

УДК: 591.88:611.12:612.178

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.2.261

S100 β -ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ ГЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ СЕРДЦА КРЫСЫ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Чумасов Е.И. ^{1,2} – д-р биол. наук, проф. каф. биологии, экологии, гистологии, ст. науч. сотр. отдела общей и частной морфологии (ORCID 0000-0003-4859-6766); **Петрова Е.С.** ² – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела общей и частной морфологии (ORCID 0000-0003-0972-8658); **Коржевский Д.Э.** ² – д-р мед. наук, профессор РАН, зав. отделом общей и частной морфологии (ORCID 0000-0002-2456-8165).

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

ua1ct@mail.ru

Ключевые слова: сердце, крыса в возрасте 7 сут, белок S100 β , белок PGP 9.5, нейролеммоциты, иммуногистохимия.

Keywords: heart, 7-day-old rat, S100 β protein, PGP 9.5 protein, neurolemmocytes, immunohistochemistry.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Поступила: 13.05.2024

Принята к публикации: 10.06.2024

Опубликована онлайн: 28.06.2024



РЕФЕРАТ

Изучение иннервации главного органа сердечно-сосудистой системы – сердца, является важной проблемой современной нейробиологии. Большинство исследований в этой области посвящено изучению нервных структур человека и животных, в меньшей степени изучаются глиальные клетки. Тем не менее, глия играет важную роль в поддержании метаболизма нервных аппаратов и, вырабатывая ряд биологически активных веществ, оказывает влияние на состояние тканей и органов как в норме, так и при патологии. Цель настоящей работы – изучить глиальные клетки в сердце крысы в ранний постнатальный период развития с применением иммуногистохимического маркера – белка S100 β . Объектом исследования служило сердце крыс Вистар в возрасте семи суток постнатального развития (P7) ($n=12$). Нервные структуры сердца крыс P7 изучали с помощью иммуногистохимического выявления нейрального маркера – белка PGP 9.5. Для идентификации клеток глии применяли иммуногистохимическое выявление белка S100 β . Белок S100 β принадлежит к группе кальций-связывающих белков, экспрессируется в глиальных клетках центральной и периферической нервной системы. В ходе исследования выяснилась существенная разница в иннервации верхнего и среднего отделов сердца крыс P7. Только в правом предсердии была обнаружена выраженная концентрация нервных структур, главным образом, в области синусного узла. С помощью селективного метода в сердце установлен один тип глии – нейролеммоциты. Кроме того, отмечена важная особенность в развитии глии сердца. Установлено, что у крыс P7 клетки проэпикарда экспрессируют белок S100 β ,

свойственный нейролеммоцитам. Выдвинута гипотеза о возможности возникновения части глиальных клеток миокарда правого предсердия и правого желудочка из прогениторных мультипотентных клеток проэпикарда, производного висцерального листка мезодермы путём эпителиально-мезенхимальной трансформации.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Исследование иннервации сердца позвоночных животных и человека – важная проблема современной нейробиологии. Несмотря на то, что изучение нервных структур органов сердечно-сосудистой системы продолжается в течение многих десятилетий, основное внимание в них уделялось нейронам, нервным сплетениям, ганглиям, волокнам и терминалям. Данные о глии, сопровождающей эти структуры, фрагментарны. Ранее считалось, что функции нейроглии заключаются только в обеспечение жизнедеятельности нейронов, в настоящее время показано, что это многофункциональная клеточная популяция [2, 9, 10], однако многие вопросы, касающиеся ее морфологических и функциональных особенностей, не исследовались. Малоизученными остаются вопросы происхождения, развития и дифференцировки нейроглии в различных системах органов и тканей, в том числе в центральном органе сердечно-сосудистой системы – сердце. В предыдущих наших работах, выполненных с применением современных иммуногистохимических методов, нами были описаны нервные аппараты в сердце крыс разного возраста [1]. Глиальные клетки при этом не исследовались. Цель настоящей работы – изучить глиальные клетки в сердце крысы в ранний постнатальный период развития с применением иммуногистохимического глиального маркера белка S100β.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Работа выполнена на крысах Вистар в возрасте 7 сут (P7) ($n=12$). При работе с животными соблюдали международные правила по гуманному обращению с экспериментальными животными. Исследование было одобрено ЛЭК ИЭМ (№ 2/22 от 06.04.2022). Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [4]. После обезвоживания

