

**М.А.Машталір
И.В.Твердохлеб**

Днепропетровская государственная медицинская академия

Ключевые слова: гистохимические методы, лектингистохимические методы, иммуногистохимические методы, сердце, эмбриональное развитие.

Надійшла: 05.03.2010
Прийнята: 17.05.2010

УДК 611.12:611.012-02:547.262

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ, ЛЕКТИНГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ СЕРДЦА

Обзор и оригинальные исследования проведены в рамках научно-исследовательских работ «Морфогенез сердца и сосудов после экспериментальных воздействий» (номер государственной регистрации 0106U012193) и «Анализ нормального и аномального гистогенеза тканевых компонентов сердечно-сосудистой системы человека и экспериментальных животных» (номер государственной регистрации 0105U007837).

Резюме. Целью работы было обобщить свои результаты использования гистохимических, иммуногистохимических и лектингистохимических методов на куриных, мышшиных и крысиных зародышах, а также зародышах человека, в эмбриональном исследовании сердца. Метод окрашивания альциановым голубым по Сидмену оказался полезным при выявлении популяции клеток нервного гребня внутри мезенхимных структур сердца для всех изученных видов. При окрашивании по Мак-Манусу в зонах, подверженных активным перестройкам, обнаруживались окрашенные участки внеклеточного матрикса. Лектины WGA, STA, RCA, которые интенсивно связывались с эндотелием сосудов и эндокардом, метили также гибнущие клетки. VAA обнаруживал только апоптотические клетки, SNA – эндокард, эндотелий, мезенхиму стенки крупных сосудов, PFA – эндотелий, эндокард. PSA, LCA выявили конусовидное окрашивание в стенке легочного ствола и аорты человека на 8-11-й неделе. WGA выявил гетероморфность в эндотелии эмбрионального сердца человека на 8-12 неделе. Более интенсивная реакция с этим лектином была характерна для эндотелия, покрывающего трабекулы и сосочковые мышцы желудочков, а также стенки желудочков и предсердий. В области формирования сухожильных хорд реакция с WGA практически отсутствовала. Демонстративность лектингистохимических и иммуногистохимических методов в отношении выявления эндотелия и апоптозов была сопоставимой.

Морфологія. – 2010. – Т. IV, № 2. – С. 39-44.

© М.А.Машталір, И.В.Твердохлеб, 2010

Mashtalir M.A., Tverdokhle I.V. Histochemical, lectin histochemical and immunohistochemical methods in embryological heart researches.

Summary. The purpose of the study was to summarize our results of histochemical, lectin histochemical and immunohistochemical methods for embryonic heart research on chick, mouse and rat as well as human embryo. The alcyan blue **staining** after Stidman proved useful in identifying populations of neural crest cells within the mesenchymal structures of the heart. McManus staining revealed areas of the extracellular matrix in parts of heart which undergo active transformation. Lectins WGA, STA, RCA, which intensively stained vascular endothelium and endocardium, were also the labels for dying cells. VAA revealed apoptotic cells only, SNA - endocardium, endothelium, mesenchyme cells of the large vessels, PFA - endothelium, endocardium. PSA, LCA showed cone-shaped pattern in the wall of pulmonary trunk and aorta of human embryo during 8-11 weeks. WGA staining was heteromorphic in endothelium of embryonic human heart at 8-12 weeks. The more intense reaction was typical in endothelium covering the ventricular and atria walls, as well as the endocardium above trabeculae and papillary muscles of the ventricles. WGA staining in endothelium was practically absent in the area of chordae tendineae during this period. We suggest that the value of immunohistochemical and lectin histochemical methods in identifying the endothelium and apoptotic cells is comparable.

Key words: histochemical methods, lectin histochemical methods, immunohistochemical methods, heart, embryonic development.

