

# Morfogeneza naczyń serca na wybranych przykładach

DARIA SKUBISZEWSKA, MAŁGORZATA DZIERŻĘCKA

Katedra Nauk Morfologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Skubiszewska D., Dzierżęcka M.

## Morphogenesis of heart vessels on chosen examples

### Summary

Research studies on the development of the cardiovascular system and its formation during embryologic development have been conducted for a long time. However, such studies have only gained a significant interest less than two decades ago. This can be related to the introduction of immunohistochemical methods, in which endothelium cell markers and their precursors as well as smooth muscle cell markers have been applied, lining the interior surface of a blood vessel wall of a larger diameter. In the process of coronary blood vessel formation two main mechanisms are involved: vasculogenesis and angiogenesis. The formation of vessels occurs in several stages. First a monolayer of endothelial cells begins sprouting to form tubes. These are then transformed into capillaries, veins and arteries.

**Keywords:** heart embryologic development, heart vessels

Badania rozwoju serca, a także poszczególnych jego elementów, w tym również naczyń krwionośnych tego narządu, prowadzone są od ponad stu lat. W ostatnich kilkunastu latach badania te stały się znacznie bardziej intensywne. Wielu badaczy zajmowało się śledzeniem kolejnych etapów rozwoju naczyń serca i ich morfologii oraz wyjaśnianiem mechanizmów regulujących ten proces. Początkowe prace opierały się przede wszystkim na tradycyjnym barwieniu skrawków tkanekowych hematoksyliną i eozyną (H&E) (7), a także na nastrzykiwaniu naczyń serca różnymi substancjami kontrastowymi, np. tuszem z dodatkiem żelatyny (18). Metody te nie pozwalały jednak na dokładne prześledzenie rozwoju i morfologii naczyń serca. W podstawowym barwieniu histologicznym H&E komórki śródbłonna wyścielającego naczynia krwionośne nie są bowiem widoczne, a pozostałe elementy strukturalne tworzące ich ściany nie wybarwiają się w charakterystyczny sposób. Zastosowanie tej metody pozwala tylko na analizę naczyń dużego kalibru, natomiast małe naczynia tętnicze czy żyłne, a zwłaszcza naczynia włosowate nie są widoczne. Nastrzykiwanie naczyń serca substancjami kontrastującymi jest możliwe dopiero w późniejszych etapach rozwoju, a więc wtedy, gdy system krążenia wieńcowego jest już połączony z krążeniem ogólnym zarodka. Mimo iż żadna z tych metod nie była w pełni satysfakcjonująca i nie dawała możliwości obserwowania całkowitego rozwoju naczyń, znajdują one nadal zastosowanie we współcześnie prowadzonych pracach badawczych.

