

Сілкина Ю.В.

МІГРАЦІЙНА АКТИВНІСТЬ КЛІТИН ПРОВІДНОЇ СИСТЕМИ ЕМБРІОНАЛЬНОГО СЕРЦЯ ЛЮДИНИ

Дніпропетровська державна медична академія

Вступ

Гістогенетичні процеси, які відбуваються у період кардіогенезу, мають чітку послідовність та регулюються шляхом експресії сигнальних білків, синтезуємих як самими клітинами, так і клітинами інших популяцій, інших органів та систем. Пошукові реакції, які ембріональна клітина виконує в рамках реалізації її гістогенетичної програми, носять спрямований характер та чітко запрограмовані. Наприклад, набуття міграційної активності клітинами-дериватами епікарду, клітинами нервового гребеня у міокарді людини стає можливим завдяки динаміці експресії поверхневих глікокон'югатів на їхніх мембранах.

Перебіг міграційних процесів, метою яких є закладка морфологічної основи структурних компонентів серця, може відбуватися за двома механізмами: шляхом формування на поверхні мігруючих клітин молекул адгезії з подальшим контактом їх із протеїнами міжклітинного матриксу та поступового пересування з утворенням псевдоподій на передньому краї, або за механізмом дисемінації нефіксованих клітин (Bershadsky, 1997). Незалежно від способу, процес міграції відбувається в умовах присутності активного кисню у міграційних зонах. Накопичення ж антиоксидантів, яке може бути наслідком апоптозних процесів, навпаки пригнічує міграцію і виступає у ролі індуктора процесів диференціювання (Лакомкін, 2005). Крім цього, певні глікопротеїни у складі плазмолемі клітин забезпечують зсув її потенціалу у бік зростання адгезійної чи міграційної активності.

За даними літератури відомо, що сіалізація цитолемі сприяє реалізації міграційного потенціалу (Антонюк В. О., 2005) за механізмом пересування клітин по міжклітинному матриксу, а гіперсіалізація – за механізмом дисемінації. Прикладом тому є еритроцити, поверхневу глікокарту яких утворює у більшості глікофорин – глікопротеїн з великим вмістом сілової кислоти (Козинец Г.И. та др., 2007). Також малігнізовані клітини,

які набувають здатності до метастазування, характеризуються саме гіперсіалізованістю поверхні, що дозволяє їм успішно долати лейкоцитарний кордон (Галич І.П., Евтушенко Н.В., 2003).

Пошук даних, які стосувалися б механізмів міграції клітин серця, виявив незначну їх кількість і у більшості знайдені роботи були присвячені міграції клітин нервового гребеня (НГ) у аспекті встановлення, по-перше, власне факту присутності цих клітин у серці, а, по-друге, їхній локалізації у різних структурах без бажаного дослідження зміни вуглеводних детермінант міграції-адгезії клітин і, у першу чергу, клітин провідної системи.

Саме тому, метою нашого дослідження було вивчення міграційного та адгезійного потенціалів клітин провідної системи ембріонального серця людини шляхом визначення кількісних та якісних характеристик їхнього глікокаліксу.

Матеріал та методи

Були досліджені серця ембріонів та плодів людини у строк від 4 до 12 тижнів гестації. Матеріал збирали у гінекологічних відділеннях та патолого-анатомічних бюро м. Дніпропетровська. 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 ін., 2007). Були застосовані традиційні гістологічні та лектиногістохімічні методики обробки матеріалу з використанням наступних лектинів: лектин виноградної слимаки (HPA) (специфічний до залишків N-ацетил-D-галактозаміну), лектин арахісу (PNA) (специфічний до термінальних залишків β-D-галактози), лектин зародків пшениці (WGA) (специфічний до залишків N-ацетил-D-глюкозаміну та N-ацетил-нейрамінової кислоти). Інтенсивність лектиногістохімічної реакції була від світло- до темнокоричневого кольору. Контроль специфічності реакції оцінювали шляхом виключення діамінобензидину зі схеми об-

робки препаратів (Луцик А. Д. и др., 1989). Інтенсивність зафарбовування 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 обговорення

Дослідження характеристик розподілу лектинів у міокарді ембріонів та плодів людини виявило неоднорідність їхньої експресії, а також гетерогенність накопичення у різних ділянках серця.

