

HROMOGRANIN A - IMUNOREAKTIVNOST U HIPOFIZI I FARINGEALNOJ HIPOFIZI HUMANOG EMBRIONA



Autori:

Janjić Mila¹, dr Marko Kostić²

Mentori: Prof. dr Ivan Nikolić³, Prof. dr Vera Todorović⁴

¹Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu; ²Institut za ginekologiju i akušerstvo, Klinički centar Srbije, Beograd; ³Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu; ⁴Histologija sa embriologijom, Univerzitet "Privredna akademija", Novi Sad;

SAŽETAK

Hromogranin A predstavlja univerzalni marker neuroendokrine aktivnosti.

U radu je ispitivano prisustvo hromogranina A u neuroendokrinim ćelijama hipofize čoveka tokom embrionalnog perioda razvića.

Materijal i metode: Materijal je činilo pet humanih embriona starosti 6-8. nedelje razvića, koji su dobijeni legalnim putem. Embrioni su, u celini, fiksirani u rastvoru Buena (Bouin), kalupljeni u parafin, posle čega su pravljene njihovi serijski preseki, debljine 5 mikrometara i bojeni imunohistohemijском procedurom za dokazivanje hromogranina A.

Hromogranin A - imunoreaktivnost identifikovana je u faringealnoj hipofizi i začetku hipofize embriona u 8. nedelji razvića. Ona je u različitim intenzitetu prisutna u ćelijama faringealne hipofize i u ćelijama začetka adenohipofize, kao i u nervnim vlaknima neurohipofize.

Nalaz hromogranin A - imunoreaktivnosti u začetku hipofize ukazuje na ranu neuroendokrinu diferencijaciju hipofiznih ćelija, krajem embrionalnog perioda razvića.

Gljučne reči: Hromogranin, hipofiza, faringealna hipofiza, humani embrion.

UVOD

Hipofiza je endokrina žlezda lokalizovana na bazi mozga, koji zajedno sa hipotalamusom čini morfofunkcionalnu celinu. Njenom aktivnošću regulisana je funkcija endokrinih žlezda u organizmu. Čine je dva embriološki, morfološki i funkcionalno različita dela – adenohipofiza i neurohipofiza (Ross et al, 2005).

Adenohipofiza se sastoji iz tri dela- distalnog, intermedijalnog i tuberalnog. Endokrine ćelije distalnog dela čine

hromofobne i hromofilne (acidofilne i bazofilne) ćelije. Intermediarni deo odlikuje prisustvo Rathkeovih (Rathke) ćelija koje predstavljaju zaostatak Rathkeovog špaga formiranog tokom razvića hipofize. Tuberalni deo ima građu sličnu prednjem reznju hipofize. Neurohipofiza se sastoji iz neuralnog dela, infundibuluma i eminencije mediane. Čini je mreža amijelinskih nervnih završetaka - aksona čija se tela nalaze u hipotalamusnim jedrima, kao i različitih tipova neuroglijskih ćelija - pituicita (Mescher, 2009).



Granule endokrinih ćelija sadrže brojne peptidne hormone (somatotropni hormon, prolaktin, adrenokortikotropni, tirostimulišući, folikulostimulišući, lutemizirajući, melanostimulišući hormon i dr.) (Ross et al, 2006). Pored njih u granulama se nalazi i hromogranin A. To je kiseli glikoprotein koji se koristi kao univerzalni marker identifikacije neuroendokrinih ćelija (Mouland et al, 1994; Dayal, 1991).

Hipofiza je ektodermalnog porekla i potiče od dva različita izvora. Adenohipofiza nastaje od oralnog ektoderma, a neurohipofiza od neuroektoderma.

Neurohipofiza počinje da se razvija u 3. nedelji, kao neurohipofizni pupoljak ili infundibulum diencefalona. Distalni deo infundibuluma formira neurohipofizu, čije se neuroepitelne ćelije diferencijalno i specifično glijalne ćelije – pituicite. Nešto kasnije, aksoni neurona čija se tela nalaze u hipotalamusu urastaju u neurohipofizu.