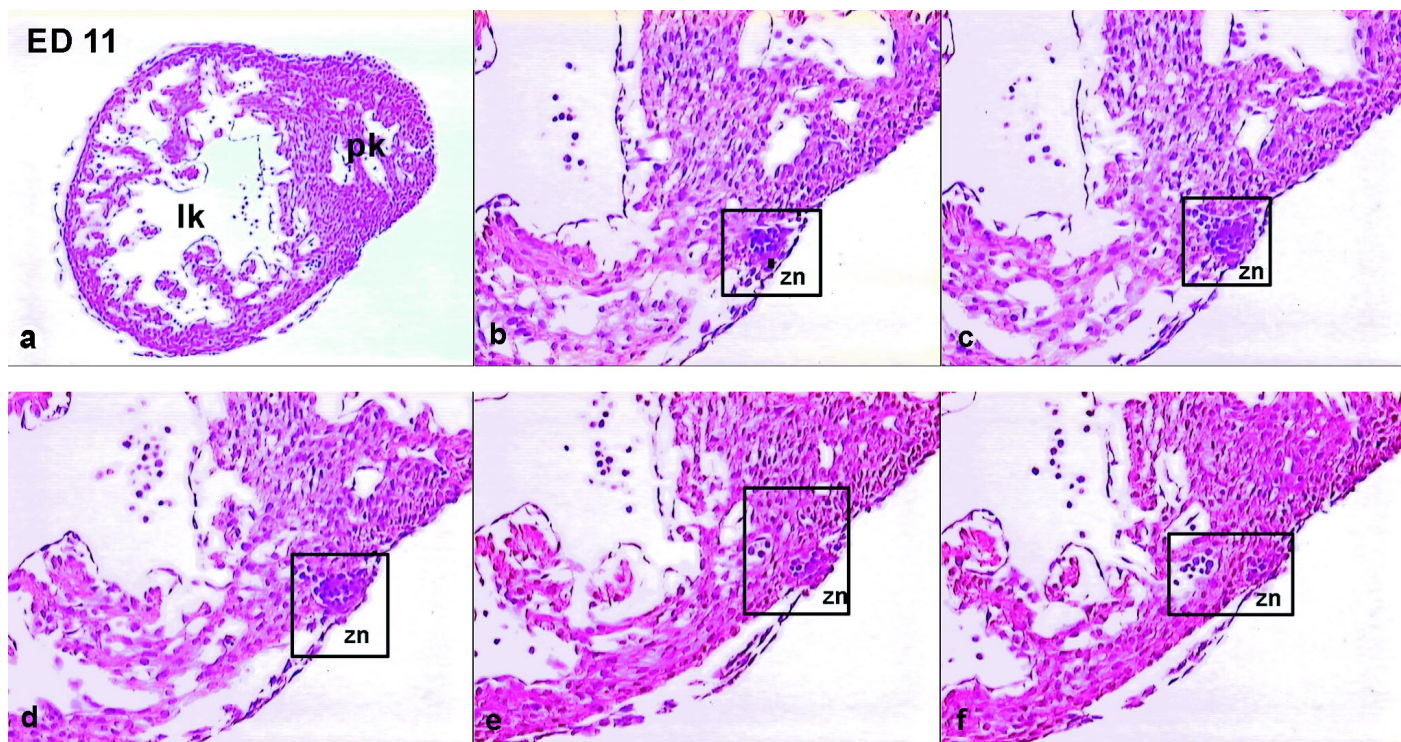
Bardziej precyzyjne poznanie struktur mogło być przeprowadzone dopiero wtedy, gdy zaczęto stosować

metody immunohistochemiczne, w których wykorzystywane były swoiste znaczniki komórek śródbłonna naczyniowego i ich prekursorów oraz markery miocytów gładkich, wchodzących w skład ściany naczynia krwionośnego o większej średnicy (21). Markery te są różne dla komórek poszczególnych gatunków zwierząt. Wśród znaczników najczęściej dziś stosowanych można wyróżnić następujące:

- monoklonalne przeciwciało QH1; jest ono swoiste dla komórek śródbłonna naczyniowego u przepiórki japońskiej (*Coturnix coturnix japonica*). Po raz pierwszy zastosowano je w 1987 roku (13). Od tego czasu rozpoczęły się intensywne badania nad lokalizacją naczyń krwionośnych serca we wczesnych etapach rozwoju u tego gatunku (6, 14, 26, 27);

- lektyna pochodząca z *Griffonia simplicifolia I* (22), będąca znacznikiem, między innymi, komórek śródbłonna naczyniowego u wielu gatunków zwierząt, wykazuje powinowactwo również do błony podstawnej, dlatego przy zastosowaniu tego markera wybarwia się cała ściana naczynia włosowatego i naczynia większej średnicy; lektyna ta łączy się z resztą cukrową znajdującą się na powierzchni komórki; przy użyciu tego znacznika obserwować można zarówno naczynia tętnicze, jak i żyłne dużej i małej średnicy oraz kapilary;

- przeciwciało anti-PECAM 1 (*anti-Platelet Endothelial Cellular Adhesion Molekule*) (19, 20, 23) jest skierowane przeciw cząsteczce adhezyjnej PECAM 1 znajdującej się na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego i na prekursorach tych komórek, zastosowanie tego markera pozwala na analizę rozwoju naczyń;



Ryc. 1. Serce płodu myszy w 11. dobie życia płodowego (ED11), skrawki krojone seryjnie (a, b, c, d, e, f) i barwione H&E; lk – lewa komora serca; pk – prawa komora serca. Zaznaczone w bruzdzie międzykomorowej podzatkowej zawiązki naczyń żylnych (zn) – pow.  $52 \times$  i  $260 \times$

– przeciwciało anti-alfa-aktyna jest swoiste dla alfa-aktyny białka kurczliwego występującego w miocytach gładkich dużych naczyń krwionośnych; zastosowanie tego znacznika jest możliwe dopiero wtedy, gdy tworzy się w ścianie naczynia błona środkowa, bowiem w tej właśnie warstwie występują miocyty gładkie;

– przeciwciało anti-miozyna skierowane jest przeciw łańcuchom ciężkim miozyny będącej białkiem kurczliwym miocytów gładkich naczyń krwionośnych, które pojawia się pod koniec życia płodowego (26);

– przeciwciało 1E12 swoiste jest dla miocytów gładkich, ale nie barwiące kardiomiocytów (26).