Введение

Эмбриональные исследования развития сердца охватывают широкий спектр методик и подходов, включающих классические морфологические (макроскопические, гистологические),

гистохимические, иммуногистохимические, лектингистохимические, биохимические, генетические методы. Благодаря активному использованию новых методов последние годы достигнут существенный прогресс в понимании гистогене-

тических процессов и механизмов органогенеза сердца. Существует ряд ограничений в изучении эмбрионального развития вследствие особенностей состава матрикса и спектра белковых, гликопротеидных и протеогликанных соединений в тканях зародыша. Сложность и многообразие процессов, лежащих в основе кардиогенеза, обуславливают необходимость детальных исследований на разных объектах с дальнейшей экстраполяцией полученных результатов на развитие сердца у человека.

Цель

В этой работе выделяются собственные результаты использования гистохимических, иммуногистохимических и лектингистохимических методов на наиболее распространенных объектах, – куриных, мышинных и крысиных зародышах, а также зародышах человека, - в эмбриологическом исследовании сердца, которые позволили решить ряд вопросов, связанных с механизмами кардиогенеза.

Материалы и методы

Материалом исследования были зародыши кур породы белый леггорн и кросса Cobb 500, зародыши человека, зародыши беспородных белых мышей и крыс на разных стадиях развития. Эмбрионы вынимали, оценивали стадию и подвергали стандартной процедуре фиксации, проводки и заливки в парафин или парапласт. Проводили гистохимическое окрашивание гистологических срезов на кислые гликозаминогликаны по Стивдену, на гликоген и нейтральные гликопротеиды по Мак-Манусу. Для лектингистохимического исследования активности эндогенной пероксидазы устранялась инкубацией срезов с раствором 3% H₂O₂ на метаноле. Сайты неспецифического связывания лектинов блокировали раствором 1% бычьего сывороточного альбумина. После этого проводили инкубацию в течение ночи при +4° С с пероксидазными конъюгатами следующих лектинов: зародышей пшеницы (WGA), семян чечевицы (LCA), коры бобовника анагирилистного (LAL), гороха (PSA), картофеля (STA), икры окуня (PFA), сои (SBA), арахиса (PNA), клещевины обыкновенной (RCAI), коры бузины черной (SNA), омелы белой (VAA). Для выявления активности пероксидазы применялся 0,02% 3,3'-диаминобензидин (DAB). Для иммуногистохимического исследования тонкие срезы наносили на адгезивные стекла SuperFrost Plus и депарафинизировали по стандартной методике. Затем проводили нагревание в цитратном буфере. Использовали следующие маркеры: CD34 (клон QBEnd/10, LabVision), αSMA (клон 1A4, LabVision), виментин (клон SP20, LabVision), Ki67(клон SP6, LabVision), bcl2 (клон 100/D5, LabVision). Инкубацию срезов с первичными антителами проводили во влажных камерах. Для визуализации использовали систему UltraVision LP (LabVision), идентификация реакций прово-

дилась с помощью хромогена DAB под контролем микроскопа. Срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Результаты и их обсуждение

В настоящее время в раннем кардиогенезе выявлен и активно изучается ряд процессов, влияющих на развитие органа, - дифференцировка различных клеточных популяций, миграция клеток из экстракардиальных источников, пролиферация, апоптоз. Большинство этих процессов определяются сложными межклеточными взаимодействиями и опосредованы внеклеточным матриксом. Внеклеточный матрикс – зона пристального внимания в эмбриологических исследованиях сердца, так как во многом динамика морфогенетических перестроек органа зависит от его состава. При окрашивании на кислые гликопротеиды (окрашивание по Стивдену), позитивная реакция была в основном характерна для структур, богатых внеклеточным матриксом, начиная с самых ранних стадий развития сердца. Другие части зародыша, интенсивно окрашенные альциановым голубым, отмечали места активных морфогенетических перестроек (глазные пузыри, паракордальная мезенхима) (рис. 1).