На 4 тижні гестації рецептори до НРА спостерігалися лише у поодиноких клітинах трабекул загального шлуночка. PNA мав позитивну реакцію з клітинами епікарду передсердь та ендокардіальних подушок загального атріо-вентрикулярного каналу (АВК). Рецептори до WGA розподілялися на клітинах примітивного ендокарду, епікарду, ендокардіальних подушок та в області дорсальної стінки АВК.

Відомо, що дорсальна стінка АВК та ендокардіальні подушки є місцями заселення клітин нервового гребеня. Останні мігрують в серце за першим механізмом, тобто шляхом пересування по міжклітинному матриксу. За даними деяких джерел WGA є маркером клітин НГ, які мають відносно велику кількість сіалоглікокон'югатів на своїй поверхні з метою саме реалізації міграційного потенціалу.

5 тиждень ембріонального розвитку характеризувався збільшенням експресії рецепторів до всіх досліджуваних лектинів. Так, лектин виноградного слимака мітив рецептори на клітинах міжшлуночкової перегородки, що зростає (в області первинного міжшлуночкового отвору), клітини АВ-борозни, що формується, а також клітини компактного міокарда верхівки серця. Експресія PNA спостерігалася в деяких клітинах зони венозного синуса та ендокардіальної поверхні АВ-подушок. Найбільш вираженою була реакція з лектином зародків пшениці, яка спостерігалася в тих самих зонах, що і на попередньому досліджуваному строку.

Динаміка змін рівня експресії рецепторів до використаних у дослідженні лектинів була добре помітною вже на 7 тижні пренатального розвитку людини. Відбувалося розширення зони маркування лектином НРА в напрямку трабекул шлуночків. Лектин арахісу різко позитивно маркував клітини ендотелію в області овального отвору; також спостерігалася присутність термінальних залишків β -D-галактози на поверхні мезен-

хімних клітин атріо-вентрикулярної борозни. Як і на попередніх стадіях найбільш численими були зони, сформовані клітинами з сіалоглікокон'югатами у складі плазмолемі. Так, WGA-позитивною були зона верхівки та право- і лівошлуночкових поверхонь міжшлуночкової перегородки (МШП), область нижнього краю міжпередсердної перегородки (МПП), а також деякі клітини в області синусно-передсердного вузла (СПВ), що формується. Таким чином, спостерігається тенденція зростання активності експресії вивчених поверхневих глікокон'югатів з динамікою його рівня.

На 8 тижні ембріогенезу людини відбувалося значне зменшення НРА- позитивних клітин: реакція з лектином спостерігалася лише у зоні верхнього полюсу хрестовини серця, а також деякі клітини люмінальних трабекул шлуночків. Подібна тенденція стосувалася і лектину арахіса, рецептори до якого знаходилися у незначній кількості на клітинах ендокарду передсердь та в області АВ-борозни. Експресія на поверхні клітин гліканів із залишками N-ацетил-D-глюкозаміну та N-ацетил-нейрамінової кислоти не змінювала топографічних характеристик, однак зменшувалася в клітинах епікарду та атріо-вентрикулярних подушок.

Міокард людини на 9-12 тижнях розвитку мав певні тенденції, які стосувалися зменшення експресії глікокон'югатів із залишками N-ацетил-D-галактозаміну (лектин НРА), обмеження зони клітин із термінальними залишками β -D-галактози (лектин PNA), які розташовувалися в області МШП. Присутність на плазмолемі вуглеводних детермінант, специфічних до лектину WGA, була характерною для клітин право- та лівошлуночкової поверхонь міжшлуночкової перегородки, деяких клітин в області передсердно-шлуночкового вузла, клітин у складі СПВ, люмінальних трабекул шлуночків; останні експресували вказані рецептори до лектину у більшій кількості, ніж клітини компактного міокарда. Крім того, на 11-12 тижнях знайдені різко позитивні клітини у складі випускного тракту.