Wiedza na temat rozwoju naczyń serca w czasie życia płodowego powiększyła się znacząco, gdy na początku lat 90. ubiegłego stulecia zastosowano metodę międzygatunkowych chimer komórkowych (14). Metoda ta polega na wszczepieniu fragmentów zawiązków nasierdza i wątroby płodowej pochodzących od przepiórki do jamy osierdziejowej rozwijającego się zarodka kurczęcia i śledzeniu migracji przeszczepionych komórek. Komórki dawcy i biorcy można łatwo odróżnić od siebie, ponieważ komórki przepiórcze zawierają w jądrze charakterystyczne grudki chromatyny. W badaniach nad waskularyzacją serca, a bardziej szczegółowo nad pochodzeniem komórek śródbłonna naczyniowego ważne miejsce zajmuje metoda, oparta na wykorzystaniu retrowirusów niosących gen reporterowy (gen na  $\beta$ -galaktozydazę) jako znaczników prekursorów komórek śródbłonna (10). Różnorodność wszystkich metod stosowanych dziś w badaniach serca jest bardzo duża, a ciągle wprowadzane są nowe. Prowadzone są obserwacje na różnych ga-

tunkach zwierząt, wśród których poczesne miejsce zajmują kura i przepiórka. Ich wyniki mogą przyczynić się także do wyjaśnienia budowy i funkcji serca ptaków w rozwoju pozapłodowym (1). Te dwa gatunki zwierząt są dobrym modelem doświadczalnym, ponieważ ich rozwój płodowy odbywa się poza organizmem matki i dzięki temu pewne czynności można powtórzyć na tym samym zarodku. Liczba badań dotyczących embriogenezy serca i jego naczyń u myszy i szczura zwiększa się także z roku na rok. Gatunki te są dziś często wykorzystywane do badań molekularnych i transgenicznych, dlatego też poznanie u nich prawidłowego rozwoju i budowy serca oraz jego naczyń jest niezbędne.

Serce, podobnie jak każdy narząd w organizmie żywym musi być odżywiane. Do jego komórek muszą być dostarczane odpowiednie ilości tlenu i substancji odżywczych tak, aby mogło ono prawidłowo funkcjonować. W czasie życia płodowego, kiedy serce rozwija się, proces odżywiania tego narządu można podzielić na dwa etapy: przed i po utworzeniu się systemu tętnic wieńcowych i żył serca. W początkowym etapie, a więc jeszcze zanim powstaną te naczynia, odżywianie komórek serca odbywa się na drodze dyfuzji. Możliwe jest to, między innymi, dzięki temu, że ściana takiego rozwijającego się serca jest bardzo cienka i *myocardium* komorowe posiada liczne cienkie wypustki nazywane beleczkami, które zwiększają powierzchnię dyfuzji (9). Przechodzenie cząsteczek tlenu zawartego w krwi przepływającej przez jamy serca odbywa się w kierunku od wsierdza do nasierdza. Z czasem warstwa *myocardium* rozbudowuje się

i stanowi naturalną barierę dla cząsteczek tlenu. Wówczas funkcję odżywiania serca przejmują pierwotny układ naczyń wieńcowych, powstający wokół stożka serca, zatoki żyłnej i bruzdy przedsionkowo-komorowej (26). Przepływająca przez te naczynia krew dostarcza do komórek serca potrzebny tlen (27). Naczynia serca są więc niezbędne do tego, by mięsień sercowy mógł prawidłowo rozwijać się i wykonywać swoją pracę.

W proces tworzenia naczyń wieńcowych zaangażowane są dwa podstawowe mechanizmy: waskulogeneza i angiogeneza (2, 17). Waskulogeneza polega na tworzeniu nowych naczyń z prekursorowych komórek śródbłonka, czyli angioblastów. Natomiast w angiogenezie naczynia powstają przez tworzenie odgałęzień od istniejących już wcześniej naczyń (2-4, 29).