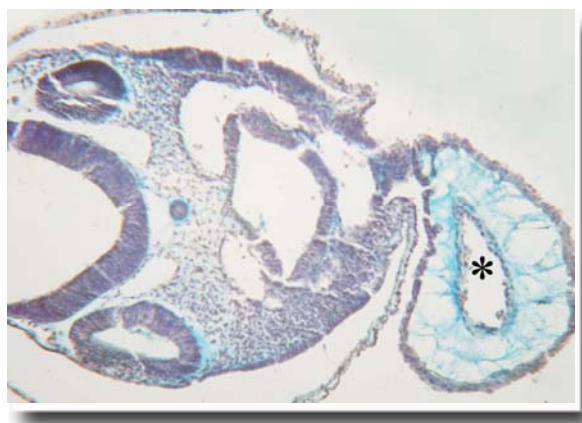


Рис. 1. Поперечный срез куриного зародыша на 34 часа инкубации. Окраска по Стивдену. Звездочкой обозначен конусо-стволовой отдел сердца. ×100.

Выявление клеточных популяций внутри эмбрионального сердца, имеющих различное происхождение, также является одной из наиболее актуальных проблем современной кардиоэмбриологии. Так, популяция клеток, происходящих из нервного гребня (НГ), вносит существенный вклад в развитие клапанов, перегородок и проводящей системы сердца, а также является основной в процессе аортопульмональной септации. Метод окрашивания на кислые гликопротеиды по Стивдену оказался полезным при выявлении популяции клеток нервного гребня внутри мезенхимных структур сердца, так как мигрирующая от 3-4 жаберных дуг мезенхима НГ не содержала кислые гликопротеиды (рис. 2).

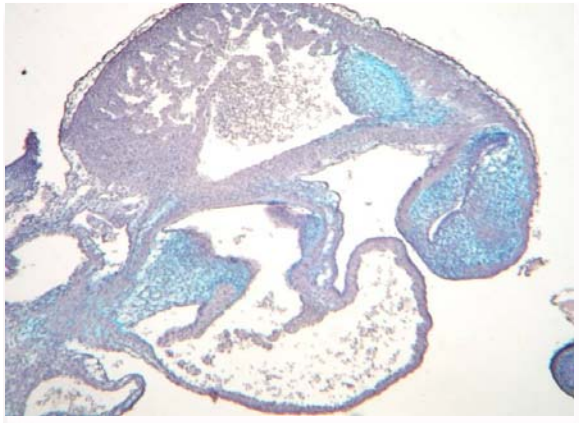


Рис. 2. Поперечный срез куриного зародыша на 4 сутки инкубации. Окраска по Сиддмену. $\times 100$.

Также благодаря этому методу выявлялись различные клеточные популяции внутри перегородок сердца (Машталір М.А., 2005). Тропность матрикса эмбрионального сердца к этому красителю была неодинаковой у разных видов животных. Максимальное окрашивание было характерным в сердце куриных зародышей, умеренное – в сердце мышинных и человеческих зародышей, слабое – в сердце крысиных.

При окрашивании на гликопротеиды по Мак-Манусу, выявлялось не только гетерогенное распределение гликогенсодержащих кардиомиоцитов в разных отделах эмбрионального сердца на протяжении пренатального онтогенеза. Мы также обнаружили окрашенные участки внеклеточного матрикса в мезенхимных структурах, в частности, напротив края миокардиальной манжетки, которая в определенный период подвергается активной редукции (27-31 стадии по Гамбургеру, Гамильтону у кур, 5-7 сутки инкубации) (рис. 3, 4), а также на границе миграции плотной мезенхимы, происходящей из клеток нервного гребня. Большинство других методов выявления гликопротеидов оказались малодемонстративными.

Апоптотические процессы являются одним из ключевых факторов кардиогенеза. Они запускаются на стадиях, предшествующих формированию атриовентрикулярного канала, и сопровождают нормальное развитие сердца даже после завершения его септации. Стандартные методы гистологического окрашивания позволяют увидеть отдельные апоптотические клетки, их группы или целые поля сразу после слияния подушек атриовентрикулярного канала (у кур - 28 стадия по Гамбургеру, Гамильтону, 5 сутки инкубации). На более ранних или поздних стадиях идентификация этих клеток затруднена вследствие уменьшения их количества, отсутствия выраженных участков апоптоза.

