

## МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ТКАНЕЙ

УДК 611.11.013.018:616.132.2:611.142

### ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К CD34

© 2016 г. О. Ю. Потоцкая

ГЗ “Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины”, кафедра гистологии, Днепропетровск,  
ул. В. Вернадского (Дзержинского), 9, Украина 49044

E-mail: pototskaya.o.yu@gmail.com

Поступила в редакцию 03.02.2016 г.

Окончательный вариант получен 03.07.2016 г.

Информация об эмбриональном развитии коронарного эндотелия является ключевой в создании новых методов тканевой инженерии для лечения ишемической болезни сердца. Задача. Цель исследования состояла в описании развития коронарных сосудов человека на ранних этапах пренатального онтогенеза при помощи антител к эндотелиальным клеткам (CD34+). Результаты: Первый этап в развитии коронарных сосудов человека состоит в формировании эндотелия *de novo* путем преобразования некоторых эпикардиальных и, возможно, эндокардиальных клеток. Следующий этап – вращание эндотелия венозного синуса в субэпикард над желудочками и предсердиями – дает начало коронарным сосудам. Только через 7 дней примитивное коронарное сплетение сердца соединяется с аортой (третий этап). В течение этого периода некоторые субэпикардиальные сосуды вырастают в миокард и некоторые интрамиокардиальные сосуды соединяются с полостью сердца. Такие соединения могут оптимизировать кровообращение в примитивном коронарном сплетении до установления эффективных контактов между артериальными и венозными сосудами – избыток крови может сбрасываться непосредственно в полость сердца. Дополнительная субпопуляция CD34+ клеток была выявлена в конденсированной мезенхиме конотрункуса; она участвует в формировании *vasa vasorum* в аорте. Выводы: Эпикард и эндотелий венозного синуса генерирует коронарные сосуды путем неоваскуло- и ангиогенеза, соответственно. В течение недели после вращающихся сосудов из венозного синуса и до их вращающихся в аорту в сердце формируются вентрикуло-коронарные соединения.

**Ключевые слова:** ангиогенез, венозный синус, конотрункус, конденсированная мезенхима, коронарные сосуды, неоваскулогенез, сосуды Тебезия, эмбрионы человека, эндотелий, эпикард

DOI: 10.7868/S0475145016060045

#### ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области развития коронарных сосудов характеризуются яркими дискуссиями. В то время как развитие гладкомышечных клеток и фибробластов коронарных сосудов (КС) путем эпителио-мезенхимной трансформации эпикарда является общепринятой точкой зрения (Dettman et al., 1998; A.C. Gittenberger-de Groot et al., 1998; Vrancken Peeters et al., 1999), основной источник происхождения эндотелия по-прежнему остается предметом дискуссий. Согласно одной из концепций эти клетки развиваются из эпикарда: эксперименты с ретровирусным, флуоресцентным и генетическим маркированием перикардиального мезотелия и проэпикарда обнаружили меченые клетки в эндотелии КС (Tomanek et al., 2006; Lie-Venema et al., 2007). Другие исследования выявили колокализацию цитокератина и

QH-1 маркера в эксплантах птичьего проэпикарда, что также подтверждает преобразование его эпителия в эндотелиальные клетки (Pérez-Pomares et al., 2006). Еще одна группа экспериментов была основана на создании химерных животных; после трансплантации проэпикарда его дериваты были обнаружены, в том числе, и в эндотелиальных клетках хозяина (Gittenberger-de Groot et al., 1998; Pérez-Pomares et al., 2002). Важно подчеркнуть, что проэпикард донора в этих опытах был изъят вместе с фрагментом венозного синуса (ВС) – другим потенциальным источником эндотелия, что делает результаты исследований неоднозначными.

Согласно другой концепции ангиогенные клетки иммигрируют в сердце из зачатка печени, или мезенхимы поперечной перегородки через проэпикард (Lie-Venema et al., 2005). Для подтвержде-

ния этой идеи исследователи аккуратно извлекли перепелиный проэпикард без зачатка печени и пересадили его куриному эмбриону (Poelmann et al., 1993). В результате эндотелиальные клетки перепелиного происхождения обнаружены не были, в то время как перепелиная печень после трансплантации генерировала эти клетки в сердце хомяка.

Последние исследования развития КС были выполнены при помощи трансгенных методов, которые позволили прицельно метить различные клеточные популяции. В отличие от предыдущих исследований в подобных экспериментах используются мышинные, а не птичьи эмбрионы. Одна из таких работ была нацелена на выяснение роли ВС в развитии КС. Для дифференцировки эндотелия ВС и КС от эндокардиальных клеток К. Red-Horse (2010a) с коллегами использовали *Apolin* в качестве маркера. Дополнительно был выполнен клональный анализ при помощи VE-кадгерин управляемой тамоксифен-индуцируемой Cre-рекомбиназы. В отличие от предыдущих исследований обе техники продемонстрировали, что основным источником эндотелия КС является ВС, в то время как эндокард неожиданно был выявлен в качестве минорного источника.

Для уточнения роли эндокарда в развитии КС в качестве маркера был использован *Nfatc1*, поскольку его экспрессия с определенного срока была выявлена именно в эндокарде, а не других тканях сердца. Используя трансгенную мышиную линию, был выявлен существенный вклад эндокарда в формирование коронарного эндотелия (Wu et al., 2012). Тот же маркер (*Nfatc1*) был использован для меченья эндокарда в другом исследовании, дополнительно аполиновый рецептор — *Arj* был использован для отслеживания эндотелия ВС, и *Sema3D* — для выделения популяции эпикардиальных клеток (Chen et al., 2014). В результате было четко продемонстрировано, что преобладающая часть коронарного русла была представлена потомками *Arj* (дорзальная и латеральная часть) и *Nfatc1* (вентральная часть), в то время как *Sema3D+* клетки были менее многочисленные и распределены равномерно.

Не только источники, но и механизмы генерации коронарных сосудов до сих пор являются предметом дискуссий. В фундаментальной работе Mikawa и Fischman описали формирование коронарных сосудов из разрозненных элементов путем их слияния *in situ* (васкулогенез) (1992), но не за счет непрерывных выростов эндотелия аорты (ангиогенеза), как считалось до этого. Поскольку Red-Horse et al. продемонстрировала четкие доказательства ангиогенеза ВС (2010a), актуальным является установление взаимосвязи

между этими двумя механизмами. В этом аспекте следует упомянуть о структурах, подобных кроветворным островкам, которые обычно обнаруживаются в межжелудочковой борозде и состоят из клеток крови, окруженных эндотелием (Ratajska et al., 2006; Tian et al., 2013b). Некоторые авторы предполагают, что эти структуры позднее включаются в коронарное сосудистое русло (Red-Horse et al., 2010a) и демонстрируют роль неоваскулогенеза в его образовании.

