

*Хлопонин П. А.*

## **МАЛОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЕ КАРДИОМИОЦИТЫ В НОРМАЛЬНОМ И РЕПАРАТИВНОМ КАРДИОМИОГЕНЕЗЕ**

*Кафедра гистологии (заведующий — проф. П. А. Хлопонин)  
Ростовского государственного медицинского университета,  
Ростов-на-Дону, e-mail: khloponin @list.ru*

---

Одним из основных принципов лечения хронической сердечной недостаточности у человека является своевременное применение средств, обеспечивающих компенсаторное увеличение объемной массы функционирующего жизнеспособного миокарда. В достижении подобного эффекта в современной кардиологии всё более приемлемы мероприятия по хирургической трансплантации в поврежденное сердце клеток миогенной природы, и прежде всего кардиомиоцитов (КМЦ) [5, 6]. Существенное значение в этом, безусловно, имеют фенотип клеток трансплантата, уровень их организации и способность к пролиферации, характеристика устанавливаемых межклеточных и межтканевых взаимоотношений.

Однако, несмотря на вновь оживившуюся дискуссию о наличии камбия в сердечной мышечной ткани [2, 9], результаты исследований, проводившихся более полувека в морфологических лабораториях России, свидетельствуют о его отсутствии в дефинитивной мышце сердца позвоночных [3].

Изменения митотической активности клеточных элементов в поврежденном миокарде взрослых млекопитающих — один из объективных показателей реактивности его тканей и, на наш взгляд, исходя из опыта собственных исследований, следует весьма критично рассматривать данные о потенциальном приросте количества кардиомиоцитов левого желудочка в посттрансплантированном сердце человека [8]. Результаты исследований раннего морфогенеза сердца у различных видов свидетельствуют о том, что малодифференцированные кардиомиоциты обладают выраженными пролиферативными свойствами. Важным их преимуществом является также способность к делению в условиях *in vitro* [1]. Привлекают внимание и сведения о проявляющейся у клеточной культуры способности к моделированию органа [7].

Цель исследования — сравнительный экспериментально-морфологический анализ нормального и репаративного кардиомиогенеза в раннем онтогенезе у некоторых видов теплокровных позвоночных (домашних кур, домашних кошек, человека). Основные задачи исследования направлены на изучение: а) гистогенеза миокарда в стенках развивающихся сердец у *Gallus domesticus* L., *Felis domestica* B., *Homo sapiens*; б) динамики пролиферативной активности их дифференцирующихся кардиомиоцитов; в) закономерностей становления межмиоцитарных взаимоотношений; г) морфологических характеристик клеточных популяций в развивающемся миокарде зародышей; д) проявлений посттравматической адаптивной реорганизации малодифференцированных кардиомиоцитов в зародышевом сердце.

**Материал и методы.** Для изучения ранних этапов морфогенеза мио- и эндокарда исследованы сердца: 35 куриных эмбрионов от 42–44 ч до 7 сут. инкубации,

12 зародышей кошки 16–20 сут. внутриутробного развития (ВУР), 15 зародышей человека 4–7 нед. ВУР. Гистологический анализ реактивных изменений в эмбриональном сердце проведен в эксперименте на 12 зародышах кур 3 сут. инкубации и 14 зародышах кур 5 сут. инкубации через 1, 2, 3, 4, 5 сут. после точечной электротермотравмы его стенки. Материал, фиксировавшийся в жидкости Карнуа и прошедший все стандартные этапы обработки для световой микроскопии, окрашивался гематоксилином и эозином, железным гематоксилином по Гейденгайну, трехцветным методом Массона в модификации Кроссмана. Для оценки уровня пролиферативной активности дифференцирующихся КМЦ определялся митотический индекс с последующей статистической обработкой первичных данных.

Материал для электронно-микроскопического исследования фиксировали в 1 %-ном растворе тетраоксида осмия  $OsO_4$  с префиксацией 2,5 %-ным раствором глутаральдегида. После его соответствующей обработки, заливки в аралдит или эпон, изготовления полутонких срезов и их окраски толуидиновым синим и азуром II, прицельного ориентирования и ультрамикротомии, контрастированные срезы просматривались в микроскопе ЭМВ-100Б.

