

В. О. МИРАКЯН и Д. Г. ПЕТРОСЯН

ГИСТОГЕНЕЗ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА В СВЕТЕ ДАННЫХ ЦИТОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ДНК И ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

При цитоспектрофотометрическом изучении содержания ДНК в ядерной популяции желудочковой мышцы сердца людей обнаружена зависимость между весом сердца и плоидностью ядер [16, 17, 21, 24—26].

Исходя из этого, естественно предположить, что ядра желудочковых миоцитов сердца людей сохраняют способность к синтезу ДНК в течение относительно протяженного периода онтогенеза, а возможно, в течение всей жизни. В отличие от этого, у мелких лабораторных животных, в частности у крыс и мышей, установлено, что репрессия синтеза ДНК в ядрах желудочковой мышцы сердца, наступающая к 15—20-м суткам постнатального онтогенеза [2, 3, 6, 9—11, 13, 23], является достаточно стойкой и практически не снимается при различных реактивных состояниях [4, 6, 9, 12, 15, 18, 22, 27]. В доступной нам литературе не удалось найти полных данных, характеризующих плоидность ядер различных отделов сердца людей в ходе внутриутробного и постнатального развития.

Целью настоящей работы являлось: 1) получение данных о плоидности ядер миокарда на различных стадиях внутриутробного и постнатального гистогенеза у человека; 2) путем сопоставления цитоспектрофотометрических и морфологических показателей, а также определения митотического индекса попытаться приблизительно оценить долю пролиферирующих и покинувших цикл репродукции клеток в миокарде людей на различных стадиях развития сердца.

Материал и методика. Исследовались сердца 2, 3, 5 и 9-месячных зародышей и плодов, полученные при искусственном или самопроизвольном прекращении беременности, а также сердца 1, 3, 4, 5, 8, 9-месячных детей, умерших от различных заболеваний, и сердца людей в возрасте от 3 до 55 лет, погибших в результате несчастных случаев. При взятии материала учитывались вес сердца и толщина стенок желудочков, а также заключение об отсутствии заболеваний, приводящих к гипертрофии сердечной мышцы. Кусочки сердца фиксировались в смеси Карнуа и заливались в парафин. Морфометрические исследования включали определение числа мышечных и соединительнотканых ядер в единице площади среза, измерение расстояния между соседними ядрами и подсчет доли «парных ядер» (т. е. расстояния между которыми не превышало их ширины). Микрометрические измерения проводились с помощью окуляр-микрометра МОВ 1-15. Фотометрировались окрашенные по Фельгену ядра

мышечных волокон на продольных срезах миокарда толщиной 8—16 мк. Выбор толщины среза всегда проводился после микрометрической оценки размеров ядер. Исследования проводились на зондовом цитоспектрофотометре [8], собранном на базе прибора МУФ-6, двухволновым методом при длине волн 505 и 546 мк. Ошибка прибора равна 2%. Эталонном для определения гаплоидного, диплоидного и тетраплоидного эквивалента служили сперматиды человека (п), лимфоциты крови, выявляемые на срезах миокарда, а также ядра соматических мышц (2п) и ядра паренхиматозных клеток печени (2п и 4п). Фотометрия эталонных препаратов показала, что при работе на срезах вариабельность количества ДНК выше 10% и укладывается в 20% уровень. Исходя из этого, при построении гистограмм принят классовый промежуток, равный 20% от единицы плоидности. Объединение отдельных случаев в соответствующие возрастные группы проведено по известной классификации [1, 7]. Для констатации достоверности наблюдаемых сдвигов использовался критерий χ^2 для 95% доверительного уровня. Достоверность сдвигов между анализируемыми популяциями клеток определялась также сравнением средних значений по критерию Стьюдента для 95% доверительного уровня.