Принимая во внимание видоспецифические особенности в процессе развития КС, особенно ценными становятся данные, полученные при исследовании эмбриональных тканей человека. Подобные исследования малочисленны и в основном выполнены при помощи рутинных гистологических методов без точной идентификации эндотелиальных клеток (Conte and Pellegrini, 1984; Hutchins and Moore, 1988; Mandarin-de-Lacerda, 1990). Недавно опубликованная статья Rusu и соавторов (2015) описывает относительно поздние (46–53 день эмбриогенеза) стадии развития человеческих венечных сосудов с широким спектром иммуногистохимических антител, но самые ключевые моменты соединения коронарного сплетения с ВС и аортой до сих пор не охарактеризованы.

Цель нашей работы состояла в уточнении механизмов формирования КС и вклада различных клеточных популяций в развитие коронарного эндотелия человека.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### *Эмбриональные ткани человека*

Согласно приказу Министерства охраны здоровья Украины № 81 биопсионный и гистологический материал, полученный при хирургических вмешательствах (например, абортах), является собственностью областного патологоанатомического бюро и хранится в его архивах. Эмбрионы человека были исследованы согласно Договору о взаимовыгодном сотрудничестве между Днепропетровским областным патологоанатомическим бюро и кафедрой гистологии Днепропетровской государственной медицинской академии. Программа исследования согласуется с Хельсинской декларацией (октябрь 2013) и была одобрена Комиссией по биомедицинской этике Днепропетровской государственной медицинской академии. Прерывание беременности производилось в региональных центрах (независимо от проведения исследования) по желанию женщины по социально-экономическим причинам и выполнялось путем кюретажа матки согласно Приказу Министерства охраны здоровья Украины № 782. После

аборта материал фиксировался в 10% забуференном формалине (рН 7.4) и доставлялся в патологоанатомическое бюро из региональных клиник, где и подлежал исследованию. Для внешне нормальных эмбрионов определяли стадию развития по Карнеги. Материал промывался в проточной воде, проводился по спиртам восходящей концентрации, и заливался в парапласт при помощи хлороформа. Серийные срезы (5 мкм) окрашивались гематоксилином и эозином, альциановым голубым 8GX.

### *Иммуногистохимия*

Срезы 5 мкм толщиной помещались на адгезивные стекла и нагревались до 60°C, позволяя парапласту расплавиться. После депарафинизации и регидратации проводили демаскировку антигена путем автоклавирования срезов в фосфатном буфере рН 6.0 на протяжении 10 мин при температуре 90°C. Для дальнейшей обработки срезов использовалась система визуализации LSAB2 System, HRP (биотинилированные антитела и пероксидазный комплекс, Dako) и DAB хромоген. Блокирование эндогенной пероксидазы осуществляли 3% раствором перекиси водорода (пероксидазный блок из набора). Инкубацию с первичными антителами производили на протяжении 30 мин при комнатной температуре. Были использованы первичные антитела rabbit anti-human Ki-67 (LabVision, 1/200), mouse anti-human CD34 (LabVision, 1/200) для анализа пролиферации и паттерна эндотелиальной экспрессии, соответственно. Согласно протоколу после промывания срезов от неконъюгированных антител Biotinylated Link, Streptavidin-HRP и Substrate-Chromogen Solution были последовательно использованы. До покрытия срезов стеклом их дополнительно докрасивали гематоксилином Майера. Анализ экспрессии маркеров проводили по коричневому цвету.

### *3D моделирование*

3D модели сердца и СПКО создавались при помощи программного обеспечения Amira 5.2.2 (Visage Imaging, Inc.) и 3ds Max 5.0 (Autodesk Inc.). Цифровые изображения серийных срезов (5 мкм), полученные при помощи микроскопа Ulab XY-B2T и цифровой камеры TourCam (C-mount) импортировались в Amira. При помощи этого программного обеспечения изображения выравнивались, на каждом из них обводился наружный контур сердца и СПКО. После интерполяции обведенных контуров производили генерацию поверхности; для дальнейшей обработки поверх-

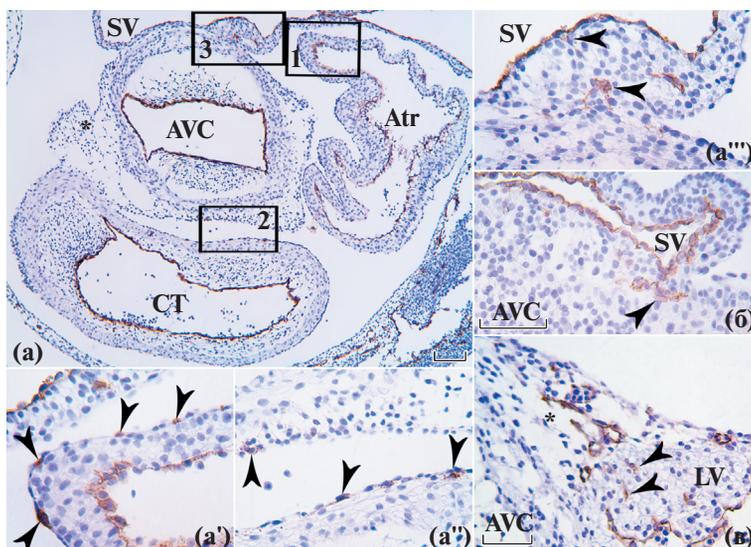
ность упрощалась и экспортировалась в 3D Studio Max в .wrl формате. В 3ds max поверхности сглаживались (MeshSmooth tool), им присваивали материал с определенными свойствами. Снимки моделей в разных ракурсах выполнялись при помощи инструмента Rendering tool и экспортировались в .jpg формате.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Участие эпикарда в формировании коронарного эндотелия*

На стадии 13 по Карнеги (К) рассредоточенные CD34+ клетки наблюдались в составе эпикарда поверх всех отделов сердца (рис. 1а). Характерными местами их локализации были: вентральная сторона атриовентрикулярной (АВ) борозды, дорзальная сторона конусно-стволового отдела (КСО), межжелудочковая борозда (МЖБ); на поверхности предсердий эти клетки выявлялись редко и без топографических предпочтений (рис. 1, 1а', 1а"). Не смотря на положительную реакцию с анти-CD34 антителами, эти клетки не образовывали люменизированных структур, или сплошных, непрерывных сетей под эпикардом. Никаких прямых сообщений между эндокардиальным и субэпикардальным эндотелием на этом сроке обнаружено не было. Субэпикардальная мезенхима с большим содержанием внеклеточного матрикса была сконцентрирована в АВ-борозде, но эндотелиальные клетки в ней не обнаруживались (рис. 1а).

