

## ЛІМФАНГІОГЕНЕЗ В СЕРЦІ ПЛОДІВ ЛЮДИНИ

ДЗ «ДМА МОЗ України» (м. Дніпропетровськ)

yalenka@i.ua

Дослідження виконано у рамках науково-дослідницької роботи кафедри анатомії людини «Розвиток та становлення органів та тканин експериментальних тварин та людини в онтогенезі у нормі та під впливом зовнішніх чинників», № державної реєстрації 0112U002124.

**Вступ.** Розвиток репродуктивних технологій потребує всілякого та всебічного розуміння майже усіх ембріональних подій, зокрема, що має особливу зосередженість, формування та розвиток серцево-судинної системи. До цього часу окремими шляхами проводились дослідження, присвячені розвитку цілісного ембріона та стовбурових клітин [1,2]. Сучасний погляд, а саме об'єднання зусиль кардіоембріологів та дослідників стовбурових клітин дозволить нам краще зрозуміти події, які відбуваються в ембріональному серці в нормі та при формуванні вроджених вад серця [4]. Окремим напрямком, що потребує розуміння ембріональних механізмів васкулогенезу та кардіогенезу, є стратегії у лікуванні інфаркту міокарду, а саме пошук та ідентифікації молекулярних сигналів та стимулюючих факторів, які приймають участь в серцево-судинному розвитку [5,10].

Прийнято вважати, що похідні клітини епікарду є попередниками гладко-м'язових клітин, фібробластів, перичитів та кардіоміоцитів. Але чи є похідні клітини епікарду джерелом клітин ендокарду вінцевих судин на сьогодні залишається спірним питанням. Дослідження [6,9] надали доказів щодо походження ендокардіальних клітин вінцевих судин від клітин похідних епікарду. Але ці результати спростовують знахідки отримані [8], щодо походження цих клітин від мігруючої популяції клітин ембріональної печінки. Також не виключається можливість походження ендокардіальних клітин вінцевих судин шляхом інвагінації внутрішнього шару стінки серця – ендокарду [11].

Все більше в літературі приділяється увазі роль лімфатичної системи серця при його патологічних станах, зокрема при інтраміокардіальному склерозі [3,7]. Для кращого розуміння функцій лімфатичної системи серця в вінцевій циркуляції дослідники вивчають пренатальний період.

Формування лімфатичної системи серця в пренатальному кардіогенезі в останні часи було недостатньо висвітлено у зв'язку з відсутністю специфічних до лімфатичного ендотелію біомаркерів.

**Метою роботи** було вивчення особливостей будови лімфатичної системи серця у плодів людини.

**Об'єкт і методи дослідження.** Для реалізації мети нашої роботи були досліджені серця плодів

людини з 9-го по 32-й тиждень пренатального періоду розвитку. 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. Дослідження проведено з дотриманням основних біоетичних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964–2008 рр.), а також наказу МОЗ України №690 від 23.09.2009 р.

Отриманий вологий матеріал занурювали у 10% розчин нейтрального забуференого формаліну терміном на 24 години з метою фіксації та стабілізації клітино-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 мікротомі та забарвлювали гематоксиліном–еозином. Після отримання мікропрепаратів оцінювали їх з метою подальшого імуногістохімічного дослідження. Для цього були використані первинні моноклональні антитіла, а саме фактор транскрипції Prox-1 та маркер проліферації клітин Ki-67. Для ідентифікації реакції наносили розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду, який проявлявся у вигляді насичено коричневого забарвлення чутливих клітин стінки серця. Рівень експресії білків Prox-1 та Ki-67 оцінювали шляхом математичного визначення відсотка імунопозитивних клітин від загальної кількості гістологічно ідентифікованих клітин (в середньому 150-300), підрахованих у 5 випадково обраних полях зору мікроскопа. Морфометричні параметри обробляли за допомогою статистичних методів з використанням стандартних формул з визначенням середнього, помилки середньоарифметичної та t-критерію при порівнянні середніх величин.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Розкриття питань щодо механізмів розвитку та становлення різних ланок судинних компонентів серця, особливо лімфатичного сегменту вінцевої системи залежало від методів ідентифікації ендотеліальних лімфатичних клітин. Застосування ін'єкційних способів виявлення лімфатичних судин, електроно-мікроскопічних методів, скануючої електроно-

мікроскопії не дозволяло дослідникам в достатньому обсязі висвітлити дані щодо приналежності судин до лімфатичної системи, їх топології та гісто-функціональних особливостей на етапах пренатального кардіогенезу. З появою нових більш чутливих лімфатичних маркерів з'явилася можливість ідентифікації ендотеліальних лімфатичних клітин на ранніх етапах пренатального періоду.