Результаты и обсуждение. Определение плоидности ядер в миокарде зародышей и плодов человека показало, что на всех анализируемых стадиях популяция мышечных клеток желудочков сердца представлена ядрами, содержащими диплоидное, тетраплоидное и промежуточное между 2п—4п количество ДНК. Различий в распределении ядер по классам плоидности на изученных стадиях внутриутробного развития не выявлено ($\chi^2=0,64 < \chi^2_{0,05}$). Различия отсутствуют и при сравнении относительного количества ДНК на ядро (табл. 1). Однако в свете данных о постепенном снижении темпа размножения миоцитов в ходе гистогенеза миокарда, обусловленного как уменьшением числа пролиферирующих клеток, так и пролонгацией отдельных периодов митотического цикла и всего генерационного времени [3, 13], а также данных о возможности выхода ядер из цикла в полиплоидном состоянии [3, 5, 6], полученные цифры требуют расшифровки. Гистограммы (рис. 1а, б, в) позволяют допустить наличие в миокарде зародышей и плодов следующих категорий ядер: 1) диплоидные ядра в периоде G_1 , 2) диплоидные ядра в периоде G_0 , 3) промежуточные между 2п и 4п ядра, соответствующие разным этапам периода S, 4) тетраплоидные ядра клеток, временно или окончательно покинувших цикл репродукции в периоде G_2 , 5) тетраплоидные ядра клеток, временно или окончательно покинувших цикл репродукции в периоде G_2 . Соотношение указанных групп ядер может изменяться на различных стадиях гистогенеза. Количественная оценка таких изменений, выполненная при изучении гистогенеза миокарда у крыс и мышей [3, 5, 6], значительно осложнена применительно к сердцу эмбриона и плода человека ввиду отсутствия данных о пролиферативном пуле и хронологии различных периодов митотического цикла. Для расшифровки полученных цитоспектрофотометрических данных использованы результаты известных автордиографических исследований на миокарде мышей [3]. Допуская, что в миокарде людей и мышей, характеризующихся сходным уровнем дифференциации миоцитов, количество пролиферирующих клеток должно быть относительно одинаковым, мы сочли возможным выбор сопос-

Таблица 1

Морфометрические и цитоспектрофотометрические показатели в ходе эмбрионального и постнатального кардиогенеза ($M \pm m$)

Возрастная группа	Количество исследований	Вес сердца в г	Толщина стенки в см	Мышечные клетки					Число соединительных ядер в единице площади среза	Отношение числа мышечных ядер к соединительным в единице площади среза			
				число ядер в единице площади среза	расстояние между ядрами в мк	индекс парных ядер в %	индекс митозов в %	относительное кол-во ДНК на ядро					
Внутриутробный период	м е с я ц ы	2-3	5	—	—	—	—	3,42±0,22	2,80±0,03	—	—		
		5	3	—	—	—	—	1,44±0,12	2,88±0,04	—	—		
		9	3	—	—	78,1±2,66	—	2,80±0,30	0,26±0,02	2,78±0,05	48,2±1,51	1,61±0,01	
	I	1-2	3	—	—	85,3±6,14	—	12,57±0,40*	0	2,09±0,06	57,2±2,83	1,49±0,04	
		3-5	3	—	—	80,2±2,40	—	15,43±0,60*	0	2,37±0,03	50,8±1,44	1,57±0,06	
		8-9	3	—	—	70,7±2,57*	—	2,11±0,002*	0	2,70±0,05	46,9±1,68	1,50±0,03	
Постнатальный период	II	3-10	5	106,20±24,6	—	17,30±0,48*	34,62±1,13	7,21±2,25*	0	2,83±0,03	35,95±0,78*	0,47±0,03*	
		III	11-17	2	258,33±8,33*	1,35±0,022	12,80±0,38*	42,97±1,61*	6,64±1,43	0	3,57±0,07*	37,25±1,28	0,34±0,02*
		IV	18-24	3	298,00±9,10*	1,10±0,1	10,55±0,50*	41,42±2,28	5,20±0,25	0	3,94±0,07*	27,60±1,42*	0,38±0,05
	V	25-39	3	292,00±18,50	1,06±0,04	12,76±1,26	38,75±1,19	3,61±1,44	0	4,30±0,09*	31,66±1,53	0,40±0,03	
	VI	40-54	3	357,33±29,70*	1,35±0,079	11,75±0,63	41,70±1,49	4,62±1,02	0	4,89±0,09*	30,60±1,20	0,36±0,007	
	год ы	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Примечание: *—значения достоверно отличаются ($P < 0,05$) от значений для предыдущей стадии развития.