Некоторые эндотелиальные клетки в МЖБ были ассоциированы с клетками крови и образовывали структуры, подобные кроветворным островкам (СПКО) (рис. 2а–2е). Обычно эти структуры были локализованы между миокардом и эпикардиальным эпителием в регионе с низким содержанием внеклеточного матрикса. В АВ-борозде СПКО были обнаружены только в месте пересечения с МЖБ; в этом регионе некоторые клетки крови наблюдались в мезенхиме около СПКО без ассоциации с эндотелием (рис. 2б; головка стрелки на 2а"). На этом сроке мы не выявляли прямых сообщений между СПКО и эндокардом, в то время как некоторые клетки крови были обнаружены внутри миокарда, как если бы они мигрировали из полости сердца в субэпикард (рис. 2г). На стадии 14–15К некоторые эндокардиальные клетки межтрабекулярных пазух наблюдались вблизи некоторых, но не всех, СПКО (рис. 2е). Обработка антителами к Ki-67 выявила пролиферативную активность эндотелия и клеток крови в СПКО и общем кровотоке (рис. 2в). На стадии 15К 3D моделирование целого сердца



**Рис. 1.** CD34+ клетки обнаруживаются над всеми камерами сердца до того, как ВС достигает субэпикардиальной мезенхимы, и формирует там первые сосуды. Стадия по Карнеги: а – 14, б – K15, в – K16. а', а'', а''' – увеличенные фрагменты 1, 2, 3, выделенные на А, соответственно. а – На K14 только редкие CD34+ клетки идентифицируются в эпикарде, некоторые из них локализуются в предсердиях (а'), в то время как другие – на соприкасающихся поверхностях КТ и АВК (а''). б – На стадии K15 эндотелиальные выросты ВС проникают в миокард, но все еще слишком коротки для достижения АВ борозды (головка стрелки). в – На K16 после инвазии ВС, люменизированные структуры обнаруживаются в мезенхиме АВ-борозды. Следует заметить близкое расположение этих структур и эндотелия межтрабекулярных пространств, обозначенных головками стрелок. Atr – предсердия, AVC – атриовентрикулярный канал, LV – левый желудочек; CT – конотрункус, SV – венозный синус. Звездочкой отмечена субэпикардиальная мезенхима. Головки стрелок на а–б указывают на эндотелиальные клетки. Масштабный отрезок на а – 100 мкм, б, в – 50 мкм.

эмбриона продемонстрировало слияние большинства СПКО вдоль МЖБ (рис. 2е–2и).

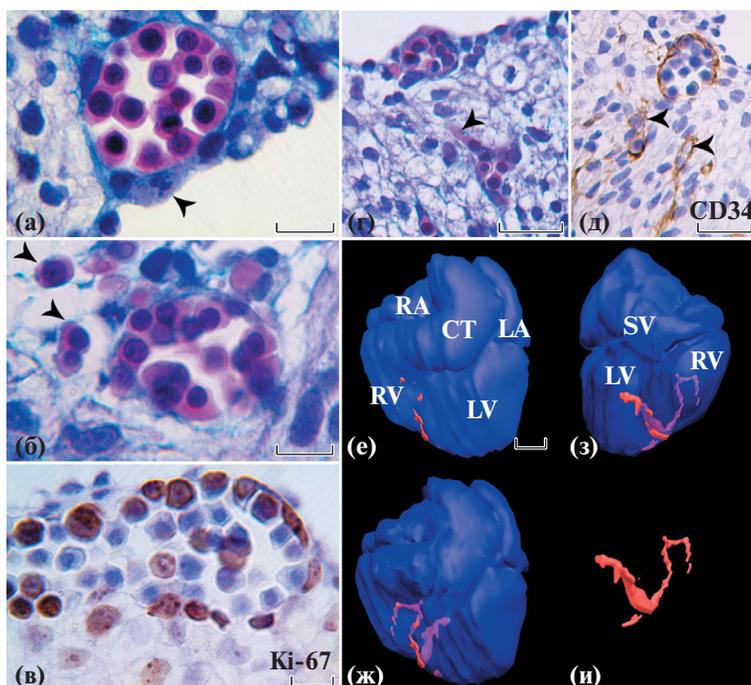
#### *Участие ВС в формировании коронарного эндотелия*

На этапе появления диссоциированных CD34+ элементов и СПКО в субэпикарде, ВС посылал в АВ борозду лишь тонкие отростки (рис. 1а''', 1б). Эти эндотелиальные выросты не имели просвета и не достигали субэпикардиальной мезенхимы. Выраженные ростки эндотелия ВС были обнаружены в АВ-борозде только после начала стадии 16К и ограничивались дорзальной поверхностью сердца. Эти клетки представляли собой первые элементы эндотелия в субэпикардиальной мезенхиме АВ-борозды; вблизи от них часто обнаруживался эндотелий межтрабекулярных пространств (рис. 1с). Верхний сегмент ВС также посылал некоторые ветви в направлении предсердий.

На стадии 17–18К CD34+ клетки появлялись на вентральной стороне АВ-борозды; некоторые из субэпикардиальных сосудов внедрялись в желудочковый миокард (рис. 3а–3а'). С момента инвазии ростков ВС в субэпикард в сердце обнаруживались лишь единичные СПКО, предполагая

их вовлечение во вновь формирующееся сосудистое русло. В подтверждение этой точки зрения были обнаружены сообщения между субэпикардиальными сосудами и СПКО с интрамиокардиальным сплетением (рис. 3а''). Даже на стадии 18К некоторые СПКО все еще обнаруживались в субэпикарде АВ-борозды (рис. 3а); при исследовании серийных срезов коммуникаций между ними и системным кровотоком выявлено не было (ни с полостью сердца, ни с крупными сосудами). СПКО отличались от кровеносных сосудов более крупным диаметром и высокой плотностью упаковки клеточных элементов внутри. На стадии 19К (после вставания перитрункального сплетения в аорту), СПКО более не обнаруживались.