Adenohipofiza se razvija u 4. nedelji na krovu primitivne usne duplje, tako što njen ektoderm prolifериše i migrira ka početku neurohipofize. Ova evaginišuća struktura naziva se Rathkeov špag. Kada njegove ćelije dosegnu do infundibuluma, distalni kraj mu se proširi, a proliferacijom ektodermalnih ćelija njegovog prednjeg zida nastaju ćelije prednjeg režnja adenohipofize. Ektodermalne ćelije koje ostaju na krovu usne šupljine, na mestu sa koga je počela proliferacija budućih adenohipofiznih ćelija, označava se kao faringealna hipofiza. U toku proliferacije lumen Rathkeovog špaga se redukuje, formirajući kod odraslih samo njegov ostatak u vidu Rathkeovih cisti. Od distalnog kraja Rathkeovog špaga nastaje intermedijarni deo adenohipofize. U mezenhimu koji urasta između endokrinih ćelija adenohipofize, formira se veliki broj krvnih sudova. Proksimalni deo Rathkeovog špaga gubi vezu se usnom šupljinom u toku II meseca. Sinteza hormona hipofize počinje krajem embrionalnog i početkom fetusnog perioda (Sadler, 2004).

Razviće hipofize predstavlja primer formiranja organa iz dva različita izvora, pri čemu su oba ektodermalnog porekla.

U literaturi postoji mali broj podataka i dokumentovanog materijala na kome se vide detalji neuroendokrine diferencijacije ćelija hipofize tokom njenog razvića.

CILJ RADA

Zbog nepostojanja podataka o prisustvu hromogranina A u hipofizi tokom njenog razvića, postavljen je cilj da se ispita postojanje, vreme pojavljivanja, lokalizacija i stepen imunoreaktivnosti hromogranina A u neuroendokrinim ćelijama i nervnim vlaknima hipofize i faringealne hipofize humanog embriona.

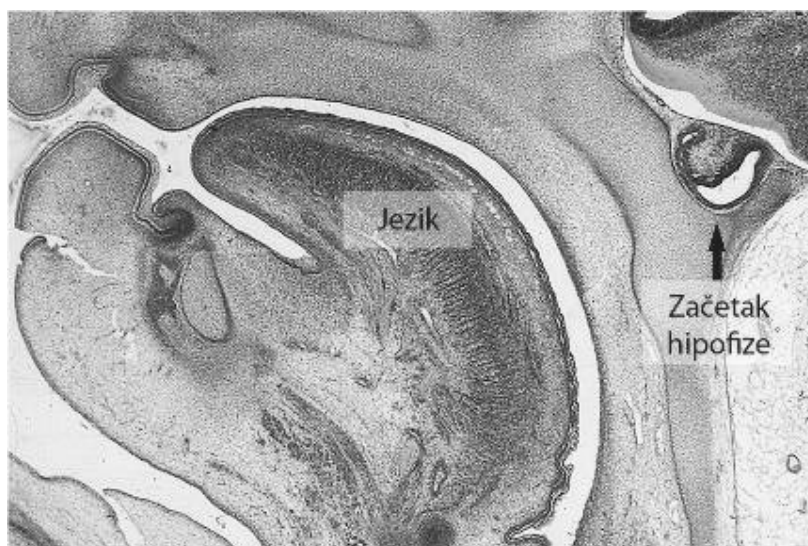
MATERIJAL I METODE

Materijal je činilo 5 humanih embriona oba pola, od 6. do 8. nedelje razvića, dobijenih legalnim putem posle hirurškog prekida ekstruterine tubarne trudnoće ili posle spontanog pobačaja.

Embrioni su fiksirani u rastvoru Buena, posle rutinske obrade kalupljeni u parafinske blokove od koga su mirotomom pravljene serijski sagitalni preseki debljine 5 mikrometara, bojeni hematoksilnim – eozinom. Identifikacija hromogranina A je vršena imunohistohemijskom peroksidaza – antiperoksidaza (PAP) tehnikom za koju su upotrebljavana monoklonska antitela (Anti Human Chromogranin A, Dako, No MO869. 1:100) (Sternberger, 1986). Za pozitivnu kontrolu upotrebljavano je tkivo pankreasa odraslog pacova. Stepenu hromogranina A – imunoreaktivnosti je određivan vizuelno, praćenjem intenziteta boje.