Ретельний аналіз зон розподілення специфічних до вивчених лектинів глікокон'югатів на поверхні клітин міокарда людини в період ембріонального та раннього плодового періоду, а також інтенсивності експресії вказаних вище вуглеводних детермінант, дозволив високреслити певні закономірності кількісно-

якісних характеристик структурних складових провідної системи серця (табл. 1).

Як видно з таблиці, клітини СПВ на 5-7 тижнях мають на своїй поверхні немасковані термінальні залишки β -D-галактози, що свідчить про незначну активність у цей період процесів диференціювання клітин. Зменшення експресії вуглеводної PNA-специфічної детермінанти на поверхні різних клітин міокарда за нашими спостереженнями, які підтверджуються і даними літератури, відбувається протягом кардіогенезу симетрично із зростанням активності процесу клітинного диференціювання.

На 7 тижні у структурі СПВ спостерігається найбільша кількість клітин із залишками N-ацетил-D-глюкозаміну та N-ацетилнейрамінової кислоти, після чого відбувається або маскування першого, або пригнічення рівня експресії другого залишку; ми пов'язуємо таку динаміку з активним у цей період процесом інервації цієї зони, яка необхідна для перебігу гістогенетичних процесів

клітин пейспекерного центру. Підґрунтям такої думки є деякі дані літератури, які свідчать про те, що WGA є маркером мігруючих клітин нервового гребеня (R. Poelmann et al., 2004).

Результати інших досліджень (Watanabe M., 1998) вказують на те, що для забезпечення міграційного процесу клітини НГ мають на своїй поверхні так звані NCAM (neural cell adhesion molecule), які містять полісїалові кислоти (PSA). Наступне дослідження, яке планується нами провести з використанням сїалоспецифічного лектину бузини чорної (SNA), допоможе підтвердити (у випадку подібності топології SNA+ ділянок у структурі СПВ) чи спростувати припущення щодо WGA в якості маркеру мігруючих клітин НГ; у разі неспівпадіння топологічних характеристик SNA та WGA можна буде стверджувати про те, що залишки N-ацетил-D-глюкозаміну, до якого специфічний лектин зарешків пшениці, приймають участь у формуванні адгезійних контактів між клітинами (Бутаев А.В. і др., 2001). Отже, літературні джерела на-

ТАБЛИЦЯ 1

РОЗПОДІЛЕННЯ РЕЦЕПТОРІВ ДО ЛЕКТИНІВ НРА, PNA ТА WGA НА КЛІТИНАХ ПРОВІДНОЇ СИСТЕМИ СЕРЦЯ ЛЮДИНИ

Структура	Лектин	Строк гестації (тижні)					
		Інтенсивність реакції з лектином (у балах)					
		4	5	6	7	8	9-12
Синусно-передсердний вузол	HPA	-	-	-	-	-	-
	PNA	-	1	1	1	-	-
	WGA	-	1	1	2	1	1
Передсердно-шлуночковий вузол	HPA	-	1	-	-	-	-
	PNA	-	-	-	1	1	-
	WGA	-	1	1	1	1	1
Передсердно-шлуночковий пучок: передсердна частина	HPA	-	1	2	2	1	-
	PNA	-	-	-	1	1	-
	WGA	-	1	1	2	1	1
	HPA	-	2	2	2	-	-
	PNA	-	-	-	-	2	3
	WGA	-	-	-	2	3	3
Шлуночкова частина	HPA	1	1	2	2	1	-
	PNA	-	-	-	-	-	-
	WGA	-	1	1	1	1	3
Вілокна Пуркінє	HPA	1	1	2	2	1	-
	PNA	-	-	-	-	-	-
	WGA	-	1	1	1	1	3

сичені суперечливою інформацією стосовно цього питання і тому потребують експериментальної перевірки.