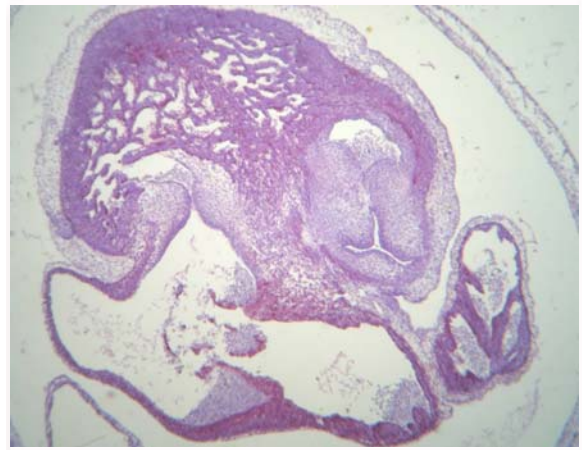


Рис. 3. Фронтальный срез сердца куриного зародыша на 6 сутки инкубации. Окраска по Мак-Манусу. $\times 40$.

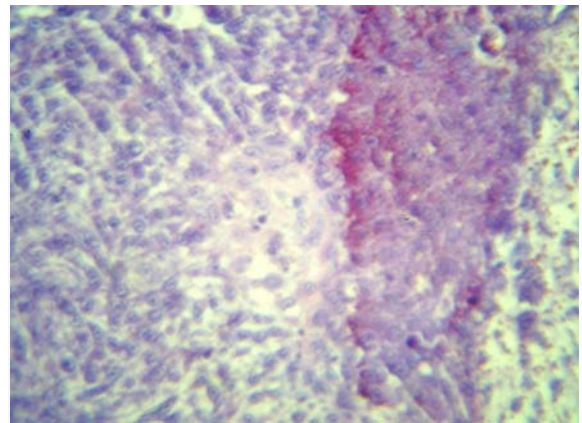


Рис. 4. Увеличенный фрагмент рис. 3.

Лектингистохимические методы оказались весьма информативными при выявлении апоптотических клеток и некоторых интактных популяций клеток в сердце, в частности, эндотелия эндокарда и сосудов. Как правило, те лектины, которые интенсивно связывались с эндотелием сосудов и эндокардом, метили и гибнущие клетки (Mashtalir M. et al., 2004). Ими оказались лектины, которые метят остатки галактозы (сердцевинные или концевые): лектин зародышей пшеницы (WGA), картофеля (STA), клещевины (RCA) (рис. 5). Видоспецифичность в отношении связывания этими лектинами эндотелия и гибнущих клеток отсутствовала. Мы считаем, что апоптотические клетки приобретают способность интенсивно адсорбировать лектины вследствие изменения состава и свойств гликопротеидов внутренних и клеточной мембран. В отношении других лектинов, связывающих галактозу, мы выявили, что лектин омелы белой (VAA) обнаруживает только апоптотические клетки; лектин коры бузины черной (SNA) – эндокард, эндотелий, мезенхиму стенки крупных сосудов; лектин

икры окуня (PFA, связывающий концевую фукозу) – эндотелий, эндокард. Иммуногистохимически эндотелиальные клетки и их предшественники выявлялись с помощью маркера CD34. При этом демонстративность иммуногистохимического метода мало отличались от той, которую мы получили при использовании лектинов.

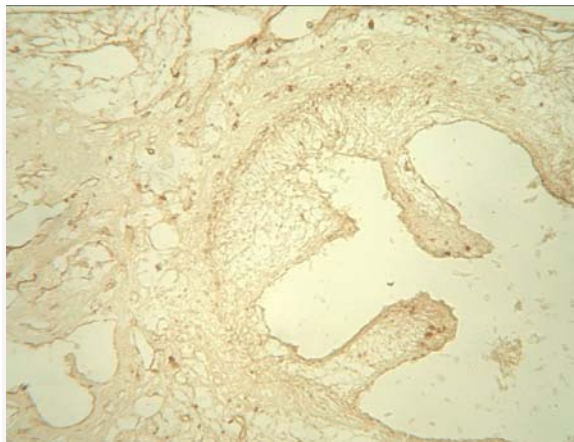


Рис. 5. Срез через область клапана легочного ствола сердца куриного зародыша на 7 сутки инкубации. Реакция с лектином RCA. $\times 400$.