(—)—соответствующий подсчет не производился

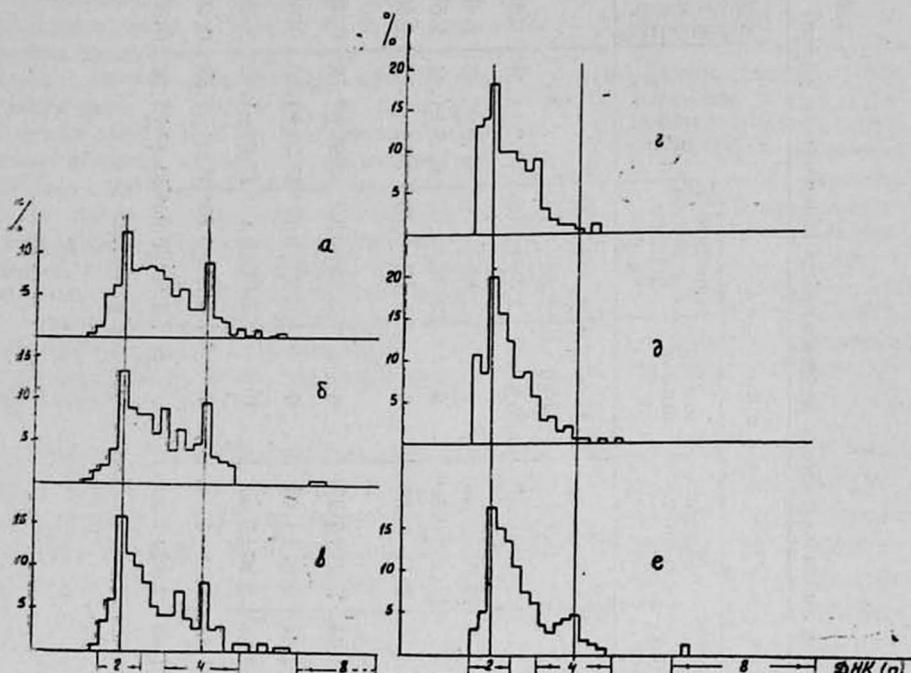


Рис. 1. Распределение кардиомиоцитов сердца людей по классам плоидности на различных стадиях внутриутробного (а—2—3, б—5, в—9 месяцев) и раннего постнатального (г—1—2, д—3—5, е—8—9 месяцев) развития. Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс—единицы плоидности (n), по оси ординат—число ядер (в % к общему числу профотометрированных ядер).

тавимых сроков провести на основании сравнения значений митотических индексов, рассчитанных нами в миокарде у людей (табл. 1) и для миокарда мышей [3]. На основании такого сравнения данные рис. 1а, б, в, соответственно оценены с помощью данных автордиографических исследований, полученных у мышей 12—15, 19 суток эмбрионального и 7 дней постнатального развития. Согласно автордиографическим данным, в миокарде 12-дневных эмбрионов мышей длительности фаз G_2 S и G_1 относятся между собой как 1:2, 3:2. При пролиферативном пуле, равном 85%, количество клеток, находящихся в периоде G_2 , S и G_1 , должно быть соответственно 16:36, 8:32,2, т. е. число ядер, регистрируемых как гипердиплоидные и тетраплоидные, должно составлять $16+36,8=52,8\%$. В миокарде с уровнем дифференцировки, соответствующим миокарду 15-суточных эмбрионов мышей, такие ядра должны составлять 46% популяции. Разность между выявленным путем цитофотометрии и теоретически ожидаемым числом гипердиплоидных и тетраплоидных ядер должна дать представление об объеме фракции миоцитов, покинувших цикл репродукции в полиплоидном состоянии. Такое сопоставление показало, что в миокарде 2—3-месячных зародышей и плодов человека все ядра, содержащие гипердиплоидное и тет-

раплоидное количество ДНК (46%), являются цикловыми, находящимися в стадии S или G₂.