W rozwoju naczyń wyróżnia się kilka etapów. Początkowo pojawiają się pojedyncze, oddzielne struktury, które są zawiązkami naczyń (15, 17). Mają one postać skupisk dwóch rodzajów komórek: erytroblastów i otaczających je angioblastów. Są one zlokalizowane pod nasierdziem (ryc. 1). Kolejno zawiązki te łączą się ze sobą w większe struktury, tworzą cewy i z nich kształtują się kapilary, tętnice i żyły. Zawiązki naczyniowe rosną odpowiednio w stronę aorty, zatoki wieńcowej i prawego przedsionka (29), łączą się z nimi i tym samym następuje połączenie systemu wieńcowego z krążeniem ogólnym zarodka. Wielu badaczy podjęło prace mające na celu dokładne określenie pochodzenia komórek tworzących ścianę naczyń krwionośnych serca (5, 11, 14). Według informacji pochodzących z 1954 r., komórki śródbłonka *endothelium* naczyń wieńcowych wywodzą się z nabłonka wyściełającego wsierdzie – *endocardium*, który wpukła się do *myocardium* i tworzy odgałęzienia (8). W 1992 r. w badaniach użyto retrowirusów zawierających gen reporterowy. Retrowirusy te były znacznikami prekursorów komórek śródbłonka (10). Zostały one podane w określony obszar serca ptaka, a następnie obserwowano ich przemieszczanie wraz z prekursorami komórek śródbłonka. Śledzenie tych komórek możliwe było dzięki zastosowaniu odpowiednich metod histochemicznych, w wyniku których pojawiał się barwny odczyn na  $\beta$ -galaktozydazę. Rok później przeprowadzone zostały badania z wykorzystaniem chimer międzygatunkowych (14). Te dwa doświadczenia zaprzeczyły wcześniejszej tezie, że wsierdzie jest źródłem komórek śródbłonka, a udowodniły, że prekursorzy tych komórek pochodzą z okolic wątroby płodowej (14) lub z narządu przednasierdziowego i za jego pomocą przenoszone są do serca (10, 14). Doświadczenia z użyciem chimer międzygatunkowych wykazały także, że narząd przednasierdziowy jest bardzo ważną strukturą, ponieważ bierze udział w transportowaniu prekursorów komórek śródbłonka do serca, a także jest tkanką, z której one pochodzą. Narząd przednasierdziowy jest strukturą istniejącą tylko w czasie życia płodowego i stanowi również zawiązek nasierdzia –

*epicardium*, które pokrywa całą powierzchnię serca (29). Rozwój naczyń serca jest ściśle związany z rozwojem nasierdzia (12). Pojawienie się *epicardium* jest warunkiem niezbędnym do rozpoczęcia procesu waskularyzacji serca. Narząd przednasierdziowy ma różną budowę oraz lokalizację u ssaków i ptaków. U ssaków narząd ten związany jest z przegrodą poprzeczną (29, 25), a u ptaków, pozbawionych tej przegrody, lokalizuje się na powierzchni brzusznej rogów zatoki żyłnej (24). U obu wymienionych gromad kręgowców do tych miejsc przylega wątroba płodowa. Narząd przednasierdziowy pokryty jest komórkami płaskimi powstałymi z komórek nabłonka osierdzia i u ssaków ma postać pęcherzykowatych nacieków komórkowych, a u ptaków palczastych wyrostków (15). Narząd ten w czasie życia płodowego rozprzestrzenia się na powierzchni serca, tworząc pokrywę, która ulega przekształceniu w nasierdzie. W tej rozszerzającej się pierwotnej pokrywie nasierdziowej są obecni prekursorzy komórek tworzących ściany naczyń serca – angioblasty, hematoblasty, niezróżnicowane komórki mezenchymy i komórki nabłonkowe (24).

Najnowsze badania wykazują, że prekursorzy komórek tworzących ścianę naczynia krwionośnego serca, a więc prekursorzy komórek mięśni gładkich wchodzących w skład ściany naczynia dużego kalibru i fibroblasty przydanki pochodzą z komórek nabłonka – *mesothelium*, nasierdzia. Te komórki nabłonkowe ulegają transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, w wyniku której tracą swoje właściwości nabłonkowe i stają się komórkami mezenchymatycznymi. Następnie migrują do miejsc, w których powstawać będą naczynia krwionośne serca, a po zetknięciu z komórkami śródbłonka przekształcają się w komórki mięśniowe gładkie i fibroblasty przydanki (5, 11, 28). Prekursorzy fibroblastów przemieszczają się także do miejsc, w których powstaną zastawki serca i pierścienie włókniste, gdzie stanowią elementy składowe ich ścian (15).