После инвазии в АВ-борозду эндотелиальные выросты ВС формировали сплетение, быстро распространяющееся в дорзо-вентральном направлении. В предсердии сосудистое сплетение распространялось от основания, дорзальной и медиальной поверхности к верхушкам ушек (рис. 3б). В нетрабекулированных регионах предсердий некоторые эндотелиальные клетки внедрялись в миокард со стороны эпикарда, предполагая их происхождение из субэпикардиального сплетения (рис. 3б''). Начиная с 17–18К, в некоторых сосудах предсердий обнаруживались красные кро-



**Рис. 2.** СПКО в сердце эмбриона человека на 15-й стадии по Карнеги. а – Типичные СПКО под эпикардом МЖБ борозды, состоящие из клеток красной крови и внешнего эндотелиального слоя. Обратите внимание на низкое содержание мезенхимной ткани вокруг СПКО. Головка стрелки указывает фигуру митоза в клетке периметра СПКО. б – СПКО локализованы в верхней части МЖБ, вблизи мезенхимы АВ борозды. Головка стрелки указывает на клетки, расположенные свободно во внеклеточном матриксе. в – Обработка антителами к Ki-67 выявила митотическую активность клеток крови внутри СПКО и эндотелиальных клеток в их периметре. г, д – Близкое расположение СПКО и межтрабекулярных эндокардиальных пазух (показаны головками стрелок на е). Некоторые красные клетки крови обнаруживаются внутри эндокардиальных карманов (головка стрелок на г). е–и – 3D модели человеческого сердца (синий) и СПКО (красный). Большинство СПКО расположены в МЖБ и сливаются друг с другом, в то время как некоторые из них образуют отдельные островки. е, ж – фронтальный ракурс, з, и – вид сзади. ж, з – материал сердца (синий) прозрачный на 60%. LA – левое предсердие, LV – левый желудочек, CT – конотрункус, RA – правое предсердие, RV – правый желудочек, SV – венозный синус.

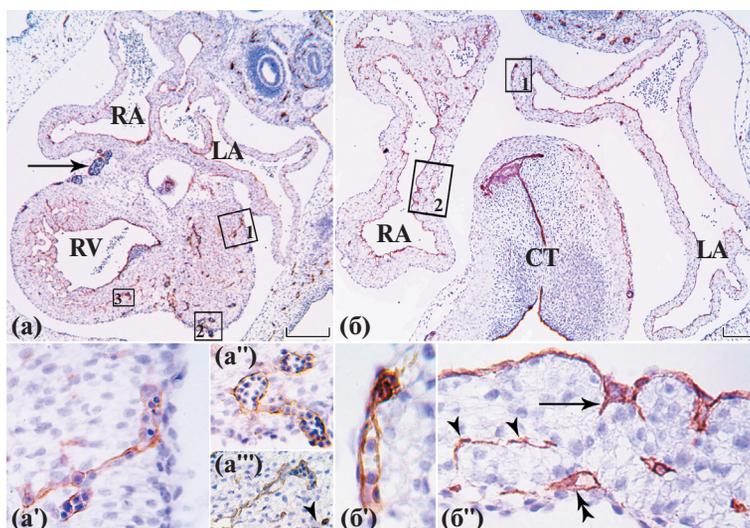
вяные клетки, как если бы они были в контакте с системным кровотоком (рис. 3б').

*CD34+ субпопуляция, ассоциированная с конденсированной мезенхимой гребней конотрункуса*

Дополнительная CD34+ субпопуляция клеток была обнаружена на стадии 13К в регионе КСО. Эти клетки были диспергированы среди конденсированной мезенхимы, спускающейся из фарингеальных дуг вдоль стенки КСО между гребнями ствола (рис. 4а–4б', 4д). Важно заметить, что такие CD34+ клетки не образовывали сплошного сплетения и не ответвлялись от предсуществующих сосудов фарингеальных дуг. Обработка антителами к Ki-67 выявила низкую пролиферативную активность конденсированной мезенхимы в сравнении с окружающими клетками кардиального геля эндокардиальных подушек (рис. 4в, в'). Локально в месте инвазии конденсированной мезенхимы средний слой КСО отсутствовал,

делая миокардиальную манжетку в этом участке прерывной. На протяжении стадий 13–16К некоторые из этих CD34+ клеток были выявлены иммигрирующими внутрь мезенхимы гребней трункуса, но они не формировали люменизированных структур, или СПКО (стр. 4е, 4е').

Начиная со стадии 16К и далее CD34+ элементы конденсированной мезенхимы концентрировались под эпикардом только что разделившихся аорты и легочного ствола (рис. 4ж). На стадии 17К “экстракардиальная” субпопуляция CD34+ клеток была рассредоточена в этой мезенхиме без формирования сплошного слоя (рис. 4з). Этим она отличалась от “кардиальных” CD34+ клеток, поскольку последние распространялись над проксимальной частью КСО и образовывали сплошной слой под эпикардом. На 18–19К некоторые из эндотелиальных клеток под эпикардом аорты и легочного ствола были организованы в кровеносные сосуды, содержащие красные клетки крови (рис. 5а, 5а'). Эти сосудистые сплетения наблюдались в тесной близости с легочными артериями



**Рис. 3.** Срезы человеческого сердца на стадии K18, обработанные антителами к CD34. а', а'' – увеличенные фрагменты 1, 2 участков, выделенных на а, соответственно. б', б'' – увеличенные фрагменты 1, 2 регионов, выделенных на б, соответственно. а – Сообщение между субэпикардиальным сплетением (а')/СПКО (а'')/полостью сердца (а''') и интрамиокардиальным сплетением. В то же время некоторые СПКО обнаруживаются в АВ борозде (стрелка на а). Головка стрелки на а''' указывает клетку, подобную моноциту, в субэпикарде. б – Эндотелиальные клетки локализованы преимущественно на медиальной, дорзальной поверхности предсердий, в то время как регион будущих ушек практически лишен CD34+ клеток. Внутри некоторых сосудов предсердий обнаруживаются красные клетки крови (б'), предполагая их коммуникацию с кровотоком. Одновременно в предсердном миокарде выявляются субэпикардиальные (двойная головка стрелки), интрамиокардиальные (головка стрелки) эндотелиальные клетки (б''). В то же время эндокард посылает выраженные выросты (стрелка) внутрь миокарда (б''). LA – левое предсердие, CT – конотрункус, RA – правое предсердие, RV – правый желудочек. Масштабный отрезок на а – 200 мкм, б – 100 мкм.

(рис. 5в), но не соединялись с просветом аорты или легочного ствола.