Диференціювання клітин ПШВ по термінах «запізнюється», порівняно з синусно-передсердним вузлом, судячи з динаміки експресії PNA. Маніфестація ж позитивної реакції з WGA спостерігалася нами у ті самі строки, що знову таки може бути пов'язано з присутністю у цій зоні клітин-мігрантів НГ. Слід зазначити, що на 5 тижні окремої структурної одиниці «передсердно-шлуночковий вузол» ще не існує, бо ПШВ та ПШП розвиваються з однієї первинної структури – провідної вісі, тому на 5 тижні графі ПШВ та передсердна частина ПШП мають однакові значення інтенсивності реакції з WGA (див. табл. 1).

Передсердно-шлуночковий пучок складається з двох частин, які мають різні лектиногістохімічні характеристики. По-перше, на відміну від центрів провідної системи, клітини обох частин пучка з 5 тижня (передсердна частина є на цьому строку невід'ємною від ПШВ) експресують на своїй поверхні залишки N-ацетил-D-галактозаміну; найактивніше цей процес спостерігається у термін з 5 по 7 тиждень гестації. По-друге, шлуночкова частина ПШП має значно більшу кількість у структурі вуглеводного шару мембрани термінальних залишків β -D-галактози, що свідчить про відставання у швидкості процесів диференціювання клітин цієї ланки провідної системи. Залишки N-ацетил-D-глюкозаміну та, у меншій мірі, N-ацетилнейрамінової кислоти, до яких специфічний лектин WGA, з'являються на поверхні клітин пучка раніше у передсердній його частині, але шлуночкова частина характеризується більшою інтенсивністю реакції, що може бути пов'язано з формуванням системи Гіса-Пуркінє. Ми схилиємося до думки, що експресія глікокон'югатів, тропних до WGA, властива клітинам-похідним НГ, які приймають участь у формуванні пучка Гіса та волокон Пуркінє, але це потребує подальших досліджень.

Клітинна поверхня волокон Пуркінє містить термінальні залишки N-ацетил-D-галактозаміну (HРА), присутність яких властива для тих ланок провідної системи, яким притаманна швидка передача збудження. Експресія цього типу гліканів спостерігалася вже на 4 тижні розвитку у люмінальних трабекулах примітивного шлуночка, зберігаючись до 8 тижня. Є припущення, що відсутність реакції з лектином після 9 тижня гестації

пов'язана з маскуванням залишків в процесі диференціювання клітин або, можливо, зі зниженням їхньої експресії. Характерним було те, що PNA не виявив будь-якої реакції з клітинами волокон Пуркінє, що формуються, протягом досліджуваного періоду. На наш погляд, це пояснюється тим, що до 8 тижня трабекулярний міокард виконує роль провідної системи міокарду стінок шлуночків, а вторинна система проведення, тобто власне волокна Пуркінє, формується шляхом заселення у міокард шлуночків клітин з ніжок ПШП із набуттям у подальшому автономії специфічного диференціювання. Це припущення підтверджується нашими даними з використанням антитіл, а також динамікою різкого зростання з 9 тижня розвитку експресії WGA+ глікокон'югатів.

Таким чином, глибокий аналіз отриманих результатів дозволив зробити наступні висновки:

1. Міграційний потенціал притаманний не всім клітинам провідної системи серця людини: центральна ланка містить клітини з низькою міграційною активністю, периферійну частину формують клітини з високим міграційним потенціалом, який має динаміку зростання після 7 тижня гестації.

2. СПВ та ПШВ не містять на своїй поверхні термінальних залишків N-ацетил-D-галактозаміну (HРА), у той час як клітини пучка, а також клітини первинної (трабекули) та вторинної (волокна Пуркінє) провідної системи шлуночків активно експресують вуглеводну детермінанту у період з 5 по 7 тиждень гестації.

3. СПВ, ПШВ та волокна Пуркінє є PNA-негативними протягом 4-12 тижнів ембріонального розвитку; термінальні залишки β -D-галактози у складі глікокон'югатів плазматичної мембрани присутні лише на клітинах передсердно-шлуночкового пучка та його ніжок.