Po utworzeniu przez komórki śródbłonka cienkiej ściany naczynia krwionośnego rozpoczyna się proces tworzenia błony środkowej. Polega on na przyłączeniu się komórek mezenchymatycznych będących prekursorami miocytów gładkich do tej pierwotnej ściany naczynia. Dzieje się to jeszcze zanim dojdzie do połączenia systemu wieńcowego z krążeniem ogólnym zarodka, a więc nim dwie tętnice wieńcowe wytworzą połączenie ze światłem aorty (16). Według niektórych badaczy, udrożnienie części tętniczej systemu wieńcowego z aortą i części żyłnej z prawym przedsionkiem u przepiórki japońskiej pojawia się w tym samym momencie (26). Gdy już to połączenie istnieje, rozpoczyna się krążenie krwi w systemie naczyń wieńcowych. W tym samym czasie rozwoju błona środkowa i błona zewnętrzna tętnic zaczyna się różnicować. W ciągle różnicujących się miocytach gładkich, tworzących błonę środkową pojawiają się pierwsze cechy fenotypu komórek kurczliwych (16). Proces różnico-

wania poszczególnych komórek wchodzących w skład błony środkowej rozpoczyna się od proksymalnego odcinka tętnicy i przechodzi w kierunku koniuszka serca. Według dotychczasowych informacji (15, 27), pierwszym białkiem kurczliwym pojawiającym się w miocytach gładkich błony środkowej tętnic wieńcowych jest  $\alpha$ -aktyna miocytów gładkich ( $\alpha$ -SMA). Natomiast w błonie środkowej żył białko to pojawia się kilka dni później, u szczurów w 18. dobie życia płodowego. Kolejnym białkiem pojawiającym się w błonie środkowej jest odmiana miozyny miocytów gładkich (SM-MHC) (15). Wśród badanych antygenów często występuje antygen 1E12 należący do  $\alpha$ -aktynin. Antygen ten nie jest obecny w miocytach gładkich na całej długości tętnicy wieńcowej, zanika w miarę oddalania się od aorty. U kur i przepiórek 1E12 pojawia się przed SM-MHC. U ptaków tych ulega on także ekspresji w błonie środkowej naczyń żylnych serca (26, 27), podczas gdy u szczurów w żyłach nie występuje (15). Oprócz tego, że komórki tworzące błonę środkową naczyń różnią się między gatunkami, to również pewne odmienności są obserwowane między błoną środkową tętnicy i żyły (26). Zdaniem tych badaczy, u przepiórki błona środkowa istnieje w żyłach tylko w warstwie podnasilczowej, natomiast w *myocardium* zanika. W tętnicach natomiast błona środkowa rozciąga się na całej długości naczynia.

Choć na całym świecie prowadzone są badania dotyczące rozwoju naczyń serca i ich budowy, to nadal wiele zagadnień dotyczących szczególnie rozwoju i budowy naczyń żylnych jest słabo poznanych. Zainteresowanie rozwojem naczyń ma również swoje ważne konsekwencje w klinice kardiologicznej, niekiedy bowiem dochodzi do zaburzeń formowania się naczyń w rozwijającym sercu. Poznanie morfogenezy naczyń serca jest zatem szczególnie istotne dla zrozumienia niektórych mechanizmów rządzących tym procesem oraz zaburzeń w ich prawidłowej strukturze i przebiegu.