в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле материал заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Иммуногистохимические (ИГХ) реакции проводили на парафиновых срезах. Для исследования клеток глии периферической нервной системы применяли ИГХ-реакцию на белок S100β [2]. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела к белку S100β (разведение 1: 600; Dako, Дания). Для выявления нервных волокон применяли поликлональные кроличьи антитела к белку PGP 9.5 (разведение 1: 200; Spring Bioscience, США) [1]. Первичные антитела в нужном разведении наносили на срезы и инкубировали в течение 1 сут при температуре 27°C. В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). Для визуализации продукта реакции при микроскопии в проходящем свете использовали хромоген 3'-диаминобензидин из набора DAB⁺ (Agilent, США). Часть препаратов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю и астровым синим. Для осуществления негативного контроля ИГХ-реакций на часть срезов вместо раствора первичных антител наносили их разбавитель (Dako, Denmark; сейчас Agilent, USA). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

На гистологических препаратах сердечной области крыс P7 видно, что в разных участках околосердечной соединительной ткани встречаются ганглии и микроганглии, островки и группы хроматинных клеток, фрагменты крупных нервных стволиков и пучков, образующих различной степени плотности сплетения. С помощью ИГХ-реакций на белок PGP 9.5 и белок S100β на срезах выявля-

ются соответственно нервные и глиальные элементы. В проводящем миокарде венозного синуса и проводящем миокарде пучка Гиса, который локализуется в области перехода миокарда правого предсердия в левое через фиброзное кольцо, выявляется особенно густая сеть из нервных сплетений, стволов и пучков, ганглиев и терминальных сетей варикозных аксонов (синаптических окончаний, иннервирующих пучки проводящего миокарда).

Содержащие S100 β глиальные клетки являются нейролеммоцитами - клетками глии, характерной для нервных волокон автономной нервной системы. На рисунке 1, а и 1, б представлены данные сравнительного анализа обоих ИГХ-методов при малых увеличениях микроскопа (x40). Результаты показали комплементарность плотности нервных и глиальных структур, что свидетельствует о раннем развитии нейро-глиальных взаимоотношений в околосердечной области молодых крыс.

В настоящем исследовании отмечена существенная разница в иннервации верх-

него и среднего отделов сердца крыс Р7. Только в правом предсердии была обнаружена выраженная концентрация нервных структур, главным образом, в области СУ. В остальных отделах в изученный срок развития крысы еще отсутствуют четкие признаки наличия иннервации тканей эндокарда, миокарда и эпикарда.

Установлено, что эпикард у крысы в эмбриональный и ранний постнатальный период развития имеет незрелый вид и представляет собой закладку дефинитивного эпикарда, называемую проэпикардом [3, 6]. Он состоит из одного слоя сильно уплощенных клеток с овальным ядром и цитоплазмой, селективно окрашивающейся в черный цвет с помощью ИГХ-реакции на белок S100 β (рис. 2). Как показано в наших предыдущих работах, его клетки также экспрессируют белок PGP 9.5 [3].