Аналогичные расчеты, выполненные для миокарда 5-месячных плодов, показали, что на этой стадии миогенеза около 35% ядер (50,4—15=35,4%) с полиплоидным содержанием ДНК не должно участвовать в цикле репродукции в результате выхода из цикла в периоде S или G₂. Количество таких ядер в миокарде 9-месячных плодов составляет 41,9—12=29,9%. По всей вероятности, для части ядер такой выход из цикла носит временный характер, так как на ранних стадиях постнатального развития число ядер, содержание ДНК в которых выше 2n, не превышает 20—21%, из коих лишь 8—9% ядер содержат тетраплоидное количество ДНК (рис. 1 г—е). В миокарде 9-месячных детей число тетраплоидных ядер достоверно увеличивается ($\chi^2=21,30 > \chi^2_{01}$). Несмотря на приближенность проведенных расчетов, возможность выхода ядер миоцитов из цикла G₂ и S весьма вероятно, что достаточно четко прослеживается при изучении гистогенеза миокарда у крыс и мышей [3, 6].

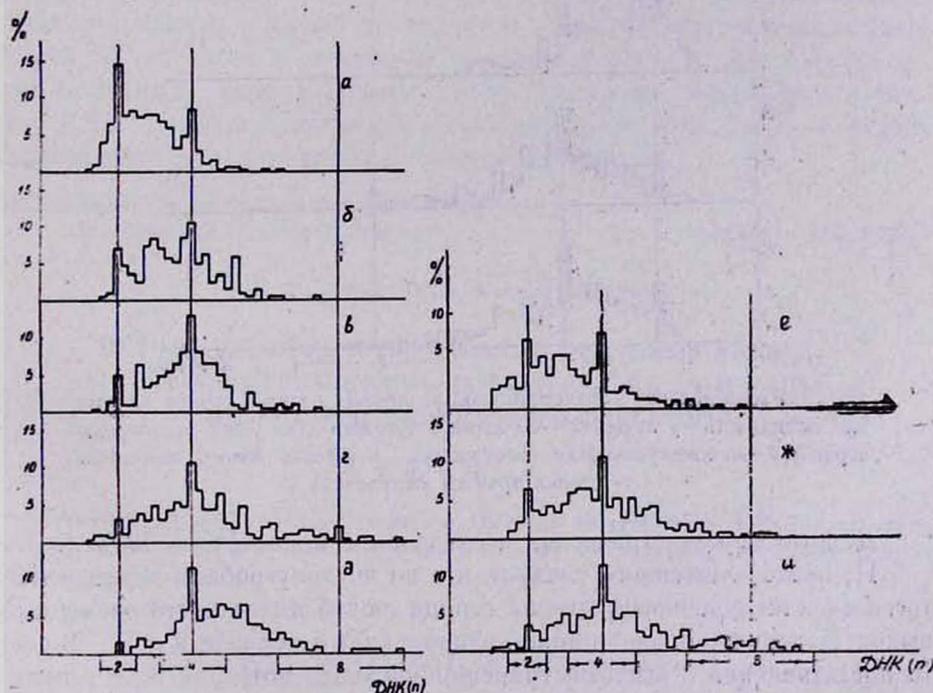


Рис. 2. Распределение ядер миоцитов по классам плоидности в миокарде левого (I) и правого (II) желудочков сердца у людей различных возрастных групп (а—3—10 лет; б—11—17 лет; в, е—18—24 года; г, ж—25—39 лет; д, и—40—54 года).

Анализ гистограмм, характеризующих содержание ДНК в ядрах миоцитов левого желудочка сердца на последующих стадиях онтогенеза, (рис. 2а—д) свидетельствует о прогрессирующей полиплоидизации всей ядерной популяции. С возрастом увеличивается как число

полиплоидных ядер, так и степень их плоидности. В миокарде людей 40—55-летнего возраста около 12% ядер содержат ДНК, соответствующее октоплоидному уровню (рис. 2 д). При этом отмечается почти полное выпадение диплоидного класса. Аналогичное явление отмечается в ядерной популяции и правого желудочка людей (рис. 2 е—и). Сопоставление данных о содержании ДНК в ядерной популяции различных отделов сердца у людей 25—39-летнего возраста показывает, что максимальное количество полиплоидных ядер содержит миокард левого желудочка (рис. 3).