**Результаты исследования и их обсуждение.** При изучении гистологического строения трубчатого сердца исследованных видов позвоночных (эта его форма характерна в раннем онтогенезе) установлено, что сердечная стенка образована тремя однозначно «чистыми» вступившими в дифференцировку клеточными популяциями для развивающихся эпикарда, миокарда и эндокарда соответственно. При этом примитивный миокард желудочка в трубчатом сердце у изученных зародышей образован 2–3 слоями малодифференцированных кардиомиоцитов (рис. 1 *а, б*). Все они являются клетками ядерного типа с наличием в кариоплазме нескольких (2–5) ядрышек. В этот период очевидны высокие показатели пролиферативной активности клеток и образование в желудочке миокардиальных

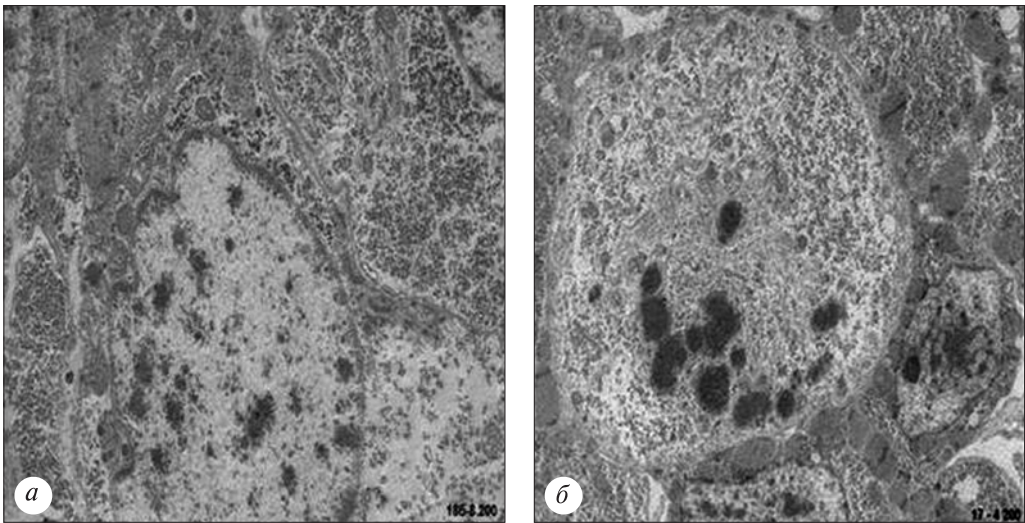


Рис. 1. Ультраструктура малодифференцированных кардиомиоцитов желудочков. Сердце зародыша человека 4 недель внутриутробного развития. Ув. *а*) 8 200; *б*) 4 200

трабекул. Интеграция малодифференцированных и дифференцирующихся кардиомиоцитов в целостную тканевую систему сопровождается последовательной организацией протяженных адгезивных соединений, коротких «щелевых» и плотных контактов, а затем — десмосом и «fasciae adhaerentes». В цитоплазме на фоне выраженного обилия свободных рибосом и полисом очевидны процессы организации митохондрий и миофибриллогенеза, детерминированы первичная периферическая сборка миофиламентов и саркомерогенез, развиты мембранные органеллы биосинтеза, но ещё нет типичных лизосом, возможны проявления цилиогенеза; значительно содержание гликогена. Проявлений апоптотической гибели малодифференцированных кардиомиоцитов в раннем миокардиогенезе у исследованных видов не обнаружено.

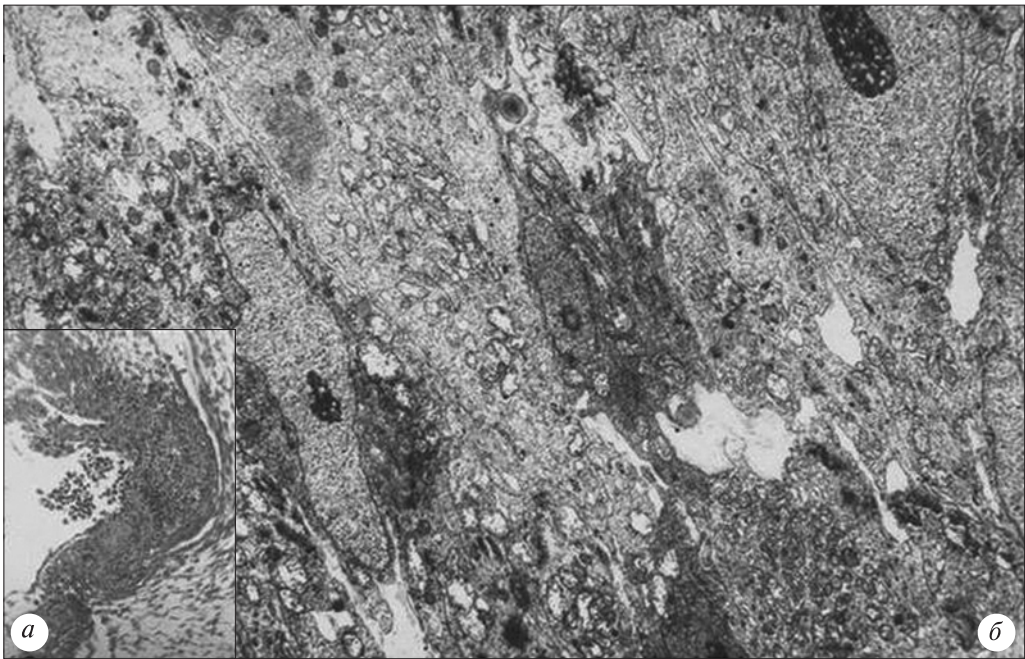
При формировании миокардиальных трабекул и образовании выстилки межтрабекулярных пространств эндотелиоцитами происходит увеличение объемной плотности сердечных миоцитов и эндотелия, уменьшение толщины прослоек «кардиального геля», нарастание уровня клеточной дифференцировки.