Нами выявлены признаки миграции клеток проэпикарда в миокард. В некоторых участках хорошо видны изменения формы клеток, выселение их из пласта в

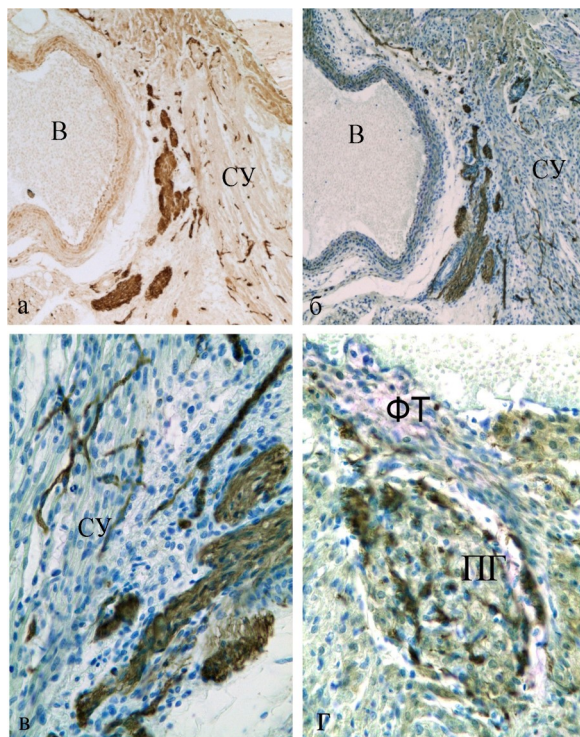


Рисунок 1 – Нервные и глиальные структуры в области венозного синуса крысы в возрасте 7 сут постнатального развития.

а – PGP 9.5⁺ нервные сплетения, состоящие из парасимпатических нервных структур, б, в, г – иммуноположительные глиальные сплетения, состоящие из нейролеммоцитов.

В – краниальная полая вена, СУ- проводящий миокард синусового узла, ФТ – ткань фиброзного кольца, ПГ – пучок Гиса. Иммуногистохимическая реакция на PGP 9.5 (а) и на белок S100 β (б-г), подкраска толуидиновым синим (б-г). x40 (а, б); x100 (в, г).

субэпикардальное пространство и преобразование тел этих клеток в отростчатые мезенхимальные элементы (рис. 2, а). Прослеживаются также признаки их проникновения вглубь миокарда и установления тесных взаимоотношений с тончайшими пучками аксонов субэпикардального нервного сплетения, формирование которого совпадает по времени с началом формирования нейролеммоцит/аксонных связей и появлением основной терминальной синаптической сети окружающей дифференцирующиеся миокардиоциты (рис. 2, в).

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что нейро-глиальные взаимоотношения развиваются в околосердечной области и в сердце достаточно рано. У крыс в возрасте 7 сут $S100\beta^+$ глиальные клетки обнаружены в пучках миелиновых волокон вагусного ствола, нейролеммоциты немиелинизированных аксонов выявлены в парасимпатических и симпатических нервных сплетениях. Глиальные элементы терминальных сетей, состоящих из нервных волокон Ремака, составляют популяцию нейролеммоцитов, которые некоторые авторы называют «клетками Кахала» [7, 8].

Известно, что проэпикард играет решающую роль в морфогенезе сердца [3, 5]. После формирования проэпикарда на границе прогениторного эпителия и миокарда происходит эпителиально-мезенхимальная трансформация: часть

клеток проэпикарда мигрирует в миокард и дифференцируется в фибробласты, эндотелиоциты и гладкомышечные клетки [5]. В недавно опубликованных исследованиях описано формирование кластеров сердечного хряща из проэпикардальных клеток, как *in vivo*, так и *in vitro* [6].

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что $S100\beta$ -иммунопозитивные клетки на изучаемом сроке развития в большом количестве обнаружены в области проводящего миокарда синусного узла и пучка Гиса. ИГХ-изучение формирования нейролеммоцитов в миокарде сердца крысы позволило нам высказать предположение о том, что проэпикард, состоящий из мультипотентных клеток-предшественников, может быть источником и нейролеммоцитов. В пользу этого предположения можно трактовать полученные данные о миграции $S100\beta^+$ клеток проэпикарда в толщу миокарда. В связи с этим источником $S100\beta^+$ клеток нейролеммоцитарного ряда могут служить разные отделы мезодермы (париетального и висцерального листков): во-первых, мезенхимные клетки эктомезодермы нервного гребня вагусного нерва ЭНС; во-вторых, эктомезенхима нервной трубки, на уровне спинного мозга (нейролеммоциты спинномозговых нервов); в-третьих, мезенхима висцерального листка закладки мезодермы - однослойного эмбрионального мультипотентного эпителия проэпикарда сердца

