

УДК 611.013:611.018.74:611.12

О.О. Яковець, С.В. Козлов, О.Г.Есаулов, В.Г. Рутгайзер, В.І. Великородний  
ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України", м. Дніпро

## ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОГО МАРКЕРА CD31 В СЕРЦІ ПЛОДІВ ЛЮДИНИ

**Резюме.** В роботі за результатами імуногістохімічного, морфометричного досліджень судинного ендотелію в серці 21 плодів людини 18-24 тижнів гестації встановлені топологічні відмінності в просторовому розподілі судинних елементів в передсердях та шлуночках. Враховуючи вибіркочку специфічність ендотеліального маркера CD 31, нами вперше проведено морфометричний аналіз відносної площі судин в серці плодів людини. Отримані морфологічні дані значно розширюють уявлення про розвиток вільцевої судинної системи в пренатальному періоді онтогенезу.

**Ключові слова:** онтогенез, серце, людина, ангиогенез.

Низка сучасних наукових напрямків в кардіології, зокрема, використання стовбурових клітин при лікуванні ішемічних уражень міокарда, застосування в фармакотерапії серцево-судинних хвороб стимуляторів та інгібіторів ангиогенезу, нерозривно пов'язана з розкриттям молекулярних механізмів формування та розвитку судинного русла серця на етапах пренатального періоду [1-3]. Суттєвим доповненням для розуміння механізмів формування коронарного судинного русла є використання в морфологічному дослідженні молекулярних маркерів васкулогенезу, зокрема маркерів судинного ендотелію [4, 5]. Все це підкреслює актуальність нашого дослідження.

**Мета дослідження:** з'ясувати топологічні особливості та динаміку змін відносної площі коронарного судинного русла у плодів людини.

**Матеріал і методи.** Для реалізації поставленої мети були досліджені серця плодів (21 об'єкт) людини з 18-го по 24-й тиждень пренатального періоду розвитку. Серця плодів людини без уродженої патології були отримані від здорових батьків, що підтверджувалося медичною документацією під час надходження їх в стаціонар. Всі штучні переривання вагітності були проведені за соціальними показниками. Використаний нами матеріал отримували відповідно до існуючих нормативно-правових актів, а також за узгодженням комісії з біомедичної етики ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України". Отриманий фетальний матеріал маркували та занурювали у 10% р-н нейтрального формаліну терміном на 24 години з метою фіксації та стабілізації морфологічних структур. Після фіксації про-

дили проводку морфоматеріалу у спиртах з наступною підготовкою парафінових блоків за стандартною методикою. Забарвлення гістологічних препаратів гематоксиліном та еозином проводили за відомою процедурою. Парафінові зрізи, які витримали у ксилолі тричі впродовж 2 хв, переносилися в 96% спирт. Тричі змінюючи розчин з експозицією 2 хв, занурювали в розчин гематоксиліну з 2-х хв експозицією. До прояви барвника зрізи перебували від 2-х до 5-ти хв в воді температурою 50° С. Витримавши препарати у розчині еозину від 15 с до 2-х хв, переносили їх в 96% спирт. Тричі змінюючи розчин з експозицією 2 хв, розміщували зрізи в карболксилол на 2 хв, одноразово в ксилол з 2-х хв експозицією. Після видалення залишків ксилолу навколо зрізу наносили канадський бальзам і накривали покривільним склом.

Після отримання мікропрепаратів оцінювали їх з метою подальшого імуногістохімічного дослідження з використанням ендотеліального маркера CD 31. Для цього залучали систему візуалізації LSAB2 та EnVision (DacoCytomation) проводили обробку препарату з реагентом упродовж 10 хв з проміжним 3-х разовим промиванням у ТРИС-буферному розчині. В якості хромогена використовували барвник DAB (DacoCytomation).

Гістологічний аналіз усіх зразків аналізували під світловим мікроскопом Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина), ок. W-PI 10\*/23, об. 10, 20, 40. Для фотофіксації використовували фотоапарат Canon PC 1200 Power Shot A640, 10,0 Mega Pixels через Adaptor tube for Canon Soligor A610/620 55mmTele; Wale+ Zeiss 426126. Обробку отриманих мікрофотографій проводили за допомогою

програмного забезпечення AxioVs40 V 4.6.3.0 (Carl Zeiss Imaging Solution GmbH, Німеччина).

Морфометричні дослідження проводили на світлооптичному рівні при 100- та 400-кратному збільшенні в 4-6 полях зору за допомогою окулярної сітки. В гістологічних зрізах підраховували відносну площу коронарного судинного русла. Статистичну обробку отриманих кількісних даних проводили за допомогою комп'ютерних програм. Для об'єктивної оцінки достовірності результатів використовували критерій Ст'юдента. Відмінності порівняно середніх величин вважали достовірними при  $p < 0,05$ .