Лектины, метящие гликопротеиды с концевой фукозой (лектин коры бобовника, LAL), α -концевой D-маннопиранозой и α -D-глюкопиранозой (лектин гороха, PSA), срединной α -маннозой α -глюкозой (лектин чечевицы, LCA), - позволяют выявить клеточные популяции или клоны, мигрирующие, а также недавно вышедшие из процесса миграции. Так, нами было обнаружено конусовидное окрашивание в стенке легочного ствола в сердце зародыша человека на 10-й неделе (Лутай Н.В. и соавт., 2007), а в стенке аорты – на 11 неделе, что напоминает описанный ранее клонированный конусовидный рост кардиомиоцитов в стенке желудочков (Mikawa T. et al., 1992). Уже с 8-й недели эмбриогенеза человека можно было выделить четкие слои как в стенке аорты, так и легочного ствола (рис. 6), при этом лектин сои (SBA) по-разному связывался в этих сосудах.

Благодаря окраске на WGA мы выявили не описанную ранее гетероморфность в эндотелии эмбрионального сердца человека. Более интенсивная реакция с этим лектином была характерна для эндотелия, покрывающего трабекулы и сосочковые мышцы желудочков, а также миокард стенок желудочков и предсердий (рис. 7). В области формирования сухожильных хорд реакция с этим лектином практически отсутствовала (рис. 8).

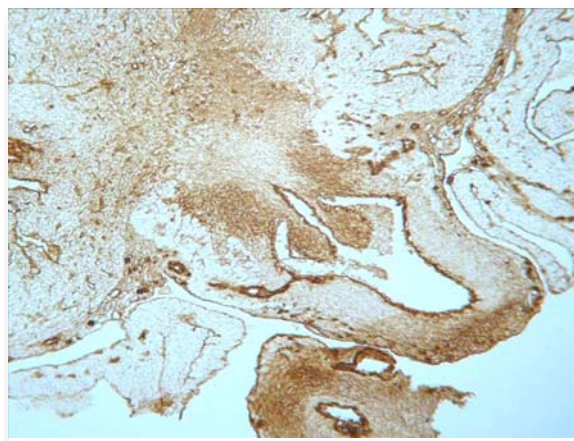


Рис. 6. Срез через область клапана аорты сердца человека на 8 неделе эмбриогенеза. Реакция с лектином LCA. $\times 200$.

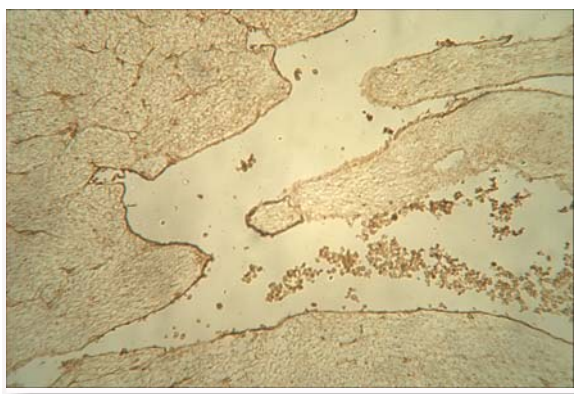


Рис. 7. Срез через область трехстворчатого клапана сердца человека на 9 неделе эмбриогенеза. Реакция с лектином WGA. $\times 100$.

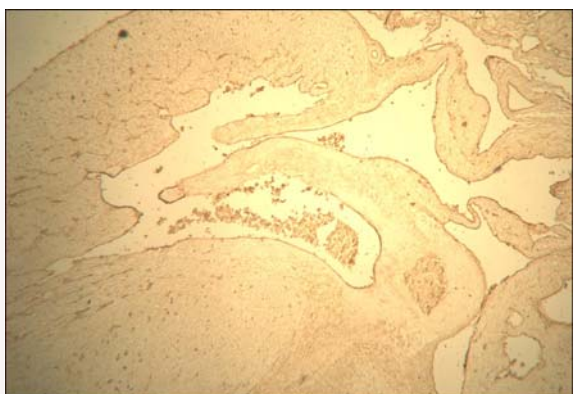


Рис. 8. Увеличенный фрагмент клапана с рис. 7.