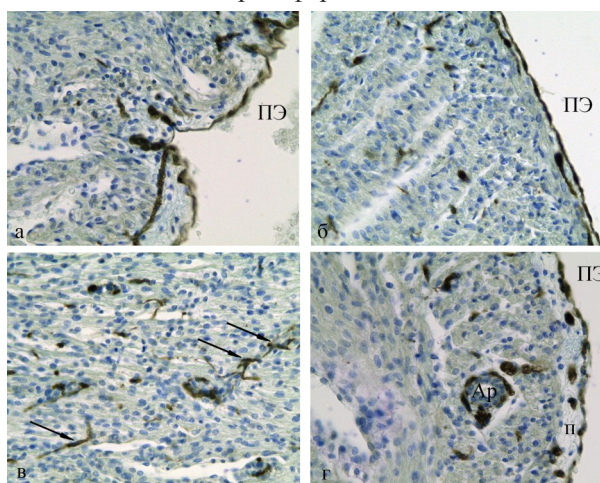


Рисунок 2 – Прогениторные глиальные элементы, мигрирующие из субэпикардального пространства в миокард правого предсердия крысы P7. ПЭ- однослойный эпителий проэпикарда; П – пространство между субэпикардальным эпителием и миокардом правого предсердия; Ар – артерия, ↑↑ – отростчатые леммобласты. Иммуногистохимическая реакция на белок $S100\beta$, подкраска толуидиновым синим. $\times 400$.

(нейролеммоциты субэпикардального нервного сплетения). Предположительно глия автономной нервной системы сердца, в отличие от нейроглии ЦНС, на ранних стадиях развития крысы происходит не из эктодермы, а из предшественников мезенхимы висцерального листка мезодермы.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

1. С помощью ИГХ-реакций на белок PGP 9.5 и на белок S100 β на обзорных гистологических препаратах и при микроскопическом анализе срезов через все сердце крысы P7 установлены морфологические признаки иннервации и наличие нервных структур (нервов, ганглиев, широкотеллистых сплетений, синаптических терминальных сетей), а также разнообразие глиальных клеток в области правого предсердия.

2. Отмечено, что в миокарде левого предсердия и желудочков крыс на стадии развития P7 иннервация выражена слабо: выявлены лишь одиночные арборизации аксонов, находящихся на стадиях роста.

3. Установлено, что у крыс P7 клетки проэпикарда экспрессируют белок S100 β , свойственный нейролеммоцитам. Выдвинута гипотеза о возможности возникновения части глиальных клеток миокарда правого предсердия и правого желудочка из прогениторных мультипотентных клеток проэпикарда, производного висцерального листка мезодермы, путём эпителиально-мезенхимальной трансформации.

S100 β -IMMUNOPOSITIVE GLIAL CELLS OF THE RAT HEART IN EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS

Chumasov E.I.^{1,2} – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Biology, Ecology, Histology, Senior Researcher. Department of General and Private Morphology (ORCID 0000-0003-4859-6766); **Petrova E.S.**² – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher. Department of General and Private Morphology (ORCID: 0000-0003-0972-8658); **Korzhevskii D. E.**² – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Russian Academy of Sci-

ences, Head of Department of General and Private Morphology (ORCID: 0000-0002-2456-8165)

¹St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

²Institute of Experimental Medicine

*ualct@mail.ru

Financing: This work was state budget funded and implemented within the governmental assignment to the Institute of Experimental Medicine.