В нашому дослідженні, використовуючи досить новий імуногістохімічний маркер лімфатичного ендотелію Prox-1, були простежені в серцях у плодів людини деякі морфологічні інтраміокардіальні особливості лімфатичних судин.

Відомо, що елементи лімфатичної судинної сітки з'являються після розмежування артеріального та венозного сегментів. Починаючи з 6-го тижня ембріогенезу в ділянці аорти та легеневого стовбура у відповідності до літературних джерел [11] були ідентифіковані скупчення ендотеліоцитів, які за своїми характеристиками відрізнялися від артеріальних та венозних. Розвиток та поява лімфатичного русла, на наш погляд, були обумовлені розшаруванням венозного ендотелію та формуванням венозних судин з базальною мембраною та лімфатичних судин без неї.

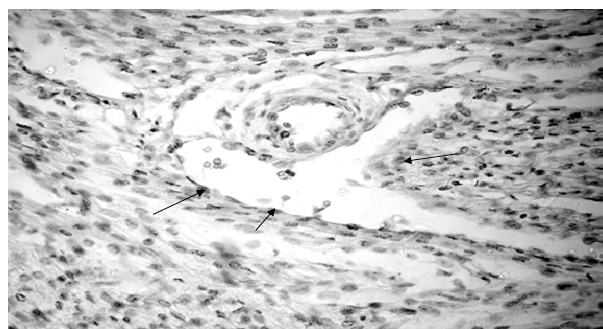
Реєстрація експресії білка Prox-1 в міокарді плодів людини дозволила нам детермінувати лімфатичні ендотеліальні клітини, які формували досить численні судинні сплетення поряд з артеріальними інтрамуральними судинами (рис. 1).

Лімфатичні інтраміокардіальні судини (лімфокапіляри) на гістологічних зрізах виглядали у вигляді сліпих карманів та рукавів з широкими просвітами. Топологічна близькість стінок лімфокапілярів зі стінками артеріальних судин має функціональне значення для забезпечення, на наш погляд, дренажної функції лімфатичної системи серця при скороченнях кровоносних судин.

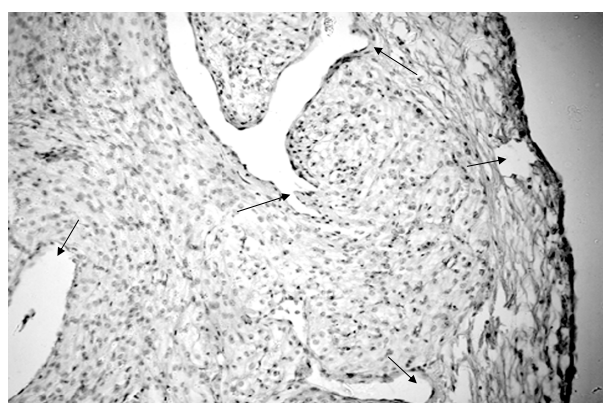
У порівнянні з артеріальними та венозними судинами лімфатичні судини відрізнялися за цілою низкою морфологічних характеристик. Вони мали значно більшу площу просвіту, овально-видовжену форму та розташовувалися у вигляді розгалуженої системи трубок. В залежності від локалізації судинний просвіт та форма лімфатичних капілярів змінювалися. Лімфатичні судини в товщі міокарду склалися з лімфокапілярів, які мали різний діаметр, капілярних сплетень та дренажних лімфатичних судин (рис. 2).

Рівень експресії білків транскрипції (Prox-1) та проліферації (Ki-67) в міокарді плодів людини упродовж досліджуваних термінів пренатального періоду мав не тільки топологічні але й хронологічні відмінності (табл.).