#### *Соединение коронарных сосудов с аортой*

В стенке аорты и легочного ствола CD34+ клетки, происходящие из конденсированной мезенхимы, граничили с развивающимися коронарными сосудами на уровне формирующихся створок клапанов, вблизи к наружному краю миокардиальной манжетки КСО (рис. 5б, 5в). Эндотелиальные выросты обеих CD34+ субпопуляций взаимно проникали друг в друга без четкой линии разграничения. На стадии 19К выраженные ростки эндотелия между этими субпопуляциями были направлены к аортальному просвету над уровнем гребней ствола (рис. 5а''); пенистрируя стенку аорты они формировали главные коронарные артерии. Эти ростки слепо заканчивались и были спавшимися на срезах, но содержали некоторые красные клетки крови внутри, предполагая их сообщение с системным кровотоком и невозможность поддержания своего просвета открытым. Будущие коронарные артерии отходили от субэпикардиальных сосудов снизу, на уровне дистальной границы миокардиальной манжетки, что свидетельствует об их развитии из коронарного сплетения, а не из CD34+ элемен-

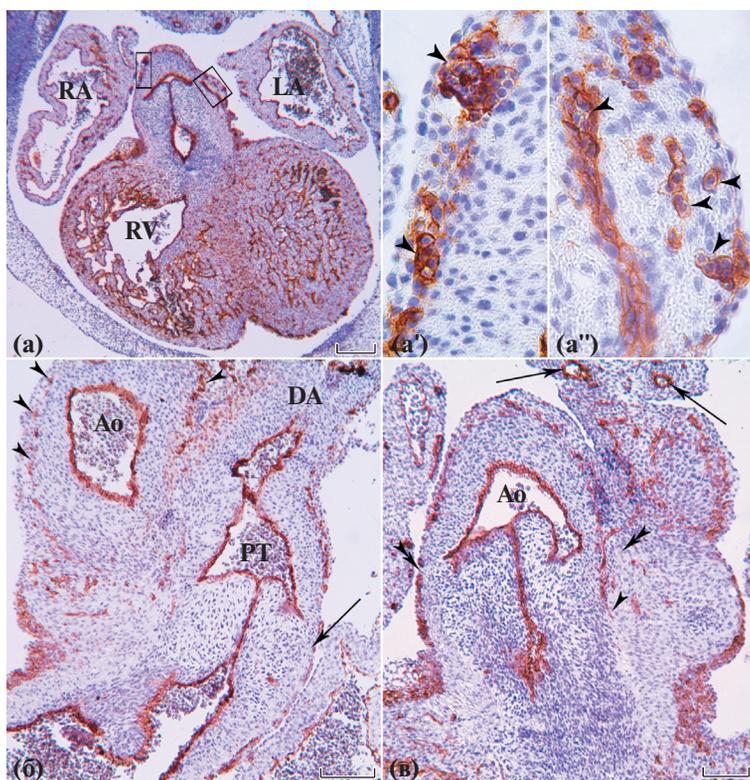
тов конденсированной мезенхимы. После формирования сообщения между аортой и устьями коронарных артерий объем внеклеточного матрикса в субэпикардиальной мезенхиме АВ-борозды значительно снижается.

#### ОБСУЖДЕНИЯ

*Эпикард и, возможно, эндокард дают начало первым клеткам эндотелия в субэпикарде путем неоваскулогенеза*

Наши данные свидетельствуют о том, что первичным механизмом формирования коронарных сосудов человека является неоваскулогенез, поскольку он инициируется с появлением разрозненных CD34+ клеток и СПКО, которые не объединяются между собой в сплошную сеть под эпикардом. Поскольку вращания ВС в стенку сердца на этих стадиях выражены слабо, контакты между ними и субэпикардиальными CD34+ клетками не выявляются, можно предположить, что именно эпикард является источником, по крайней мере, части эндотелиальных клеток сердца. Другим подтверждением эпикардиального происхождения может быть их локализация над нетрабекулированными регионами сердца, такими как АВ-канал или КСО, где толстый слой кардиального геля отделяет эндокард от мио- и эпикарда,





**Рис. 5.** Срезы человеческого сердца на K19, обработанные антителами к CD34. а', а'' – увеличенные фрагменты левого и правого выделенных регионов на А, соответственно. а. До пенетрации аорты некоторые сосуды, содержащие клетки крови, идентифицированы среди CD34+ клеток, ассоциированных с конденсированной мезенхимой (головки стрелок на а'); в то же время некоторые сосуды, содержащие кровь, заметны на уровне гребней ствола (головки стрелок на а''); одни из наиболее развитых видны на а'', они направлены к просвету аорты и пронизывают миокардиальную манжетку. б. Миокардиальная манжетка вокруг легочного ствола простирается до того же уровня, что и в аорте (дистальная граница отмечена стрелкой). В составе аортальной мезенхимы обнаруживаются субпопуляция эндотелия, названная в литературе “аортальные субэпикардальные сосуды” (головки стрелок), которая распространяется на легочный ствол (над стрелкой) и ductus arteriosus. в. Субэпикардальное аортальное сплетение спускается вглубь КСО в проксимальном направлении (крайняя точка обозначена головкой стрелки), предполагая отсутствие четкой границы с коронарными сосудами. Отметьте близкое расположение субэпикардального эндотелиального сплетения крупных сосудов и легочными артериями (стрелки). Двойные головки стрелок обозначают дистальную границу миокардиальной манжетки. Ao – аорта, PT – легочный ствол, DA – ductus arteriosus, LA – левое предсердие, RA – правое предсердие, RV – правый желудочек. Масштабный отрезок на а – 200 мкм, б, в – 100 мкм.

эндо-, или эпикарда. Общепринятым является мнение, что СПКО играют аксессуарную роль в развитии КС и в конечном итоге сливаются с новообразованным коронарным сплетением (Red-Horse et al., 2010b; Chen et al., 2014; Jankowska-Steifer et al., 2015). Во многих статьях СПКО описаны преимущественно в регионе МЖБ (Jankowska-Steifer et al., 2015), что совпадает с нашими данными. Во время генерации коронарных сосудов СПКО могут исполнять роль пунктирной линии для облегчения формирования крупных сосудов, рекрутируясь субэпикардальными ростками ВС. Удлинение и слияние большинства СПКО в МЖБ до инвазии ВС подтверждает эту точку зрения и согласуется с подобными исследованиями на мышинных эмбрионах (Ratajska, 2009). Экспрессия Ki-67 как эндотелием, так и клетками

крови в островках согласуются с работой Jankowska-Steifer и соавторов (2015), в которой было продемонстрировано присутствие различных стадий созревания клеток крови в СПКО.

#### *Возможная роль эндокарда в формировании эндотелия КС*

Что касается роли эндокарда в развитии КС, наши методы не позволяют различить эту субпопуляцию эндотелия от остальных. Но на первых стадиях развития КС (13–14К) мы не обнаружили прямых контактов между субэпикардальными CD34+ клетками и эндокардом. Эти данные согласуются с информацией о 20 мкм аваскулярной дистанции между эндокардом и внутримышечными КС, которые вырастают из субэпикарда на ранних стадиях развития мыши (Tian et al.,

2013b), что предполагает сравнительно позднее участие эндокарда в формировании КС. В то же время близкое расположение некоторых СПКО и межтрабекулярных пазух в МЖБ на стадии 15К предполагает возможное участие эндокарда в формировании СПКО. Результаты отдельных работ заключают о ведущей роли эндокарда в развитии эндотелия КС (Wu et al., 2012). Эти данные основываются на эксклюзивной экспрессии Nfatc1 в эндокарде сердца – этот фактор был использован для создания трансгенных мышей. Но, согласно другим исследованиям, экспрессия Nfatc1 была обнаружена в проэпикарде, эпикарде, клетках-дериватах эпикарда и эндотелии КС на тех же сроках эмбрионального развития мышинных и куриных эмбрионов (Combs et al., 2011). Более того, блокирование Nfatc1 в клетках-дериватах эпикарда привело к снижению экспрессии катепсина К и нарушению инвазии КС в миокард (Combs et al., 2011). Дальнейшие исследования необходимы для выяснения причин подобных разногласий, до этого момента Nfatc1 не может считаться подходящим инструментом для отличия эндокарда от остальных клеток эмбрионального сердца.