ABSTRACT

The study of the innervation of the main organ of the cardiovascular system, the heart, is an important problem of modern neurobiology. Most research on this topic is devoted to the study of nervous structures in humans and animals; glial cells are studied less. Nevertheless, glia plays an important role in maintaining the metabolism of the nervous apparatus and, by producing biologically active substances, affects the state of tissues and organs, both normally and in pathology. The purpose of this work is to study glial cells in the rat heart in the early postnatal period of development using an immunohistochemical marker, the S100 β protein. The object of the study was the heart of Wistar rats at the age of seven days of postnatal development (P7) (n=12). Using immunohistochemical detection of a neural marker - the PGP 9.5 protein, the neural structures of the heart of P7 rats were studied. To identify glial cells, immunohistochemical detection of the S100 β protein was used. The S100 β protein belongs to the group of calcium-binding proteins and is expressed in glial cells of the central and peripheral nervous system. The study revealed a significant difference in the innervation of the upper and middle parts of the heart of P7 rats. Only in the right atrium was a pronounced concentration of nerve structures found, mainly in the region of the sinus node. It was established that in P7 rats, proepicardial cells express the S100 β protein, characteristic of neurolemmocytes. A hypothesis has been put forward about the pos-

sibility of developing part of the glial cells of the myocardium of the right atrium and right ventricle from progenitor multipotent cells of the proepicardium through epithelial-mesenchymal transformation.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Чумасов, Е. И. Исследование нервных аппаратов сердца крыс различного возраста с помощью иммуногистохимических маркеров / Е. И. Чумасов, А. Л. Алексеенко, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский // *Международный вестник ветеринарии*. 2017. – № 1. – С. 41-46. Режим доступа: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_28907645_37354257.pdf
2. Чумасов, Е. И. Патологические изменения глиальных клеток в энтеральной нервной системе толстой кишки при хроническом медленно-транзитном запоре / Е. И. Чумасов, Н. А. Майстренко, П. Н. Ромашенко, В. Б. Самедов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский // *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023. – Т. 43. – № 6. – С. 191–202. – DOI 10.18699/SSMJ20230624. Режим доступа: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_56659130_32858102.pdf
3. Чумасов, Е. И. Прозепикард новорожденной крысы как один из возможных источников образования сосудов сердца / Е. И. Чумасов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский // В сборнике: *Вопросы морфологии XXI века. Сборник трудов. Под редакцией И.А. Одинцовой, С.В. Костюкевича*. Санкт-Петербург, 2018. – С. 254-256. Режим доступа: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_36933786_99431130.pdf
4. Grigorev, I. P. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review) / I. P. Grigorev, D. E. Korzhevskii // *Sovrem Tehnologii Med*. 2018. – Vol. 10. – P. 156-165. DOI 10.17691/stm2018.10.2.19. Режим доступа: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_35177254_33276955.pdf
5. Niderla-Bielińska, J. Proepicardium: Current Understanding of its Structure, Induction, and Fate / J. Niderla-Bielińska, E. Jankowska-Steifer, A. Flaht-Zabost, G. Gula, E. Czarnowska, A. Ratajska // *Anat Rec (Hoboken)*. 2019. – Vol. 302. – № 6. – P. 893-903. DOI 10.1002/ar.24028.
6. Palmquist-Gomes, P. In Vivo and In Vitro Cartilage Differentiation from Embryonic Epicardial Progenitor Cells / P. Palmquist-Gomes, E. Marín-Sedeño, A. Ruiz-Villalba, G. A. Rico-Llanos, J. A. Guadix // *Int J Mol Sci*. 2022. – Vol. 23. – № 7. – P. 3614. DOI 10.3390/ijms23073614.
7. Rumessen, J. J. Pacemaker cells in the gastrointestinal tract: interstitial cells of Cajal / J. J. Rumessen, L. Thuneberg // *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996. – Vol. 216. – P. 82-94. DOI 10.3109/00365529609094564
8. Sanders, K. M. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function / K. M. Sanders, S. M. Ward, S. D. Koh // *Physiol Rev*. 2014. – Vol. 94. – №3. – P. 859-907. DOI 10.1152/physrev.00037.2013
9. Verkhratsky, A. The Concept of Neuroglia / A. Verkhratsky, M. S. Ho, R. Zorec, V. Parpura // *Adv Exp Med Biol*. 2019. – Vol. 1175. – P.1-13. DOI 10.1007/978-981-13-9913-8_1
10. Verkhratsky, A., Ho M.S., Parpura V. Evolution of Neuroglia / A. Verkhratsky, M. S. Ho, V. Parpura // *Adv Exp Med Biol*. 2019. – Vol. 1175. – P. 15-44. DOI 10.1007/978-981-13-9913-8_2