Дослідження виконано у рамках науково-дослідної роботи кафедри анатомії людини "Розвиток і становлення органів і тканин експериментальних тварин і людини в онтогенезі в нормі і під впливом зовнішніх факторів" (номер державної реєстрації 0112U002124).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Формування судинної циркуляції в міокарді передсердь та шлуночків серця відбувалося ще в ембріональному періоді. Про це свідчив, за даними низки дослідників [6-8], високий ступінь експресії ендотеліальних маркерів в період з 5-го по 8-й тиждень ембріонального розвитку як в трабекулярному, так і в компактному міокарді передсердь та шлуночків серця. Етапи неоваскулогенезу одночасно протікали з активними проліферативними процесами, які проявлялися в клітинах компактного міокарда, про що свідчили в цей період накопичення в них проліферативного маркера Ki-67.

Під час аналізу гістологічних зрізів в серці плодів CD 31 позитивні ендотеліальні клітини розподілялися неоднорідно в різних шарах стінки передсердь та шлуночків. У ділянках компактного міокарда лівого шлуночка, переважно в середньому і внутрішньому шарах, накопичення маркера CD 31 нагадувало розгалужену деревоподібну структуру (рис. 1).

У компактному міокарді правого шлуночка морфологічна картина просторового розподілу експресії CD 31 більш насичена, а судини гемомікроциркуляторного русла мали зменшені за довжиною гілки порівняно з міокардом лівого шлуночка.

У плодовому періоді в міокарді шлуночків серця активні проліферативні процеси супроводжувалися збільшенням кількості кардіоміоцитів у всіх шарах міокарда. За рахунок збільшення їх кількості відбувалося також ущільнення міжклітинних просторів, компактизація міжтрабекулярних ділянок. Поряд з цим все більше детермінувалася судинна система шлуночків серця (рис. 2).

За нашими даними, в міокарді лівого шлуночка детермінація судинних ланок відбувалася в середньому на 2 тиж раніше порівняно з правим шлуночком. Крім хронологічних аспектів можна

було також підкреслити топологічні особливості судинних ланок, які вказували на значно більшу концентрацію елементів судинного русла в міокарді лівого шлуночка порівняно з правим (рис. 3).

Будова судинної системи шлуночків серця в цей період розвитку також зумовлено структурною організацією стінок шлуночків, а саме сформованими шарами м'язових волокон міокарда, компактним розташуванням кардіоміоцитів, архітектурної стабільністю м'язово-сполучнотканинних взаємовідносин. Ці особливості структурної організації були описані і продемонстровані в морфологічних роботах останніх років [9, 10] і наші дослідження є тому підтвердженням.

Проведений морфометричний аналіз просторового розподілу судинних елементів в серці плодів показав наявність топологічних відмінностей показників їх відносної площі. У компактному відділі шлуночків серця відносна площа судин

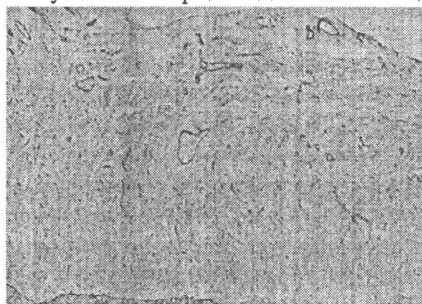


Рис. 1. Гістологічний зріз стінки лівого шлуночка серця плода 18 тиж. Імногістохімічна реакція з CD-31. 3б.  $\times 100$

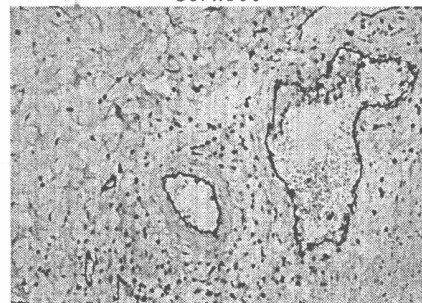


Рис. 2. Гістологічний зріз стінки лівого шлуночка серця плода 22 тиж. Імногістохімічна реакція з CD-31. 3б.  $\times 400$ . На мікрофотографії поперечний зріз артеріальної та венозної судин

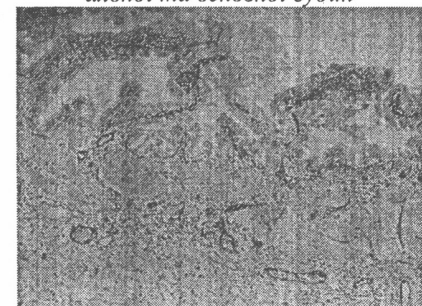


Рис. 3. Гістологічний зріз стінки правого шлуночка серця плода 19 тиж. Імногістохімічна реакція з CD-31. 3б.  $\times 100$

займала 6,5%, тоді ж як в трабекулярних ділянках – майже 17,3%. Аналіз показників відносної площі судин в стінці передсердь виявив відмінності між зовнішнім та внутрішнім шарами міокарда. У зовнішньому шарі міокарда відносна площа судин становила 22,1%, у внутрішньому – тільки 17%.