Активная специфическая дифференцировка сердечных миоцитов в период трабекуляции миокарда желудочков сопряжена с их интенсивной пролиферацией (митотический индекс в миокарде желудочков достигал 2,71–2,11 % — у зародышей кур 4, 5, 6 сут. инкубации соответственно; 2,4–1,62 % — у зародышей кошки 16–21 сут. ВУР; 2,15–0,65 % — у зародышей человека 4–6 нед. ВУР), усложнением структуры межмиоцитарных контактов, нарастанием содержания органелл. В указанные сроки нередко обнаруживались проявления апоптоза дифференцирующихся кардиомиоцитов. Естественно, что этот легко регистрируемый морфологами период кардиогенеза по своим временным параметрам и содержанию может экстраполироваться в обширном диапазоне видов гомойотермных позвоночных. Именно в периоде интенсивного образования трабекул у 7-суточных зародышей кур и у зародышей человека 6–7 нед. ВУР на микропрепаратах и электронных микрофотографиях возможна идентификация дифференцирующихся «проводящих» кардиомиоцитов.

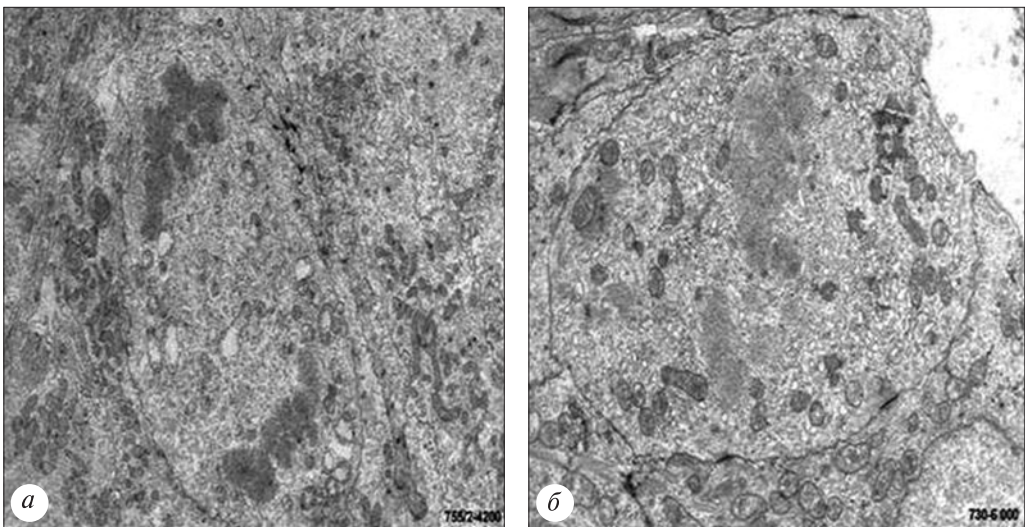
В зародышевом периоде развития человека, как и у других исследованных видов, имеют место все базирующиеся на детерминации составляющие гистогенеза сердечной мышечной ткани (интенсивная пролиферация, специфическая и дивергентная дифференцировка, становление межмиоцитарных взаимоотношений), очевидны проявления активного участия эндотелия эндокарда в трабекуляции миокарда.