Последние работы, подтверждающие роль эндокарда в формировании коронарных сосудов, предоставляют данные о взаимоотношениях между клеточными субпопуляциями, но не предлагают механизмов, при помощи которых эндокард вовлекается в коронарное русло. Один из возможных механизмов – это формирование СПКО (Red-Horse et al., 2010a), другой – сообщение между субэпикардиальным коронарным сплетением и межтрабекулярными пространствами. В этом аспекте интересно упомянуть о сосудах Тебезия, которые соединяют коронарное русло с полостью сердца не только в предсердиях, но также и в желудочках (Ansari, 2001); их эндотелий может происходить из эндокарда межтрабекулярных пазух так же, как и из эндотелия КС (Männer, 2000). Согласно нашим результатам интрамиокардиальное сплетение сообщается с полостью сердца на стадии 18К, позволяя предположить существование венстрикуло-коронарных коммуникаций (аналогичных сосудам Тебезия). К сожалению, наши методы не позволяют определить точный источник эндотелия этих сосудов. Такие коммуникации очень важны, поскольку в этот момент коронарное сплетение получает кровь от ВС, но еще не контактирует с аортой, и соединения между субэпикардом и полостью сердца могут выполнять роль шунтов для сброса избытка крови. Возможное подтверждение этого предположения может быть найдено в работе по созданию химерных курино-перепелиных эмбрионов, в которой было показано происхождение венстри-

куло-коронарных коммуникаций желудочков из проэпикарда донора, и исчезновение этих коммуникаций, начиная с 18-х суток инкубации (Männer, 2000).

*ВС генерирует эндотелий КС, как желудочков, так и предсердий путем ангиогенеза*

Ангиогенез эндотелия ВС является вторым (по времени) механизмом развития коронарных сосудов. Люменизированные выросты ВС появляются в субэпикардиальной мезенхиме АВ-борозды на стадии 16К. В то же время некоторые ветви ВС направляются к предсердиям. Примечательно, что описывая развитие КС, большинство авторов концентрируют свое внимание на желудочках, в то время как васкуляризация предсердий остается неопищенной. К примеру, в эксперименте с “apelin-nlacZ knock-in” мышинными сердцами авторами была продемонстрирована развитая сосудистая сеть над желудочками, в то время как предсердия оставались неокрашенными вплоть до 15.5 суток развития (Red-Horse et al., 2010a; Tian et al., 2013b). В той же работе совместное культивирование сегментов ВС/предсердий трансгенных сердец с желудочками диких типов приводило к экспансии КС из первого сегмента во второй, но своя собственная сосудистая сеть над предсердиями была незаметной. В другой работе DACH1 был использован с целью маркировки всех эндотелиальных клеток (кроме эндокарда) для конфокальной микроскопии (Chen et al., 2014). Одновременно Nfatc1 и Arj были использованы для отслеживания потомков эндокарда и эндотелия ВС, соответственно. В результате в мышинном эмбриональном сердце на 15.5 сутки развития предсердия были DACH1+ (подтверждая хорошее развитие КС), но не содержали Arj+ элементов, а Nfatc1+ клетки были единичными. В желудочках этих сердец Nfatc1+ и Arj+ клетки были многочисленны, но авторы не объяснили причины подобных отличий в васкуляризации предсердий и желудочков.

Наши исследования показывают присутствие рассредоточенных эндотелиальных клеток над предсердиями до вставания ВС. Поскольку в это время предсердия не трабекулированы, субэпикардиальные CD34+ клетки могут считаться дериватами эпикарда. Начиная со стадии 16К и далее, развитая сосудистая сеть распространялась от региона ВС к предсердиям в дорзо-вентральном направлении, предположительно рекрутируя предсуществующие субэпикардиальные эндотелиальные клетки. Эти данные предполагают те же источники и механизмы формирования КС предсердий, что и в желудочках, тогда почему они де-

монстрируют подобные отличия в экспериментах с трансгенными животными? Ответ может быть найден в филогенетическом анализе. У рыб и рептилий коронарные сосуды в предсердии практически отсутствуют, а у птиц имеются относительно небольшие ветви в левой и правой коронарных артериях для снабжения соответствующих предсердий (Kulchytsky and Romenskii, 1985). Что наиболее важно, грызуны имеют хорошо развитые экстракоронарные ветви внутренней грудной артерии; эти ветви снабжают существенные части предсердий и синусного узла (Kulchytsky and Romenskii, 1985); вместе с артериями в предсердиях крыс хорошо выражены экстракоронарные вены. Появление предсердных сосудов относительно поздно в филогенезе и наличие у них экстракоронарных источников у мышей подчеркивает видоспецифические отличия в генерации коронарных сосудов. Снабжение предсердных сосудов мышей из экстракоронарных источников объясняет, почему они остаются не помеченными в экспериментах с генетической модификацией потенциальных источников коронарных сосудов, таких как ВС, эндокард или эпикард.

*CD34+ клетки, ассоциированные с конденсированной мезенхимой КСО, участвуют в формировании vasa vasorum аорты*

CD34+ клеточная субпопуляция подушек конотрункуса предположительно развивается из нервного гребня, исходя из ее ассоциации с конденсированной мезенхимой. Появляясь на стадии 19К в виде диссоциированных CD34+ элементов под наружной оболочкой аорты, они формируют сосуды, содержащие кровь, что предполагает механизм неоваскулогенеза. Это согласуется с предположениями других исследователей о потенциальном участии сердечного нервного гребня в развитии аортальной vasa vasorum (Waldo, 1994). Что также интересно, в экспериментах с трансгенными мышами было продемонстрировано, что эндотелиальные клетки играют ключевую роль в миграции краниального нервного гребня в сердце (Milgrom-Hoffman et al., 2014); авторы продемонстрировали микрофотографии с эндотелиальными клетками в конденсированной мезенхиме фарингеальных дуг, но не описали их происхождение и дальнейшую судьбу.