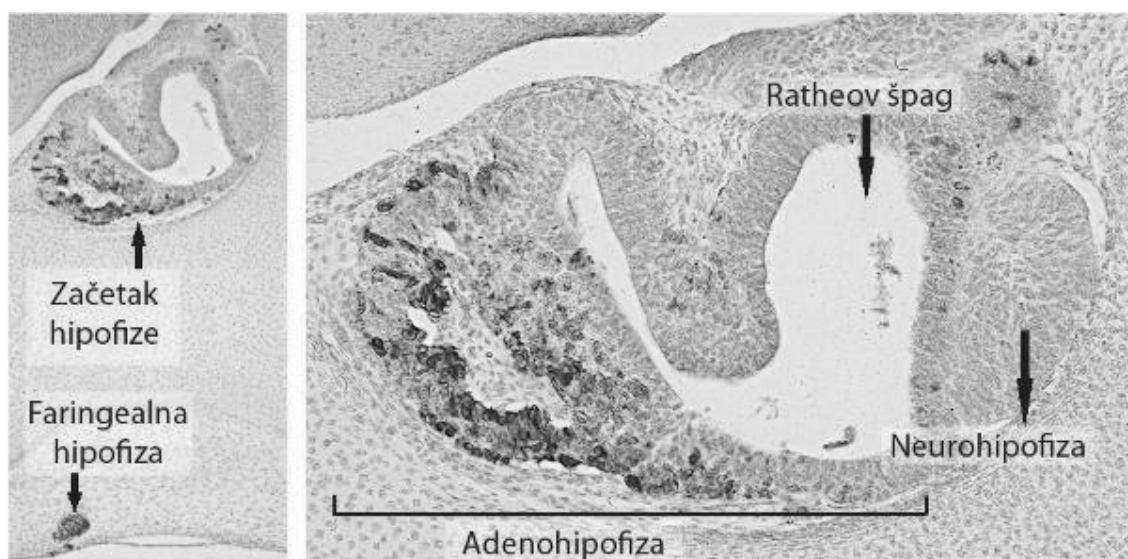
REZULTATI

U 6. i 7. Nedelji razvića, u početku hipofize (Sl. 1) nije identifikovana hromogranin A – imunoreaktivnost.



Slika 1: Ratheov špag izduženog oblika u začetku hipofize (7. nedelja razvića)
(hematoksilin – eozin, h 100)

Hromogranin A – imunoreaktivnost jasno je izražena u 8. nedelji razvića, tj. krajem embrionalnog perioda. Ona je zabeležena kako u začetku hipofize, tako i u faringealnoj hipofizi (Sl. 2a).



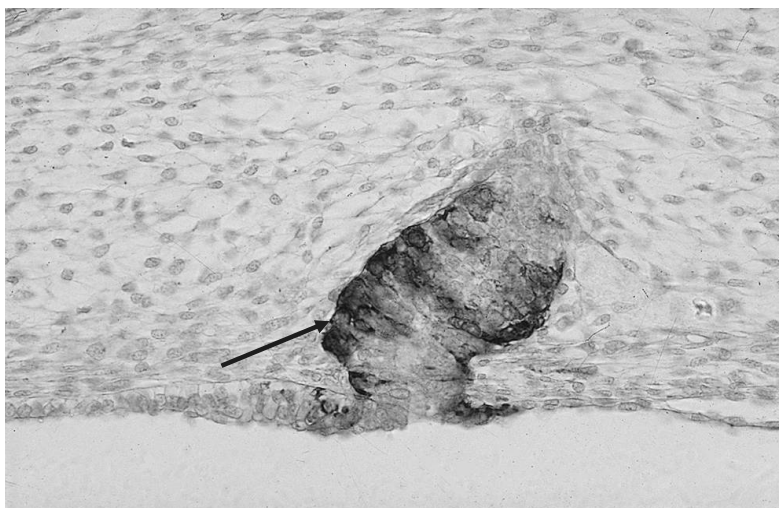
Slika 2 a: Hromogranin A – imunoreaktivnost u začetku hipofize i faringealnoj hipofizi (PAP, h 200);
b: detalj (PAP, h 400)



U začetku hipofize hromogranin A - imunoreaktivnost identifikovana je u ćelijama epitelnog primordijuma adenohipofize. Ona je lokalizovana pretežno u njenom distalnom delu u grupisanim ili pojedinačnim ćelijama (Sl. 2b). Manjim delom, pojedinačne hromogranin A – imunoreaktivne ćelije nalaze se u epitelu

začetka hipofize koji okružuje Rathkeov špag. Hromogranin A – imunoreaktivnost je intenzivnija u ćelijama distalnog dela hipofize.