В двух сериях экспериментов с нанесением локального термокоагуляционного повреждения стенки желудочка сердца 3- и 5-суточных куриных эмбрионов установлено, что наиболее демонстративный репаративный эффект наблюдался в эксперименте на более ранних 3-суточных эмбрионах. Это обусловлено особенностями строения трабекулярного миокарда, из которого уже в течение 24–48 ч после повреждения происходят быстрое (ускоренное) обособление и элиминация погибших клеток и их фрагментов (рис. 2 *a, б*), а большинство пограничных с местом травмы дифференцирующихся КМЦ претерпевает внутриклеточную реорганизацию и по своей ультраструктуре они во многом соответствуют миоцитам неповрежденного сердца 4–5-суточных куриных эмбрионов (рис. 3 *a, б*).





*Рис. 2.* Очаг повреждения стенки желудочка сердца 3-суточного куриного зародыша (*а*) и ультраструктура пограничного с повреждением миокарда (*б*). *а* — гематоксилин и эозин, об. 10, ок. 7; *б* — Ув. 3 000.



*Рис. 3.* Ультраструктура пролиферирующих малодифференцированных кардиомиоцитов в пограничной с очагом повреждения зоне эмбрионального трабекулярного миокарда желудочков сердца: *а*) зародыша курицы 4,5 сут. инкубации (36 ч после локальной термотравмы стенки желудочка 3-суточного куриного эмбриона); *б*) зародыш курицы 7 сут. инкубации (48 ч после локальной термотравмы стенки желудочка 5-суточного куриного эмбриона). Ув. *а*) 4 200; *б*) 6 000

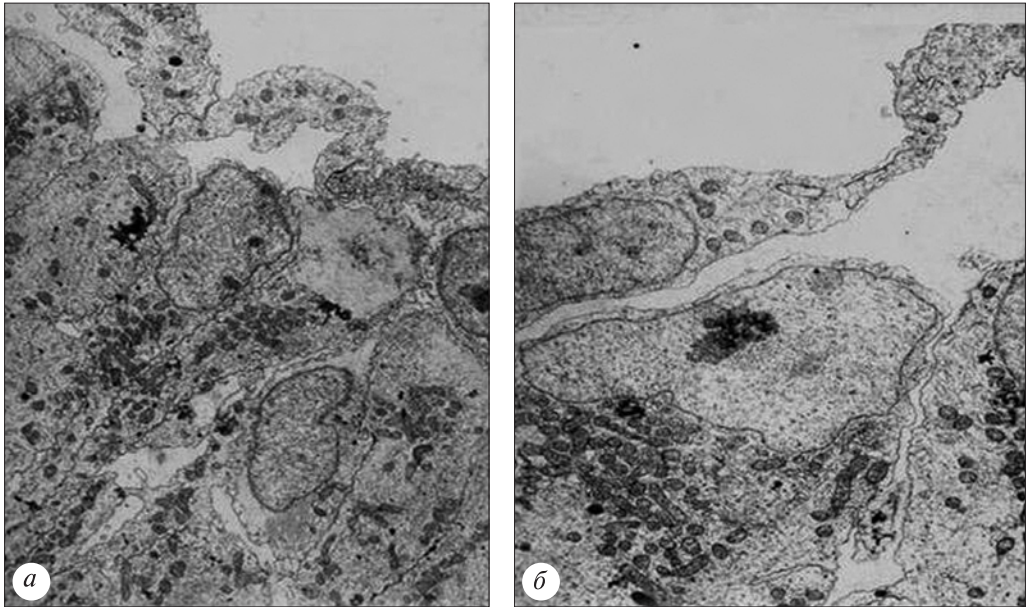


Рис. 4. Ультраструктура реактивно измененных малодифференцированных кардиомиоцитов вентрикулярного миокарда 3-суточного зародыша курицы через 72 ч после повреждения. Проявления реорганизации их внутриклеточной структуры. Ув. а) 3000; б) 8 000

Таблица

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИНДЕКСОВ МИТОЗОВ ЯДЕР  
ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ МИОЦИТОВ ЖЕЛУДОЧКОВ ПОГРАНИЧНОЙ  
С ПОВРЕЖДЕНИЕМ И УДАЛЕННОЙ ОТ НЕГО ЗОНЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО  
МИОКАРДА ПТИЦ