## Piśmiennictwo

- Bartyzel B. J., Kobryń H., Przespolewska H.: Serce ptaków – elementy anatomii i fizjologii. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 246-248
- Bernanke D. H., Velkey J. M.: Development of the coronary blood supply: changing concepts and current ideas. *Anat. Rec.* 2002, 269, 198-208.
- Coffin J. D., Poole T. J.: Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordial in quail embryos. *Dev.* 1988, 102, 735-748.
- Coffin J. D., Poole T. J.: Endothelial cell origin and migration in embryonic heart and cranial blood vessel development. *Anat. Rec.* 1991, 231, 383-395.
- Dettman R. W., Denetclaw W. Jr., Ordahl C. P., Bristow J.: Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblast, and intermyocardial fibroblast in the avian heart. *Dev. Biol.* 1998, 193, 169-181.
- Kattan J., Dettman R. W., Bristow J.: Formation and remodeling of the coronary vascular bed in the embryonic avian heart. *Dev. Dyn.* 2004, 230, 34-43.
- Lewis F. T.: The question of sinusoids. *Anat. Anz.* 1904, 25, 261-269.
- Licata R. H.: Human embryonic heart in the ninth week. *Am. J. Anat.* 1954, 94, 73-125.
- Manasek F. J.: Embryonic development of the heart. I. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo. *J. Morphol.* 1968, 125, 329-366.
- Mikawa T., Fischman D. A.: Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Dev. Biol.* 1992, 89, 9504-9508.
- Mikawa T., Gourdie R. G.: Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev. Biol.* 1996, 174, 221-232.
- Morabito C. J., Kattan J., Bristol J.: Mechanisms of embryonic coronary artery development. *Curr. Opin. Cardiol.* 2002, 17, 235-241.
- Pardanaud L., Altmann C., Kitos P., Dieterlen-Lievre F., Buck C. A.: Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studies with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Dev.* 1987, 100, 339-349.
- Poelmann R. E., Gittenberger-de-Groot A. C., Mentink M. M. T., Bokenkamp R., Hogers B.: Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in Chicken-Quail Chimeras. *Circ. Res.* 1993, 73, 559-568.
- Ratajska A.: Rozwój osobniczy naczyń wieńcowych oraz niektóre zagadnienia jego regulacji. *Post. Biol. Kom.* 2002, 29, 503-525.
- Ratajska A., Fiejka E.: Prenatal development of coronary arteries in the rat: morphologic pattern. *Anat. Embryol.* 1999, 200, 533-540.
- Rongish B. J., Torry R. J., Tucker D. C., Tomanek R. J.: Neovascularization of embryonic rat hearts cultured in oculo closely mimics in utero coronary vessel development. *J. Vasc. Res.* 1994, 31, 205-215.
- Rychter Z., Ostadal B.: Mechanism of the development of coronary arteries in the chick embryo. *Folia Morphol.* 1971, 19, 113-124.
- Schlaeger T. M., Qin Y., Fujiwara Y., Magram J., Sato T. N.: Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Dev.* 1995, 121, 1089-1098.
- Scholz D., Schaper J.: Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells. *Cell. Tis. Res.* 1997, 290, 623-631.
- Skubiszewka D.: Morfogeneza żył serca myszy i szczura w rozwoju płodowym oraz ich topografia u osobników dorosłych. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 2005.
- Tomanek R. J., Haung L., Suvarna P. R., O'Brien L. C., Ratajska A., Sandra A.: Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc. Res.* 1996, 31, E116-E126.
- Vecchi A., Garlanda C., Lampugnani M. G., Resnati M., Matteucci C., Stoppacciaro A., Schmurch H., Risau W., Ruco L., Mantovani A., Dejana E.: Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur. J. Cell. Biol.* 1994, 63, 247-254.
- Virág S., Gittenberger-de-Groot A. C., Poelmann R. E., Kalman F.: Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat. Embryol.* 1993, 188, 381-393.
- Virág S., Kalman F., Gittenberger-de-Groot A. C., Poelmann R. E., Moorman F. M.: Angiogenesis and hematopoiesis in the epicardium of the vertebrate embryo heart, [w:] Bockman D. E., Kirby M. L. (wyd.): Embryonic origin of defective heart development. *Ann. NY Acad Sci USA* 1990, 588, 455-458.
- Vrancken Peeters M.-P. F. M., Gittenberger-de-Groot A. C., Mentink M. M. T., Hungerford J. E., Little C. D., Poelmann R. E.: Differences in development of coronary arteries and veins. *Cardiovasc. Res.* 1997 (a), 36, 101-110.
- Vrancken Peeters M.-P. F. M., Gittenberger-de-Groot A. C., Mentink M. M. T., Hungerford J. E., Little C. D., Poelmann R. E.: The Development of the coronary vessels and their differentiation into arteries and veins in the embryonic quail heart. *Dev. Dyn.* 1997 (b), 208, 338-348.
- Vrancken Peeters M.-P. F. M., Gittenberger-de-Groot A., Mentink M. M. T., Poelmann R. E.: Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat. Embryol.* 1999, 199, 367-378.
- Wada A. M., Willet S. G., Bader D.: Coronary vessel development. A unique form of vasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 2138-2145.

Adres autora: dr Daria Skubiszewska, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: mizz@gazeta.pl