Апоптотические перестройки, часто непосредственно связанные с клетками, происходящими из нервного гребня, сопровождают формирование проводящей системы. Так, нами была описана апоптотическая зона в межжелудочковой перегородке у кур в области развития атриоvent-

трикулярного узла (Машталир М.А., 2005). В аналогичном участке в соответствующий период кардиогенеза человека сохраняется позитивная реакция с bcl-2 (рис. 9). Также активация анти-апоптотических программ наблюдалась в местах, где происходит активная перестройка тканей путем апоптотических процессов, в частности, в атриовентрикулярной перегородке, конусо-стволовой части сердца, в местах формирования проводящей системы.

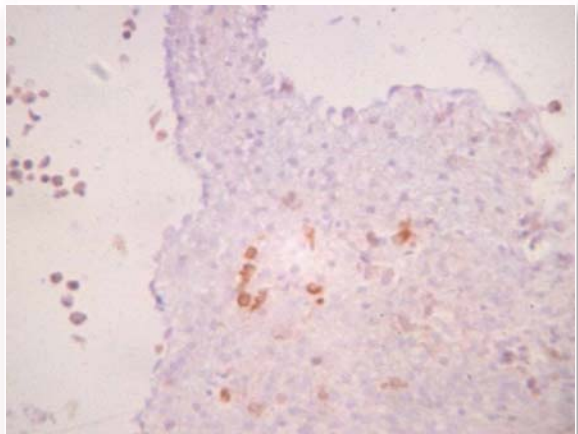


Рис. 9. Область основания межпредсердной перегородки сердца человека на 9 неделе эмбриогенеза. ИГХ реакция с bcl-2, докрасивание гематоксилином Маейра. ×400.

Интенсивность пролиферативных процессов в эмбриональном сердце мы выявляли с помощью маркера Ki67. При этом четко дифференцировались зоны с более существенным пролиферативным потенциалом: миокард желудочков и предсердий на протяжении 4-6 недели эмбриогенеза человека, миокард атриовентрикулярных зон, верхней части межжелудочковой перегородки – на 7-10 неделе.

Антитела к промежуточным филаментам, в частности к виментину, позволяют выявить различные клеточные популяции в составе межпредсердной перегородки, формирующих клапанов, стенок атриовентрикулярного канала, субэпикардальной зоны и области начального отдела аорты и легочного ствола (рис. 10). С этой же целью использовался маркер гладкомышечных клеток α SMA, с помощью которого удалось идентифицировать единичные клетки с гладкомышечной дифференцировкой внутри миокарда желудочков и межжелудочковой перегородки (рис. 11).

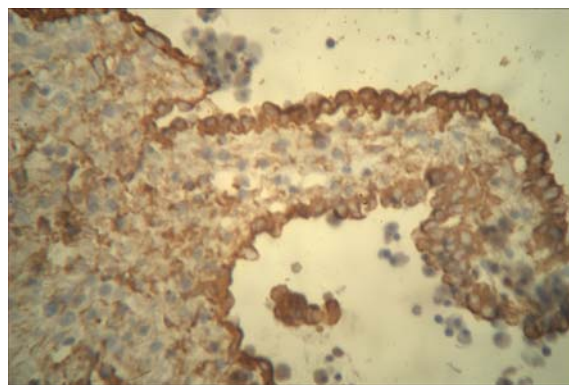


Рис. 10. Область основания межпредсердной перегородки сердца человека на 9 неделе эмбриогенеза. ИГХ реакция с виментином, докрасивание гематоксилином Маейра. ×400.