**Висновок.** Незважаючи на досить велику кількість досліджень, присвячених молекулярним та функціональним характеристикам судинного ендотелію, ще недостатньо відомо про механізми, які контролюють диференціювання та функцію лімфатичних судин. За нашими даними лімфосудини були розташовані як в субепікардіальному просторі, інтраміокардіально, так і субендокардіально. Причому в залежності від локалізації лімфо судини мали



**Рис. 1.** Стінка правого шлуночка серця плода людини віком 20 тижнів. Реакція клітин лімфатичного ендотелію з маркером Prox-1. 36. x400.



**Рис. 2.** Стінка правого передсердя серця плода людини віком 22 тижні. Реакція з маркером Prox-1. 36. x100. Стрілками вказані лімфатичні судини.

Таблиця

### Рівень експресії білків Prox-1 та Ki-67 у плодів людини

Відділ серця	Prox-1, M ± m	Ki-67, M ± m
ПШ	24,2% ± 1,3%	45,1% ± 2,3%
ЛШ	*45,7% ± 2,2%	*22,2% ± 0,8%

**Примітка:** \* відмінності між лівим та правим шлуночками достовірні на рівні P ≤ 0,05.

регіональні відмінності. Що стосується специфічності судинних ланок в кінці ембріонального періоду, то вже чітко відокремлювалися артеріальні судини в субепікардіальному відділі стінок передсердь та шлуночків. Використовуючи в якості специфічного ендотеліального маркера білок транскрипції Prox-1 в кінці 8-го тижня ембріонального періоду та упродовж плідного періоду вже можна було провести межу між венозним та лімфатичним ендотелієм. Проліферативні процеси в міокарді правого шлуночка у порівнянні з лівим були значно активніші, що підтверджується рівнем експресії Ki-67, а в той же час детермінація судинних елементів, зокрема лімфатичного компонента домінувала в лівому шлуночку (рівень експресії Prox-1 достовірно був більше у порівнянні з правим шлуночком).

**Перспективи подальших досліджень.** В подальшому планується вивчення встановлених закономірностей будови лімфатичного русла серця в постнатальному періоді.

**Література**

1. AL–Rawi M. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis / M. Al–Rawi, R. E. Mansel, W. G. Jiang // *Eur J Surg Oncol.* – 2005. – Vol. 2. № 31. – P. 117– 121.
2. Baluk P. Markers for microscopic imaging of lymph angiogenesis and angiogenesis / P. Baluk, D. M. McDonald // *Ann N Y Acad Sci.* – 2008. – № 1131:1– 12, doi: 10. 1196/annals. 1413.001.
3. Development of lymphatic vasculature and morphological characterization in rat kidney / M. Tanabe, A. Shimizu, Y. Masuda [et al.] // *Clin. Exp. Nephrol.* – 2012. – Vol. 833– 42, № 6. – doi: 10.1007/s10157– 012– 0637z.
4. Early cardiac development: a view from stem cells to embryos / P. Van Vliet, S. M. Wu, S. Zaffran, M. Puciat // *Cardiovasc Res.* – 2012. – Vol. 3, № 96. – P. 352 – 362.
5. Kato S. Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers / S. Kato, H. Shimoda, J. RC, M. Miura // *Anat Sci Int.* – 2006. – Vol. 2, № 81. – P. 71– 83.
6. Miller A. J. The grossly invisible and generally ignored lymphatics of the mammalian heart / A. J. Miller // *Med Hypotheses* – 2011 – Vol. 4, № 76. – P. 604– 606. – doi: 10.1016
7. Morphogenesis, structure and properties of lymphatic vessels / A. Ratajska, E. Jankowska– Steifer, E. Czarnowska [et al.] // *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* – 2012. – 66:90112. doi:10 5604/17322693.1020753.
8. Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium– derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization / H. Lie–Venema, I. Eralp, S. Maas [et al.] // *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* – 2005. – Vol. 2, № 282. – P. 120– 129.
9. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos / J. M. P. Pomares, R. Carmona, M. G. Iriarte [et al.] // *Int. J. Dev. Biol.* – 2002. – № 46. – P. 1005– 1013.
10. Smart N. Epicardial progenitor cells in cardiac regeneration and neovascularisation / N. Smart, K. N. Duby, P. R. Riley // *Vascul Pharmacol.* – 2013. – Vol. 3, № 58. – P. 164– 173.
11. Viragh S. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse / S. Viragh, C. E. Challice // *Anat. Rec.* – 1981. – № 201. – P. 157– 168.