REFERENCES

1. Chumasov, E. I. Study of the nervous apparatus of the heart of rats of different ages using immunohistochemical markers / E. I. Chumasov, A. L. Alekseenko, E. S. Petrova, D. E. Korzhevskii // *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2017: 1: 41-46. URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_28907645_37354257.pdf (In Russ.)
2. Chumasov, E. I. Pathological changes in glial cells in the enteric nervous system of the colon during chronic slow-transit constipation / E. I. Chumasov, N. A. Maistrenko, P. N. Romashchenko, V. B. Samedov, E. S. Petrova, D. E. Korzhevskii // *Siberian Scientific Medical Journal*. 2023. 43 (6): 191–202. – DOI 10.18699/SSMJ20230624. URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_56659130_32858102.pdf (In Russ.)

-
3. Chumasov, E. I. Proepicardium of a newborn rat as one of the possible sources of the formation of heart vessels / E. I. Chumasov, E. S. Petrova, D. E. Korzhevskii // In: Questions of morphology of the XXI century / Edited by I. A. Odintsova, S. V. Kostyukovich. St. Petersburg, 2018: 254-256. URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_36933786_99431130.pdf (In Russ.)
4. Grigorev, I. P. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review) / I. P. Grigorev, D. E. Korzhevskii // *Sovrem Tehnologii Med.* 2018: 10: 156-165. DOI 10.17691/stm2018.10.2.19. URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_35177254_33276955.pdf
5. Niderla-Bielińska, J. Proepicardium: Current Understanding of its Structure, Induction, and Fate / J. Niderla-Bielińska, E. Janowska-Steifer, A. Flaht-Zabost, G. Gula, E. Czarnowska, A. Ratajska // *Anat Rec (Hoboken)*. 2019: 302 (6): 893-903. - DOI 10.1002/ar.24028.
6. Palmquist-Gomes, P. In Vivo and In Vitro Cartilage Differentiation from Embryonic Epicardial Progenitor Cells / P. Palmquist-Gomes, E. Marín-Sedeño, A. Ruiz-Villalba, G. A. Rico-Llanos, J. A. Guadix // *Int J Mol Sci.* 2022: 23 (7): 3614. DOI 10.3390/ijms23073614.
7. Rumessen, J. J. Pacemaker cells in the gastrointestinal tract: interstitial cells of Cajal / J. J. Rumessen, L. Thuneberg // *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996: 216: 82-94. DOI 10.3109/00365529609094564
8. Sanders, K. M. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function / K. M. Sanders, S. M. Ward, S. D. Koh // *Physiol Rev.* 2014: 94(3): 859-907. DOI 10.1152/physrev.00037.2013
9. Verkhatsky, A. The Concept of Neuroglia / A. Verkhatsky, M. S. Ho, R. Zorec, V. Parpura // *Adv Exp Med Biol.* 2019: 1175: 1-13. DOI 10.1007/978-981-13-9913-8_1
10. Verkhatsky, A., Ho M.S., Parpura V. Evolution of Neuroglia / A. Verkhatsky, M. S. Ho, V. Parpura // *Adv Exp Med Biol.* 2019: 1175: 15-44. DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_2