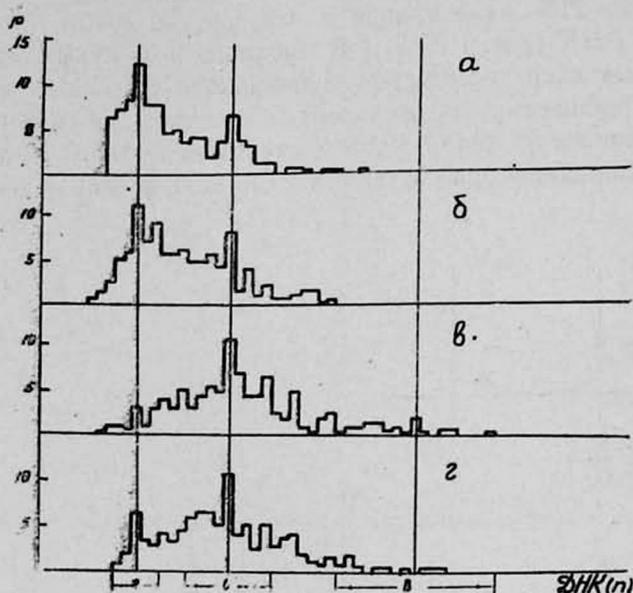


Рис. 3. Распределение кардиомиоцитов различных отделов сердца по классам плоидности у людей 25—39-летнего возраста (а—ушко левого предсердия, б—межжелудочковая перегородка, в—стенка левого желудочка, г—стенка правого желудочка).

Данные морфометрических исследований приведены в табл. 1.

Из вышеизложенного следует, что во внутриутробном периоде гистогенеза в желудочковой мышце сердца людей имеет место временный выход (задержка) ядер из цикла репродукции в периоде S и G₂. В свете представлений о высокой транскрибирующей потенции ядер с полиплоидным количеством ДНК следует предположить, что в функционирующем органе, в период активной пролиферации клеток, такой выход ядер из цикла предназначен для осуществления более надежной дифференцировки кардиомиоцитов. На поздних стадиях внутриутробного и начальных стадиях постнатального развития такие ядра, по всей вероятности, делятся, на что указывают снижение числа гипердиплоидных и тетраплоидных ядер и достоверное увеличение индекса «парных ядер» в миокарде детей 1—5-месячного возраста. Способ деления ядер в указанный период развития не ясен. На основании кос-

венных рассуждений допускается возможность митотического деления ядер [24]. Доводы в пользу амитотической природы парных ядер связаны с рядом неопределенностей. Согласно данным литературы, процесс новообразования мышечных ядер в миокарде левого желудочка сердца людей заканчивается к 3 месяцам постнатальной жизни [14, 19]. Аналогичный вывод можно сделать и исходя из настоящего исследования. Данные о достоверном снижении индекса «парных ядер», уменьшении числа мышечных ядер в единице площади среза и прогрессирующей полиплоидизации ядерной популяции, отмечаемые уже в миокарде 8—9-месячных детей, могут быть объяснены прекращением пролиферации ядер на более ранних стадиях онтогенеза, т. е. к 3—5 месяцам постнатального развития. Дальнейшее увеличение сердца обеспечивается, в основном, увеличением размеров составляющих миокард мышечных клеток. В механизме такого роста миоцитов одним из основных звеньев является полиплоидизация ядер.

Таким образом, наряду с общностью основных положений эмбрионального и раннего постнатального кардиогенеза, в ходе гистогенеза сердечной мышцы у людей проявляется и ряд отличительных особенностей. В частности, в отличие от миоцитов сердца мелких лабораторных животных, кардиомиоциты людей сохраняют способность к синтезу ДНК на всем протяжении онтогенеза, что проявляется в форме нарастающей полиплоидизации ядерной популяции.

Филиал ВНИИ клинической и экспериментальной
хирургии МЗ СССР в г. Ереване

Поступило 22/1 1976 г.

