резюме. Целью наших исследований было установление взаимосвязи между развитием коронарных сосудов сердца человека и пролиферативной активностью кардиомиоцитов. Нами было исследовано 20 эмбрионов человека с 4 по 8 неделю эмбриогенеза и 4 плода человека до 12 недели пренатального развития. Для идентификации эндотелия использовали специфический маркер – CD34; для вычисления пролиферативной активности кардиомиоцитов – моноклональные антитела Ki-67 (MIB-1); кроме того, проводилось определение виментина с целью идентификации гладких миоцитов, фибробластов, перицитов. Иммуногистохимические реакции проводили с использованием системы визуализации LSAB. На основании полученных данных проводили морфометрические исследования и их статистическую обработку. В результате исследования было установлено, что максимальная пролиферативная активность кардиомиоцитов наблюдалась в момент отсутствия клеточных компонентов стенки коронарных сосудов в миокарде. Кроме того, максимальное содержание эндотелия и виментин-позитивных клеток в миокарде сопровождалось минимальными значениями индекса пролиферации кардиомиоцитов, что дает основания считать сомнительным существования позитивного влияния коронарных сосудов на активность клеточного деления миокарда. К тому же, снижение активности деления кардиомиоцитов сопровождалось повышением содержания коронарных компонентов, что также подтверждает предыдущие выводы. Это противоречит данным, полученным во время изучения подобных процессов у мышей, что должно быть учтено при дальнейших научных изысканиях.

Ключевые слова: кардиомиоциты, эндотелий, коронарные сосуды, пролиферативный индекс.