Описание этих CD34+ субпопуляций в КСО согласуются с так называемыми “аортальными субэпикардальными сосудами”, описанными Heidi I. Chen и соавторами (2014). Согласно их данным, эта сеть вместе с коронарными сосудами формирует перитрункальное сплетение вокруг аорты и легочного ствола, но способностью пене-

трировать аорту обладают только коронарные артерии. Это согласуется с нашими наблюдениями, по которым зачатки коронарных сосудов были направлены к аорте от уровня миокардиальной манжетки, предполагая их происхождение из кардиальных сосудов. Уровень формирования устьев коронарных артерий совпадает с границей двух сосудистых сплетений, двух эпикардов и дистальным краем миокардиальной манжетки (Männer, 1999); все эти факторы являются потенциальными определителями места врастания коронарных артерий в аорту. Последние работы продемонстрировали присутствие кардиомиоцитов специфически в стенке аорты, но не легочного ствола, и подтвердили их решающее значение в определении места пенетрации аорты (Chen et al., 2014). Наши результаты не выявили значительных отличий в развитии миокардиальной оболочки вокруг легочного ствола и аорты — в обоих сосудах она простиралась до уровня клапанов (рис. 5б, 5в). В той же работе было показано, что на 10-й неделе развития коронарные артерии человека в месте соединения с аортой проходят через слой кардиомиоцитов. Это согласуется с нашими данными, полученными на более ранних сроках — в момент врастания КС в аорту на стадии 19К (соответствует 45–47-м суткам эмбриогенеза).

#### *Соединение коронарных сосудов с аортой*

На стадии 19К в дистальной части перитрункального сплетения формируются люменизированные структуры, две из которых врастают в аорту над уровнем клапанов. Наши данные отличаются от ранее опубликованных по мышинным эмбрионам, у которых эти структуры были описаны как “лишенные просвета мостики в одну клетку толщиной” (Chen et al., 2014). Подобные отличия могут быть объяснены низким давлением в коронарных артериях до пенетрации аорты — в отсутствии красных клеток крови внутри просвет может не идентифицироваться. Судя по всему, аорта пенетрируется сосудами, предварительно наполненными кровью из другого источника. Вероятно, после получения крови из аорты артерии начинают расти и рекрутировать предсуществующие эндотелиальные клетки субэпикарда, формируя основные коронарные артерии вдоль вен. Основываясь на различиях в экспрессии Apelin эндотелием перитрункального сплетения (позитивная) и аорты (негативная), было показано, что стволы и устья коронарных артерий представлены преимущественно дериватами перитрункальных эндотелиальных клеток даже на постнатальных стадиях (Tian et al., 2013a). Таким образом, авторы подтвердили модель врастания КС, и ни-

велировали роль аортального эндотелия в развитии КС. В экспериментах с дифференциальным маркированием венозного и артериального эндотелия было выявлено, что эндотелий ВС после вращающегося в субэпикард утрачивает венозный маркер, а на 12.5 сутки эмбриогенеза некоторые сосуды внутри миокарда приобретают экспрессию маркеров артериального эндотелия (Red-Horse et al., 2010b). В дальнейшем интересно соотносить во времени процессы вращающегося КС в аорту, инвазию субэпикардиальных сосудов в миокард, и начало экспрессии артериальных маркеров в интрамиокардиальном эндотелии. Определение последовательности этих событий поможет выяснить, либо вновь образованные коронарные артерии, отходящие от аорты, рекрутируют уже существующие сосуды внутри миокарда и репрограммируют их в артерии, либо они вначале рекрутируют некоторые субэпикардиальные эндотелиальные клетки, которые в дальнейшем внедряются в миокард, и там начинают экспрессию артериальных маркеров. По нашим наблюдениям на человеческих эмбрионах интрамиокардиальные сосуды появляются до вращающегося КС в аорту, на стадиях 17–18К, но они были представлены только эндотелиальными клетками, что делало невозможным определить их спецификацию (вена, артерия или капилляр). Принимая во внимание отсутствие контактов между коронарным сплетением и аортой, возникает вопрос – существует ли вообще артериальная и венозная спецификация сосудов на этом сроке?

По нашим данным некоторые CD34+ клетки обнаруживались в кардиальном геле гребней трункус, их точная роль неизвестна, возможно, они принимают участие в васкуляризации створок клапанов, поскольку присутствие кровеносных сосудов в клапанах было описано некоторыми авторами (Duran and Gunning, 1968).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние представления о происхождении эндотелия КС основываются на работах с генетическим маркированием и экспериментах по отслеживанию клеточных линий, но потенциал этих методов не может быть использован в полной мере, по причине отсутствия маркеров, позволяющих отличить эндокард от эндотелия ВС и эндотелиальных потомков проэпикарда. Дополнительные эксперименты необходимы для выяснения относительного вклада каждого из этих трех источников в развитие эндотелия КС. Поскольку мышьяк является основным объектом для современных исследований с генетическими экспериментами по отслеживанию клеточных ли-

ний, важно принимать во внимание существование у нее экстракоронарных артерий и вен и подмечать экспрессию исследуемых маркеров также и в источниках этих сосудов.

Наше исследование косвенно подтверждает роль эпикарда в генерации эндотелиальных клеток для коронарных сосудов путем неоваскулогенеза и значительный вклад эндотелия венозного синуса путем ангиогенеза. Мы впервые показали период около 7 дней между соединением русла коронарных сосудов с ВС и аортой, и подчеркнули роль вентрикуло-коронарных коммуникаций в становлении эффективной циркуляции крови в этом сплетении. Эта информация поможет выяснить механизм образования сосудов Тебезия и их значение для гемодинамики коронарной системы в эмбриональном периоде и у взрослых. Еще одним важным обнаружением является формирование *vasa vasorum* аорты из эндотелиальных клеток, связанных с конденсированной мезенхимой конотрункальных гребней.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кульчицкий К.И., Роменский О.Ю.* Сравнительная анатомия и эволюция кровеносных сосудов сердца. К.: Здоров'я, 1985. 176 с.
- Ansari A.* Anatomy and clinical significance of ventricular Thebesian veins // *Clinical anatomy*. 2001. V. 14. № 2. P. 102–110.
- Chen H.I., Poduri A., Numi H. et al.* VEGF-C and aortic cardiomyocytes guide coronary artery stem development // *The Journal of clinical investigation*. 2014. V. 124. № 11. P. 4899–4914.
- Chen H.I., Sharma B., Akerberg B.N. et al.* The sinus venosus contributes to coronary vasculature through VEGFC-stimulated angiogenesis // *Development (Cambridge, England)*. 2014. V. 141. № 23. P. 4500–4512.
- Combs M.D., Braitsch C.M., Lange A.W. et al.* NFATC1 promotes epicardium-derived cell invasion into myocardium // *Development (Cambridge, England)*. 2011. V. 138. № 9. P. 1747–1757.
- Conte G., Pellegrini A.* On the development of the coronary arteries in human embryos, stages 14–19 // *Anat Embryol (Berl)*. 1984. V. 169. № 2. P. 209–218.
- Dettman R.W., Denetclaw W.Jr., Ordahl C.P., Bristow J.* Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart // *Developmental biology*. 1998. V. 193. № 2. P. 169–181.
- Duran C.M.G., Gunning A.J.* The Vascularization of the Heart Valves: A Comparative Study // *Cardiovascular Research*. 1968. V. 2. № 3. P. 290–296.
- Gittenberger-de Groot A.C., Vrancken Peeters M.P., Mentink M.M., Gourdie R.G., Poelmann R.E.* Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions // *Circulation research*. 1998. V. 82. № 10. P. 1043–1052.