4. Всі структурні елементи провідної системи містять клітини, що є WGA+. Динаміка експресії відповідних вуглеводних детермінант присутня у клітинах венікулярної ланки, включаючи пучок Гіса та його розгалуження.

Перспективи подальших досліджень. Планується подальше вивчення лектиногістохімічних характеристик клітин провідної системи з використанням лектинів LABA, SNA та інших.

МИГРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА

Силкина Ю. В.

Резюме. Исследованы миграционный и адгезионный потенциал клеток проводящей системы сердца путем определения углеводных детерминант их клеточной поверхности. Использован метод лектиногистохимии с применением лектинов зародышей пшеницы (WGA), лектина арахиса (PNA) и лектина виноградной улитки (HPA). Узлы проводящей системы состоят из клеток с низким миграционным потенциалом. Их цитолемма характеризуется отсутствием на поверхности терминальных остатков N-ацетил-D-галактозамина (HPA), малым количеством терминальных остатков β-D-галактозы и не-которым количеством нейраминной кислоты. Пучок Гиса и волокна Пуркинье формируются из клеток, имеющих высокий миграционный потенциал с 7 по 12 неделю, благодаря большому количеству сиаловых кислот на своей поверхности. Терминальные остатки β-D-галактозы в составе гликокаликса присутствуют лишь на клетках предсердно-желудочкового пучка.

Ключевые слова: лектины, проводящая система, сердце человека.

MIGRATION ACTIVITY OF THE CELLS OF CONDUCTIVE SYSTEM IN THE EMBRYONAL HUMAN HEART

Silkina Yu. V.

Summary. Migration and adhesion properties of the cells of conductive system were investigated. We used the lectin-receptors for WGA, HPA, PNA for establishment glycoconjugates on cell-surface, particularly their sugar side chains. The nodes of conductive system have low migration potencial. Their cell-surface doesn't have HPA-associated glycoconjugates, contains some PNA- and WGA-receptors. The development of system His-Purcinje is result of migration of cells during 7-12 week of prenatal period, that is because they have a lot of sialic acid on cell-surface. Only atria-ventricular bundle has the cells with β-galactosylated glycoconjugates.

Key words: lectin, conductive system, human heart.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонюк В. О. Лектины та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк. — Львів: Кальварія, 2005. — 554 с.
2. Электрический заряд клеток крови / Г. И. Козинец, О. В. Попова, М. И. Будник [и др.]. — Изд-во: Практическая медицина, 2007. — 208 с.
3. Галич И. П. Изменение гликозилирования при онкогенезе и развитии других патологических процессов / И. П. Галич, Н. В. Евтушенко // Он-кология. — 2003. — Т. 5, № 1. — С. 4–9.
4. Дотримання етичних та законодавчих вимог при виконанні наукових морфологічних досліджень: методичні рекомендації / [В. Л. Кулінічен-ко, В. Д. Мішалов, Ю. Б. Чайковський та ін.]. — К., 2007. — 29 с.
5. Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцик, Е. С. Детюк, М. Д. Луцик; под ред. Е. Н. Шенасюка. — Львов: Выща шк. [изд-во при Львов. Ун-те], 1989. — 144 с.
6. The neural crest is contiguous with the cardiac conduction system in the mouse embryo: a role in induction? / R. Poelmann, M. Jongbloed, D. Molin [et al.] // Anat. Embryol. — 2004. — Vol. 208, № 5. — P. 389–393.
7. Watanabe M. The Neural Cell Adhesion Molecule and Heart Development: What is NCAM Doing in the Heart? / Michiko Watanabe // Basic Appl. Myol. — 1998. — Vol. 8, № 4. — P. 277–291.
8. Бутаев А. В. Определение рецепторов к лектину завязи пшеницы (WGA) в опухоли у больных раком желудка / А. В. Бутаев, Н. А. Волошин, А. И. Згурский // Экспер. онкол. — 2001. — № 4. — С. 56–61.