Վ. Օ. ՄԻՐԱԿՅԱՆ ԵՎ Դ. Գ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ

ՄԱՐԴՈՒ ՍՐՏԱՄՎԱՆԻ ՀԻՍՏՈԳԵՆԵԶԸ ԸՍՏ ԴՆԹ-Ի ՔԱՆԱԿԻ
ՑԻՏՈՍՊԵԿՏՐՈՄՈՐՖՈՄԵՏՐԻԿ ՀԵՏԱԶՆՈՏՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ՄԻ ՔԱՆԻ
ՄՈՐՖՈՄԵՏՐԻԿ ՊԱՐԱՄԵՏՐԵՐԻ ՈՐՈՇՄԱՄԲ

Ա Վ Փ Ն Փ Ն Ա Վ

Մարդկանց կարդիոմիոցիտների կորիզները ընդունակ են սինթեզելու ԴՆԹ ամբողջ օնթոգենեզի ընթացքում: Վերջինս ի հայտ է գալիս կորիզային պոպուլյացիայի աճող պոլիպլոիդիկ պացիայի ձևով:

V. O. MIRAKIAN, D. G. PETROSSIAN

HISTOGENESIS OF HUMAN CARDIAL MUSCLE IN THE DATA
OF CYTOSPECTROPHOTOMETRIC STUDY OF DNA AND THE
DETERMINATION OF SOME MORPHOMETRIC PARAMETERS

S u m m a r y

The nuclei of cardiomyocytes in men are able to synthesize DNA on the whole period of ontogenesis. It is appearing in the form of increasing polyploidization of nuclear population.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Башкиров П., Б. М. Э., 1958, 5.
2. Ерохина И. Л., Цитология, 1968, 106, 11, 1391.
3. Ерохина И. Л., Автореф. канд. диссер. Л., 1971.
4. Миракян В. О. Биолог. журн. Армении, 1967, 20, 12, 49.
5. Миракян В. О., Дисс. канд., Л.—Е., 1969.
6. Миракян В. О. и Румянцев П. П., Цитология, 1968, 10, 8, 964.
7. Пузик В. И. и Харьков А. А. В кн.: «Возрастная морфология сердечно-сосудистой системы человека», из-во Акад. пед. наук РСФСР, М.—Л., 1948.
8. Розанов Ю. М. и Селиванова Г. А. Цитология 1968, 10, 10, 521.
9. Румянцев П. П. (*Rumyantsev P. P.*) *Folia histoch. et cytoch.* 1966, 4, 4, 397.
10. Румянцев П. П. Архив анат., гист. и эмбриол., 1967, 52, 3, 67.
11. Румянцев П. П. Архив анат., гист. и эмбриол., 1973, 65, 7, 15.
12. Румянцев П. П., АLEXИНА Г. А. и Меерсон Ф. З. Цитология, 1967, 9, 3, 311.
13. Румянцев П. П. и Соколовская И. Л. В сб.: «Исследование клеточных циклов и метаболизма нуклеиновых кислот при дифференциации клеток», изд-во «Наука», М.—Л., 1964, 71.
14. *Black-Schaffer F. a. Turner M.* Amer. J. pathol., 1958, 34, 745.
15. *Crane a. Dutta, J.* Pathol. Bacteriol., 1963, 86, 83.
16. *Eisenstein R. a. Wied G. L.*, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1970, 133, 1, 176.
17. *Fischer B., Schluter G., Adler C. P. a. Sandritter W.* Beitr. Pathol., 1970, 141, 238.
18. *Grove D., Zak R., Nair K. G. a. Aschenbrenner, Ctr. Res.* 1969, 25, 4, 473.
19. *Hort W.* Virch. Arch., 1953, 323, 8, 223.
20. *Kompman M., Paadags J. a. Sandritter W.* Arch. pathol., 1966, 82, 3, 303.
21. *Morishita T., Sasaki R., Jamagata S.* Jap. Heart J. 1970, 11, 36.
22. *Morkin E, a. Achford T. J.* Cell. Biol., 1967, 35, 2, 97.
23. *Overy H. R. a. Priest, Lab. Invest.*, 1966, 15, 6, 1100.
24. *Pfitzer P.*, Verh. Dtsch. Ges. Kreisl., 1972, 38, 22.
25. *Pfitzer P. a. Capurso A.* Virch. Arch., Abt. B. Zellpath., 1970, 5, 3, 254.
26. *Sandritter W. a. Scomazzoni G.* Nature, 1964, 202, 100.
27. *Zak R.*, Amer. J. Cardiol., 1973, 31, 2, 221.