- Hutchins G.M., Moore G.W.* Development of the coronary arteries in the embryonic human heart // *Circulation*. 1988. V. 77. № 6. P. 1250–1257.
- Jankowska-Steifer E., Madej M., Niderla-Bielińska J. et al.* Vasculogenic and hematopoietic cellular progenitors are scattered within the prenatal mouse heart // *Histochem Cell Biol*. 2015. V. 143. № 2. P. 153–169.
- Lie-Venema H., Eralp I., Maas S., Gittenberger-De Groot A.C., Poelmann R.E., DeRuiter M.C.* Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium-derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization // *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2005. V. 282 № 2. P. 120–129.
- Lie-Venema H., van den Akker N.M., Bax N.A. et al.* Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development // *The Scientific World Journal*. 2007. V. 7. P. 1777–1798.
- Mandarim-de-Lacerda C.A.* Development of the coronary arteries in staged human embryos (the Paris Embryological Collection revisited) // *An Acad Bras Cienc*. 1990. V. 62. № 1. P. 79–84.
- Männer J.* Embryology of congenital ventriculo-coronary communications: a study on quail-chick chimeras // *Cardiol Young*. 2000. V. 10. № 3. P. 233–238.
- Männer, J.* Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium // *The Anatomical record*. 1999. V. 255. № 2. P. 212–226.
- Mikawa T., Fischman D.A.* Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992. V. 89. № 20. P. 9504–9508.
- Milgrom-Hoffman M., Michailovici I., Ferrara N., Zelzer E., Tzahor E.* Endothelial cells regulate neural crest and second heart field morphogenesis // *Biol Open*. 2014. V. 3. № 8. P. 679–688.
- Pérez-Pomares J.-M., Carmona R., González-Iriarte M. et al.* Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos // *The International journal of developmental biology*. 2002. V. 46. № 8. P. 1005–1013.
- Pérez-Pomares J.M., Mironov V., Guadix J.A. et al.* In vitro self-assembly of proepicardial cell aggregates: an embryonic vasculogenic model for vascular tissue engineering // *The anatomical record. Part A. Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2006. V. 288. № 7. P. 700–713.
- Poelmann R.E., Gittenberger-de Groot A.C., Mentink M.M. et al.* Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras // *Circulation research*. 1993. V. 73. № 3. P. 559–568.
- Ratajska A., Czarnowska E., Kołodzińska A., Kluzek W., Leśniak W.* Vasculogenesis of the embryonic heart: origin of blood island-like structures // *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2006. V. 288. № 3. P. 223–232.
- Ratajska A., Czarnowska E., Kołodzińska A. et al.* New morphological aspects of blood islands formation in the embryonic mouse hearts // *Histochem Cell Biol*. 2009. V. 131. № 3. P. 297–311.
- Red-Horse K., Ueno H., Weissman I.L., Krasnow M.A.* Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells // *Nature*. 2010a. V. 464. № 7288. P. 549–553.
- Rusu M.C., Poalelungi C.V., Vrapciu A.D. et al.* Endocardial tip cells in the human embryo – facts and hypotheses // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 1. P. 0115853.
- Tian X., Hu T., He L., Zhang H. et al.* Peritruncal coronary endothelial cells contribute to proximal coronary artery stems and their aortic orifices in the mouse heart // *PLoS one*. 2013. V. 8. № 11. P. e80857.
- Tian X., Hu T., Zhang H., He L. et al.* Subepicardial endothelial cells invade the embryonic ventricle wall to form coronary arteries // *Cell research*, 2013. V. 23. № 9. P. 1075–1090.
- Tomanek R.J., Ishii Y., Holifield J.S. et al.* VEGF family members regulate myocardial tubulogenesis and coronary artery formation in the embryo // *Circulation research*. 2006. V. 98. № 7. P. 947–953.
- Vrancken Peeters M.P., Gittenberger-de Groot A.C., Mentink M.M., Poelmann R.E.* Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium // *Anatomy and embryology*. 1999. V. 199. № 4. P. 367–378.
- Waldo K.L., Kumiski D.H., Kirby M.L.* Association of the cardiac neural crest with development of the coronary arteries in the chick embryo // *Anat Rec*. 1994. V. 239. № 3. P. 315–331.
- Wu B., Zhang Z., Lui W. et al.* Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling // *Cell*. 2012. V. 151. № 5. P. 1083–1096.

## Histological and Immunocytochemical Investigation of Human Coronary Vessel Development with ANTI-CD34 Antibodies

O. Yu. Pototska

SE Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine, Department of Histology, Dnipropetrovsk, 49000 Ukraine  
e-mail: pototskaya.o.yu@gmail.com

Information about embryonic development of coronary endothelium is the main clue for the creation of new methods in tissue engineering for treatment of ischemic heart diseases. The purpose of the research was to describe human coronary vessel development on early stages of the prenatal ontogenesis. The first step in human coronary vessel development is the formation of endothelium de novo by transformation of some epi-

cardial and, possibly, endocardial cells. The next step is the ingrowth of sinus venosus endothelium in sub-epicardium over ventricles and atria, which gives rise to the coronary vessels. Only after 7 days does the primitive coronary plexus of the heart communicate with aorta (third step). During this period (from Carnegie stage 18th to 19th), some subepicardial vessels invade myocardium and some intramyocardial vessels contact with the heart cavity. Such intercommunications could help in regulation of blood circulation in primitive coronary plexus before establishment of effective contacts between arterial and venous vessels—excess of blood could be discharged directly into the heart cavity. Additional population of CD34+ cells were revealed inside condensed mesenchyme of the conotruncus; it participates in the formation of vasa vasorum in the aorta. Epicardium and sinus venosus generate endothelium of coronary vessels by neovasculo- and angiogenesis, respectively. During a week after ingrowth of vessels from SV and before their ingrowth to the aorta, ventriculo-coronary communications could be found in the heart.

*Keywords:* angiogenesis, conotruncus, condensed mesenchyme, coronary vessels, endothelium, epicardium, human embryos, neovasculogenesis, sinus venosus, Thebesian vessels