**УДК** 618. 29:616. 12:611. 42

**ЛІМФАНГІОГЕНЕЗ В СЕРЦІ ПЛОДІВ ЛЮДИНИ**

**Яковець О. О.**

**Резюме.** Метою роботи було вивчення особливостей будови лімфатичної системи серця у плодів людини. Матеріали серця та фрагменти сердець плодів людини з 9–го по 32–й тиждень пренатального періоду розвитку. Для імуногістохімічного дослідження використовували первинні моноклональні антитіла, а саме Prox–1 і маркер проліферації клітин Ki–67. За нашими даними лімфосудини були розташовані як в субепікардіальному просторі, інтраміокардіально так і субендокардіально. Причому в залежності від локалізації лімфосудини мали регіональні відмінності. Що стосується специфічності судинних ланок в кінці ембріонального періоду, то вже чітко відокремлювалися артеріальні судини в субепікардіальному відділі стінок передсердь та шлуночків. Використовуючи в якості специфічного ендотеліального маркера білок транскрипції Prox–1 в кінці 8–го на початку 9 тижня ембріонального періоду та упродовж плідного періоду вже можна було провести межу між венозним та лімфатичним ендотелієм.

**Ключові слова:** Prox– 1, Ki–67, лімфосудини, серце плодів, людина.

**УДК** 618. 29:616. 12:611. 42

**Лимфангиогенез в сердце плодов человека.**

**Яковец Е. А.**

**Резюме.** Целью работы было изучение особенностей строения лимфатической системы сердца плодов человека. **Материалы** сердца и фрагменты сердец плодов человека с 9–ой по 32–ю неделю пренатального периода развития. Для иммуногистохимического исследования использовались первичные моноклональные антитела, а именно Prox–1 и маркер пролиферации клеток Ki–67. По нашим данным лимфатические сосуды были расположены как в субэпикардиальном пространстве, интрамиокардиально так и субэндокардиальное. Причем в зависимости от локализации лимфасосуды имели региональные отличия. Что касается специфичности сосудистых цепей в конце эмбрионального периода, то уже четко отделялись артериальные сосуды в субэпикардиальном отделе стенок предсердий и желудочков. Используя в качестве специфического эндотелиального маркера белок транскрипции Prox–1 в конце 8–й и начале 9 недели эмбрионального периода, а также на протяжении плодного периода уже можно было провести грань между венозным и лимфатическим эндотелием.

**Ключевые слова:** Prox– 1, Ki–67, лимфососуды, сердце плода, человек.

**UDC** 618. 29:616. 12:611. 42

**Limfoangiogenesis in the heart of the human fetus**

**Yakovets O. O.**

**Abstract.** The objective of this research is to investigate the features of the heart lymphatic system structure in the human fetuses.

*Materials and methods of research.* For the purpose of objective fulfillment we examined the hearts of the human fetuses (from 9 to 32 week of the prenatal development period). We received the hearts of the human

fetuses and heart fragments in the gynecology departments of the Dnipropetrovsk Municipal Clinical Hospital No. 2 and Municipal Clinical Hospital No. 9, in the department of morbid anatomy of the Regional Children Hospital in accordance with current laws and regulations. Besides we used the archival materials stored in these institutions. The wet material has been immersed in a 10% neutral buffered formalin solution for a period of 24 hours for the purpose of fixation and stabilization of the cellular tissue structures. The preparation of specimens in alcohol for the morphological examination has been done after fixation according to the standard procedure. After preparation the specimens were embedded in paraffin. The slices 5 – 7  $\mu\text{m}$  in thickness have been done using microtome and colored by hematoxylin and eosin. Following that microscopic specimens have been examined for the purpose of the further immune histochemical study. With this aim in view we used the primary monoclonal antibodies, especially Prox-1 transcription factor and Ki-67 marker for the cellular proliferation. For the reaction identification we used 3-diaminobenzidine tetrachloride chromogen solution, which was evident as the intense brown coloration of sensory cells of the wall of the heart. The pattern of Prox-1 and Ki-67 proteins expression has been examined by means of mathematical definition of the percentage of immunopositive cells of the total number of histologically identified cells (150-300 at the average) calculated in 5 randomly chosen microscope's fields of view. The morphological parameters have been processed using statistical methods by applying the standard formulas with determination of average, arithmetic mean error and t-criterion at the comparison of means.