U vezivnom tkivu ispod sfenoidne kosti, beleži se intenzivna hromogranin A – imunoreaktivnost u grupi ćelija koje čine faringealnu hipofizu (Sl.3).



Slika3: Hromogranin A – imunoreaktivnost u faringealnoj hipofizi (PAP, h 400)

U neurohipofizi hromogranin A – imunoreaktivnost je veoma slabo izražena, u retkim, pojedinačnim nervnim vlaknima (Sl. 2b).

DISKUSIJA

Rezultati našeg istraživanja pokazuju prisustvo hromogranin A – imunoreaktivnosti već u 8. nedelji, što potvrđuje postojanje funkcije ovih ćelija već krajem embrionalnog perioda razvika (Larsen, 1997).

Prisustvo hromogranin A – imunoreaktivnih ćelija u hipofizi u 8. nedelji i rezultati dosadašnjih istraživanja, koji ukazuju na prisustvo hromogranin A u hipofizi pilećeg embriona 6. dana inkubacije

(Kameda et al, 1998), potvrđuje visok stepen heterogenosti intenziteta hromogranin A – imunoreaktivnosti u endokrinim ćelijama hipofize kod različitih vrsta (npr. čovek i ptice). Evidentna je saglasnost našeg i istraživanja drugih istraživača (Kameda et al, 1998) u zastupljenosti hromogranin A – imunoreaktivnosti koja raste sa sazrevanjem neuroendokrinih ćelija.

Ranijim istraživanjima pokazano je prisustvo hromogranin A – imunoreaktivnosti u endokrinim ćelijama različitih organa, gde koegzistira sa brojnou populacijom biogenih amina i regularnih peptida kao što su serotonin, substanca R, glukagon, glicentin, gastričnom inhibitoru sličan peptid, insulin, pankreasni polipeptid, peptid PY, somatostatin, gastrin 17 i 33,



neurotenzin, enkefalin, tirostimulišući, folikulostimulišući i lutenizirajući hormon (Sternberger, 1986). Navedena istraživanja ukazuju na značaj hromogranina A u granulama neuroendokrinih ćelija. Tako je pokazano da hromogranin A predstavlja prekursor bioaktivnih peptida koji imaju autokrinu, parakrinu i endokrinu funkciju. Hromogranin A ima i ulogu jezgra za agregaciju i precipitaciju peptidnih hormona, osim toga on kontrološe i usmerava neuropeptide i hormone u regularnom mehanizmu sekrecije (Taupenot et al, 2003).

U humanoj hipofizi hromogranin A je otkriven u bazofilnim ćelijama prednjeg režnja adenohipofize koje proizvode tirostimulišući, folikulostimulišući i lutenizirajući hormon (Cetin et al, 1989) kao i u endokrinih ćelijama pileće hipofize koje stvaraju folikulostimulišući i lutenizirajući hormon (Kameda et al, 1998). Ovakvi podaci idu u prilog našem nalazu intenzivne hromogranin A – imunoreaktivnosti u formirajućem prednjem režnju hipofize što ukazuje da u začetku hipofize postoji rana endokrina diferencijacija (ćelija tirostimulišućeg, folikulostimulišućeg i lutenizirajućeg hormona), kao i uspostavljena neuroendokrina osovina čije ćelije najverovatnije sekretuju regulatorne proteine odgovorne za morfofunkcionalnu diferencijaciju ćelija drugih endokrinih žlezda. Analizom hromogranin A – imunoreaktivnosti u 8. nedelji razvika, u ćelijama faringealne hipofize potvrđeno je postojanje neuroendokrine diferencijacije u ektodermnim ćelijama krova usne duplje koja se zadržava i posle okoštavanja sfenoidne kosti.