**Висновок.** Використання ендотеліального маркера CD 31 для оцінки васкуляризації серця у плодів дозволяє значно краще виявляти та ідентифікувати судинні структури на етапах розвитку. Варіабельність розподілу судинного русла в товщі стінок шлуночків та передсердь пов'язана з

динамічними змінами в трабекулярній та компактній ділянках міокарда упродовж онтогенезу. Просторовий аналіз відносної площі судинного русла в серці плодів людини виявив достовірні локальні відмінності. Відносна площа судинного русла в шлуночках серця була менша порівняно з передсерддями у плодів 18-24 тиж.

**Перспективи подальших досліджень.** В подальшому планується провести порівняльний аналіз щодо ступеня експресії ендотеліальних імуногістохімічних маркерів в серці людини в різні терміни пренатального періоду онтогенезу.

#### Список использованной литературы

1. Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in ApoE-deficient mice / B.L. Harri, J.M. Sanders, R.E. Feaver [et al.] // *Arterioscler. Thrombosis and Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28, № 11. – P. 2003-2008.
2. Endothelial Gab1 is crucial for postnatal angiogenesis / J. Zhao, W. Wang, C. Hoon Ha [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* – 2011. – V.31. – P. 1016-1023. doi:https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.224493.
3. Is required in isl1-expressing progenitor cells for cardiovascular development [Electronic resource] / T. Zhang, J. Liu, J. Zhang [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 2. – Access mode: doi:10.1371/journal.pone.0057032.
4. PECAM-1 (CD31) expression modulates bleeding time in vivo / S. Mahooti, D. Graesser, S. Patil [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol. 157, № 1. – P. 75-81.
5. Woodfin A. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology / A. Woodfin, M. B. Voisin, S. Nourshargh // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 2514-2523.
6. FOXF1 Transcription Factor Is Required for Formation of Embryonic Vasculature by Regulating VEGF Signaling in Endothelial Cells / X. Ren, V. Ustiyana, A. Pradhan [et al.] // *Circ. Res.* – 2014. – V. 115, № 8. – P. 709-720. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304382.
7. Matsuda Y. Nestin: A novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis / Yoko Matsuda, Masahito Hagio, Toshiyuki Ishiwata // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – V.19, № 1. – P. 42-48. doi:10.3748/wjg.v19.i1.42.
8. Marcelo K.L. Regulation of Endothelial Cell Differentiation and Specification / Kathrina L. Marcelo, Lauren C. Goldie, Karen K. Hirschi // *Circ Res.* – 2013. – V. 112, № 9. – P. 1272-1287. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300506.
9. Francois M. SoxF genes: key players in the development of the cardio-vascular system / M. Francois, P. Koopman, M. Beltrame // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2010. – Vol. 42, № 3. – P. 445-448.
10. Impact of AT2 receptor deficiency on postnatal cardiovascular development [Electronic resource] / D. Biermann, A. Heilmann, M. Didié [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Access mode: doi:10.1371/journal.pone.0047916.

#### SPECIFICS OF ENDOTHELIAL CD31 MARKER EXPRESSION IN FETAL HUMAN HEART

**Abstract.** In this paper, the results of immunohistochemical, morphometric studies of vascular endothelium in the heart of 21 human fetuses 18-24 weeks gestation set topological differences in the spatial distribution of vascular elements in the ventricles and atria. Given the specificity of selective endothelial marker CD 31, we first held morphometric analysis of the relative area of blood vessels in the heart fruits rights. The obtained morphological data greatly extend the idea of developing coronary vascular system in the prenatal period of ontogenesis.

**Key words:** ontogenesis, heart, man, angiogenesis.

#### ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО МАРКЕРА CD31 В СЕРДЦЕ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

**Резюме.** В работе по результатам иммуногистохимического, морфометрического исследований сосудистого эндотелия в сердце 21 плода человека 18-24 недель гестации установлены топологические различия в пространственном распределении сосудистых элементов в предсердиях и желудочках. Учитывая выборочную специфичность эндотелиального маркера CD 31, нами впервые проведен морфометрический анализ относительной площади сосудов в сердце плодов человека. Полученные морфологические данные значительно расширяют представление о развитии коронарной сосудистой системы в пренатальном периоде онтогенеза.

**Ключевые слова:** онтогенез, сердце, человек, ангиогенез.

State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine" (Dnipro)

Надійшла 19.09.2016 р.  
Рецензент – проф. Олійник І.Ю. (Чернівці)