*Research results and discussion.* The exploration of issues in regard to the mechanisms of development and generation of different elements of the vascular components of the heart, especially lymphatic segment of the coronary system, depended on the methods of endothelial lymphoid cells identification. The application of injection techniques for identification of lymphatic vessels, electron-microscopic analyses and scanning electron microscope investigation does not let the scientists deal adequately with data in respect of belonging vessels to the lymphatic system, their topology and histo-functional features at the stages of prenatal cardiogenesis. With the appearance of new more sensitive lymphatic markers it is become possible to identify endothelial lymphoid cells at the early stages of perinatal period. In our research because of the application of the new immunohistochemical marker for lymphatic endothelial cells Prox-1, we observed some morphological intramyocardial features of lymphatic vessels in the hearts of the human fetuses. It has been established that the elements of lymphatic vasculature reveal themselves after division of arterial and venous segments. In accordance with the sources of literature, beginning from the 6<sup>th</sup> week of embryogenesis, accumulations of endotheliocytes are identified in the section of aorta and main pulmonary artery. These endothelial cells differ from arterial and venous cells by their characteristics. We are of the opinion that development and occurrence of the lymphatic bed are due to stratification of the venous endothelium and formation of the venous vessels with basal membrane and lymphatic vessels without basal membrane. Registration of Prox-1 protein expression in the myocardium of the human fetuses let us determine the endothelial lymphoid cells, which formed numerous blood vessel plexuses near arterial intramural vessels (Figure 1). Lymphatic intramyocardial vessels (lymph capillary vessels) at the histological samples looked like blind pockets and channels with wide lumens. We are of the opinion that topological nearness of the walls of the lymph capillary vessels to the walls of the arterial vessels has functional value for the provision of the drainage function of the lymphatic system of the heart during contraction of the blood vessels. In comparison with arterial and venous vessels, lymphatic vessels were different according to a wide range of morphological characteristics. They had a far greater luminal area, oblong oval form and located in the form of ramified system of the tubes. Vessel lumen and form of lymph capillary vessels changed depending on localization. Lymphatic vessels within interior myocardium consisted of lymph capillary vessels which had different diameter, plexuses of capillary vessels and draining lymphatic vessels. The expression pattern of the proteins regulating cell transcription (Prox-1) and proliferation (Ki-67) in the myocardium of the human fetuses throughout the terms of the prenatal period under investigation had not only topological but chronological differences.

*Conclusion.* Despite the fairly large number of researches devoted to molecular and functional characteristics of the vascular epithelium, we have insufficient evidence on the mechanisms, which control differentiation and function of the lymphatic vessels. According to our sources lymphatic vessels were located in subepicardial area, in intramyocardial segment and in subendocardial segment. Lymphatic vessels had regional differences depending on their localization. With respect to specificity of the vessel components at the end of the embryonic period, the clear distinction of the arterial vessels in the subepicardial segment of the walls of atria and ventricles was evident. When using the protein regulating cell transcription (Prox-1) as the specific endothelial marker at the end of the 8<sup>th</sup> week of the embryonic period and throughout the fetal period, it was possible to demarcate venous endothelium from lymphatic endothelium. Proliferation processes were more active in the myocardium of the right ventricle in comparison with the left ventricle, which is confirmed by Ki-67 expression level; at the same time determination of the vessel elements, especially lymphatic component, was prevalent in the left ventricle (It is reliably known that Prox-1 expression level was more active in comparison with the right ventricle).

**Keywords:** Prox-1, Ki-67, lymphatic vessels, fetal heart, human.

Рецензент – проф. Шерстюк О. О.  
Стаття надійшла 05. 03. 2015 р.