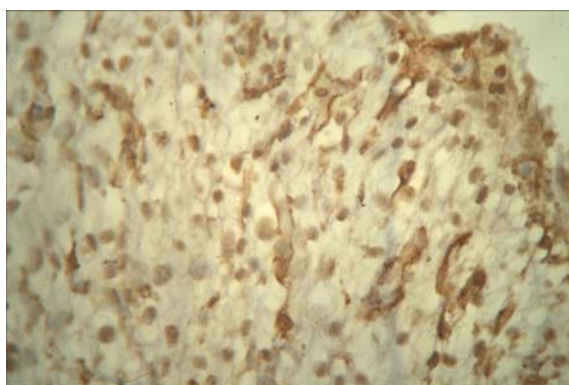


Рис. 11. Участок миокарда межжелудочковой перегородки сердца человека на 9 неделе эмбриогенеза. ИГХ реакция с α SMA, докрасивание гематоксилином Маейра. ×400.

Заключение

Гистохимические, иммуно- и лектингистохимические методы сохраняют свою актуальность в эмбриологических исследованиях и предоставляют широкие перспективы использования как в изучении нормального, так и аномального кардиогенеза.

Перспективы дальнейших исследований

В настоящее время разрабатываются иммуногистохимические методы, которые выявят новые молекулярно-биологические закономерности кардиогенеза. Недавно открытые лектины также будут применены для исследования особенностей гликопротеидов клеток и матрикса в развитии сердца.

Литературные источники

Гистотопография рецепторов лектинов в некоторых эмбриональных структурах кур и человека / Н. В. Лутай, М. А. Машталир, А. З. Браз-

лук, И. В. Твердохлеб // Морфология. – 2007. – Т. 1, № 3. – С. 42-49.

Машталир М. А. Апоптозы в эмбриональном

серце / М. А. Машталір // Вісник проблем біології і медицини. – 2005. – № 3. – С. 131-135.

Машталір М. А. Нормальний та аномальний кардіогенез: участь позасерцевих клітинних популяцій / М. А. Машталір, І. В. Твердохліб // Морфологія. – 2007. – Т. 1, № 1. – С. 84-88.

Машталір М. А. Формування міжпередсердної перегородки в нормі і після впливу етанолу у курей / Машталір М. А. // Вісник морфології. – 2005. – Т. 11, № 2. – С. 241-244.

Clonal analysis of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective retrovirus: I. Formation of the ventricular myocardium / Mikawa T., Borisov A., Brown A. M., Fischman D. A. // Dev. Dyn. – 1992. – Vol. 193, № 1. – С. 11-23.

Lectin histochemistry of the chick embryo during embryonic days 3-8 / Maryna Mashtalir, Natalia Lutay, Alexandr Brazaluck, Igor Tverdokchleb // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. – 2004. – Vol. 17, № 2. – P. 269-271.

Машталір М.А., Твердохліб І.В. Гістохімічні, лектингістохімічні та імуногістохімічні методи в ембріологічному дослідженні серця.

Резюме. Метою роботи було узагальнити власні результати використання гістохімічних, лектингістохімічних та імуногістохімічних методів на курячих, мишачих і щурячих зародках, а також зародках людини, в ембріональному дослідженні серця. Метод забарвлення за Східменом був корисним при виявленні популяції клітин нервового гребеня в мезенхімних структурах серця. При забарвленні за МакМанусом в зонах, що активно перебудовуються, виявляються пофарбовані ділянки позаклітинного матрикса. Лектини WGA, STA, RCA, які інтенсивно зв'язувалися з ендотелієм судин і ендокардом, мітили клітини, що гинуть. VAA забарлював лише апоптотичні клітини, SNA - ендокард, ендотелій, мезенхіму стінки крупних судин, PFA - ендотелій, ендокард. PSA, LCA виявили конусоподібне забарвлення в стінці легеневого стовбура та аорти зародка людини протягом 8-11 тижнів. WGA виявив гетероморфність в ендотелії ембріонального серця людини на 8-12 тижні. Більш інтенсивна реакція із цим лектином була характерною для ендотелія, що вкриває трабекули й сосочкоподібні м'язи шлуночків, а також стінки шлуночків і передсердь. В області формування сухожильних хорд реакція із WGA була практично відсутня. Демонстративність лектингістохімічних та імуногістохімічних методів відносно виявлення ендотелія й апоптозів була порівнянною.

Ключові слова: гістохімічні методи, лектингістохімічні методи, імуногістохімічні методи, серце, ембріональний розвиток.