Объект исследования	Срок после операции	Индекс митозов, % ( $\bar{X} \pm x$ )		
		пограничный с повреждением миокард	удаленный от повреждения миокард	контроль
		МИ в миокарде 3-суточных интактных куриных эмбрионов — $2,75 \pm 0,09$		
Куриный эмбрион 3 суток инкубации	24 ч	$2,25 \pm 0,13$	$2,06 \pm 0,13$	$2,71 \pm 0,12$
	48 ч	$2,12 \pm 0,10$	$1,21 \pm 0,12$	$2,33 \pm 0,1$
	72 ч	$1,98 \pm 0,13$	$1,18 \pm 0,08$	$2,11 \pm 0,11$
		МИ в миокарде 5-суточных интактных куриных эмбрионов — $2,33 \pm 0,1$		
Куриный эмбрион 5 суток инкубации	24 ч	$1,83 \pm 0,09$	$1,28 \pm 0,09$	$2,11 \pm 0,11$
	48 ч	$0,65 \pm 0,09$	$0,74 \pm 0,08$	$1,93 \pm 0,09$

Однако в них также обнаружены: проявления отека, расширения кариотеки, появление крупных вакуолей и цистерн аппарата Гольджи, резкое падение содержания свободных рибосом, присутствие лизосом, наличие внутримитохондриальной электронноплотной зернистости, различия в уровнях митотической активности кардиомиоцитов пограничной с повреждением и отдаленной зон эмбрионального миокарда. Наиболее выражены масштабы структурной перестройки в кардиомиоцитах, которые полностью или частично утратили межклеточные связи.

Сравнительный анализ показателей митотической активности интенсивно дифференцирующихся кардиомиоцитов зародышей курицы в контроле и в эксперименте (табл.) свидетельствует об ингибирующем влиянии локальной травмы на их пролиферацию. Тем не менее, исходом экспериментов у 3- и 5-суточных зародышей курицы было полное восстановление структуры сердечной стенки, и определено оно не только продолжающимися морфогенетическими процессами в формирующемся органе, но и способностью значительной массы посттравматически дедифференцированных клеток миокарда и эндокарда к пролиферации (рис. 4, а, б) и редифференцировке.

Таким образом, установленный высокий пролиферативный потенциал клеток миокарда и эндокарда, относительно низкий уровень их дифференцировки в исследованном периоде онтогенеза человека (3, 5–6 недель внутриутробного развития, начиная с периода разветвления функциональной активности сердца и включая период интенсивной трабекуляции миокарда) позволяет сделать предположение о возможности и целесообразности использования популяций этих клеток в качестве объекта кардиомиопластики. Морфологическим обоснованием этого заключения также могут быть: а) регистрируемое в эти сроки присутствие в миокарде зародышей только двух популяций клеток — малодифференцированных кардиомиоцитов и эндотелиоцитов межтрабекулярных пространств (эндокарда); б) возможность удаления эпикарда, мигрировавшего на поверхность миокарда; в) быстрые темпы посттравматической дедифференцировки и последующей редифференцировки сердечных мышечных клеток; г) возможность фагоцитоза и элиминации погибающих путем некроза и апоптоза клеток поврежденного миокарда и эндокарда; д) наличие в приранево миокарде зародышей делящихся пролиферирующих клеток; е) способность к восстановлению межмиоцитарных взаимоотношений и др.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ерохина И. Л., Семенова Е. Г., Емельянова О. И.* Вентрикулярные кардиомиоциты плодов человека *in vitro*: пролиферация и дифференцировка // *Цитология*. 2005. Т. 47. № 3. С. 200–206.
2. *Полежаев Л. В.* Факторы регенерации не регенерирующих органов и тканей // *Вестн. РАН*. 2000. Т. 10. С. 597–603.

3. Румянцев П. П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука, 1982.
4. Хлопонин П. А., Патюченко О. Ю. Процессы кардиомиогенеза в зародышевом периоде развития человека // Морфология. 2003. Т. 123. № 1. С. 50–54.
5. Шахов В. П., Попов С. В. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии. Томск, 2004.
6. Шевченко Ю. Л. Экспериментальное обоснование возможности имплантации эмбриональных кардиомиоцитов в комплексной терапии миокардиальной слабости // Физиология человека. 1999. Т. 25. № 4. С. 109–117.
7. Gojo S., Kitamura S. Ex vivo gene transfer into myocardium using replication-defective retrovirus // Cell. Transplant. 1996. V. 5. P. 81–84.
8. Kajstura J., Leri A., Finato N. et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans (mitotic index/cytokinesis) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 8801–8805.
9. Rota M., Padin-Iruegas M. E., Misao Yuo et al. Local Activation or Implantation of Cardiac Progenitor Cells Rescues Scarred Infarcted Myocardium Improving Cardiac Function // Circ. Res. 2008. V. 103. P. 107–116.