Razvoj savremenih imunohistohemijskih metoda pružio je mogućnost za detaljnija ispitivanja i

definisanja sudbine mnogih embrionalnih struktura. Među njima se ističu ispitivanja sudbine Ratheovog špaga i faringealne hipofize što je, između ostalog, bio i jedan od ciljeva našeg istraživanja. Faringealna hipofiza se sve češće dovodi u vezu sa kraniofacijalnim abnormalnostima kod dece. Naime, dokazano je da je tumorska masa pronađena u nazofaringsu novorođenčadi sa kraniofacijalnim abnormalnostima istog histološkog sastava i embriološkog porekla kao i faringealna hipofiza (Osman et al, 2006).

ZAKLJUČAK

1. Hromogranin A – imunoreaktivnost identifikovana je u 8. nedelji razvika, prevashodno u njegovom distalnom delu, gde pokazuju najintenzivniju imunoreaktivnost.
2. Intenzivna hromogranin A – imunoreaktivnost identifikovana je u ćelijama faringealne hipofize, u istom periodu (8. nedelja).
3. Hromogranin A – imunoreaktivnost u začetku neurohipofize je neznatna i beleži se u retkim pojedinačnim nervnim vlaknima.

Zahvalnica. Zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Ivanu Nikoliću, kolektivu Instituta za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Nišu i prof. dr Veri Todorović sa Privredne akademije, Novi Sad.

LITERATURA

1. Cetin Y, Muller-Koppel L, Aunis D, Bader MF, Grube (1989) Chromogranin A (CgA) in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system – II CgA in mammalian entero endocrine cells. *Histochemistry*, 92: 265-275.



2. Dayal Y (1991) Neuroendocrine cells of the gastrointestinal tract: introduction and histological perspective. In: Dayal (ed): Endocrine pathology of the gut and pancreas, CRL Press, Boca Raton FL.
3. Kameda Y, Miura M, Ohno S (1998) Localization and development of chromogranin A and luteinizing hormone immunoreactivities in the secretory specific cells of the hypophyseal pars tuberalis of the chicken. *Histochem Cell Bio*, 109: 211-222.
4. Larsen YW (1997) Human embryology. Churchill Livingstone, New York.
5. Mescher A (2009) Junqueira's Basic Histology, 12th Edition: Text and Atlas. Lange, New York.
6. Moulant A J, Bevan S, White J H, Hendy G N (1994) Human chromogranin A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 6918-6926.
7. Ross HM, Pawlina W (2006) Histology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
8. Sadler WT (2004) Langman's medical embryology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
9. Sternberger RA (1986) Immunohistochemistry. Wiley, New York.
10. Taupenot L, Harper LK, O'Connor TD (2003) The chromogranin- secretogranin family. *N Engl J Med*, 348:1134-1149.
11. Osman M., Allan J. C., Kramer B. (2006) A Pharyngeal and Ectopic Hypophysis in a Neonate With Craniofacial Abnormalities: A Case Report and Review of Development and Structure. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 43: 117-122.

CHROMOGRANIN A- IMMUNOREACTIVITY IN PITUITARY AND PHARYNGEAL PITUITARY OF HUMAN EMBRYO

Janjić Mila, dr Marko Kostić

Chromogranine A (CgA) is a universal marker of neuroendocrinal differentiation.

The aim of the study was to examine the presence of the CgA in structures of hypophysis in embryonal period of development.

As material we used five human embryos six to eight weeks old. The methods included fixation in Bouin solution, embedding in paraffin, cutting of the tissue samples to 5 µm thin slices, and staining them by using the classical HE method and immunohistochemical PAP technique for identification of CgA.

Chromogranine A –immunoreactivity was identified in pharyngeal hypophysis, in ectodermal cells, and in hypophysis, in cells of the adenohypophysis and in nerve tissues of neurohypophysis, in the 7th and 8th week of development.

The obtained results lead to the conclusion that neuroendocrine differentiation of hypophysis occurs very early, at the end of embryonic period of the development, while it persists in the primordium of adenohypophysis, too -pharyngeal hypophysis.

Key words: Chromogranine A, hypophysis, pharyngeal hypophysis, human embryo

Rad je nagrađen na V International Pirogov Students' Scientific Medical Conference, kao najbolja poster prezentacija u sesiji Medical and Biological problems, Moskva, Rusija 2010.