

**А.А.Горбунов  
И.В.Твердохлеб**

Днепропетровская государственная медицинская академия

**Ключевые слова:** миокард, развитие, гистогенез, соединительная ткань.

Надійшла: 12.10.2007  
Прийнята: 19.12.2007

УДК 611.12:611.018.2:591.82]-092.6/9

## **КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА СОЕДИНИТЕЛЬ-НОТКАННЫХ КЛЕТОК В ЖЕЛУДОЧКОВОМ МИОКАРДЕ КРЫС**

*Работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы „Анализ нормального и аномального гистогенеза тканевых компонентов сердечно-сосудистой системы человека и экспериментальных животных” (номер государственной регистрации 0105U007837).*

**Резюме.** В работе исследована динамика количества соединительнотканых клеток внесосудистой стромы в различных участках миокарда левого и правого желудочков сердца крыс в пренатальном и раннем постнатальном периоде онтогенеза. Материалом исследования послужили сердца 115 белых крыс. Было исследовано 10 возрастных групп – от 14 суток пренатального развития до 20 суток постнатального развития. Численная плотность клеток внесосудистой стромы миокарда измерялась путем подсчета числа их ядер на единицу площади среза. В пренатальном периоде развития отдельно исследовались компактный и трабекулярный слои миокарда, в постнатальном периоде – субэндокардиальный, интрамуральный и субэпикардиальный слои миокарда. В результате проведенного исследования нами получена динамика количества соединительнотканых клеток в миокарде желудочков. Наибольшая интенсивность динамики числа стромальных клеток была отмечена дважды – на 14-16 сутки эмбрионального развития и в первые две недели после рождения. Динамика количества соединительнотканых клеток в компактном миокарде в пренатальном периоде имеет более высокие темпы по сравнению с трабекулярным миокардом. Такая закономерность может указывать на миграцию клеток со стороны развивающегося эпикарда в направлении к эндокарду. На всех этапах кардиогенеза динамика количественных изменений в соединительнотканном компоненте миокарда коррелировала с процессами дифференцировки кардиомиоцитов и развитием микрососудистого русла.

**Морфология.**– 2008.– Т. II, №1.– С.45-50  
© А.А.Горбунов, И.В.Твердохлеб, 2008

**Gorbulov A.A., Tverdokhle I.V. Quantitative ontogenetic assessment of connective tissue cell dynamics in the ventricular rat myocardium.**

**Resume.** In this work the dynamics of connective tissue cell number in nonvascular stroma have been studied in different myocardial sites of left and right ventricles in rat hearts during prenatal and early postnatal periods of ontogenesis. The materials of study were hearts of 115 white rats. It has been studied 10 age groups – from 14 days of prenatal development to 20 days of postnatal life. Nonvascular stromal cell quantitative density was estimated by calculation of there nuclei count referred to the square of the cut. During prenatal development it have been studied separately the compact layer and trabecular layer of myocardium, during postnatal period – subendocardial, intramural and subepicardial layers of myocardium. Following present study a quantitative evaluation of the connective tissue cell number dynamics has been evaluated in ventricular myocardium. The most intensive stromal cell number dynamics in the myocardium have been documented twice – at 14-16 days of embryologic development and at first two weeks after birth. The dynamics in connective tissue cells number during prenatal period had more prominent rate in the compact layer of myocardium in comparison with the trabecular layer. This pattern may point to cellular migration from the developing epicardium toward endocardium. At every stage of cardiogenesis the dynamics in quantitative changes in myocardial connective tissue component correlated with myocardiocyte differentiation and microvasculature formation.

**Key words:** myocardium, development, histogenesis, connective tissue.

### **Введение**

Современные данные об адаптивно-регенераторных возможностях миокарда (Rosenblatt-Velin N. et al., 2005; Tomita Y. et al., 2005; van Laake L. et al. 2006), а также успехи кардиомиопластики в экспериментах на животных (Angelini

P., Markwald R., 2005; Потапов И.В. и др., 2006; Boomsma R. et al., 2007) открывают новые перспективы в кардиологии как для практических врачей, так и для морфологов, изучающих строение и развитие сердца. Однако заболевания сердечно-сосудистой системы продолжают оста-

ваться ведущей причиной смертности во всем мире. Наиболее динамичным компонентом миокарда, изменяющимся при любых патологических процессах в сердце, является его соединительнотканый компонент. Исследования последних лет позволили получить новые данные о регуляторной роли соединительнотканых клеток в дефинитивном миокарде (Anversa P. et al., 2002; Kamkin A., Kiseleva I., 2005; Khan R., Sheppard R., 2006), а также в процессе кардиоге-неза (Wu S. et al., 2006; Banerjee I. et al., 2007). Вместе с тем, научные работы, посвященные развитию сердца, в недостаточной степени освещают вопросы количественных изменений внесосудистой стромы миокарда на этапах индивидуального развития. В связи с этим представляется актуальным изучение динамики количественных характеристик гистогенетических процессов (Кнорре А.Г., 1971) в соединительнотканном компоненте миокарда на разных этапах онтогенеза.

**Целью исследования** явилось изучение динамики количества соединительнотканых клеток внесосудистой стромы в различных участках миокарда правого и левого желудочков сердца крыс в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе.

#### Материалы и методы

Материалом исследования послужили сердца белых крыс на различных стадиях индивидуального развития. Было исследовано 10 возрастных групп: эмбрионы на 14, 16, 18, 20, 22 сутки пренатального развития, новорожденные, 5-, 10-, 15- и 20-суточные животные. Общее количество эмбриональных и неонатальных объектов составило 115. Процедуры получения материала соответствовали биоэтическим нормам работы с лабораторными животными. Образцы миокарда средней зоны стенки левого и правого желудочков фиксировали в смеси СУФ (этиловый спирт, уксусная кислота, формалин) по Лилли-Телесницкому (1969), обезжизняли в спиртах, заливали в парапласт. Гистологические срезы изготавливались в плоскости, перпендикулярной длинной оси сердца, толщина срезов составляла 4–5 мкм. Окрашивание проводили по методикам Ван-Гизон, Маллори в модификации Слинченко, фосфорно-вольфрамовым гематоксилином и железным гематоксилином Гейденгайна. Численная плотность клеток внесосудистой стромы миокарда ( $N_{\text{я}}$ ) измерялась путем подсчета числа их ядер на единицу площади среза. В пренатальном периоде развития отдельно исследовались компактный и трабекулярный слои миокарда, в постнатальном периоде – субэндокардиальный, интрамуральный и субэпикардиальный слои миокарда. Всего было проанализировано 2890 полей зрения. Полученные данные подвергались статистической обработке, включающей определение средних величин, ошибки средней, дисперсии, среднего квадратичного отклонения, коэффициента вариации. Достоверность полу-

ченных результатов, с учетом их нормального распределения, оценивалась с помощью t критерия Стьюдента при степени значимости  $p < 0,05$ . При отклонении распределений от нормальных использовали непараметрический X-критерий Ван-дер-Вардена (Лакин Г.Ф., 1990).

#### Результаты и их обсуждение

Появление единичных фибробластоподобных клеток, выявляемых на светооптическом уровне указанными гистологическими методами, в желудочковом миокарде отмечалось на 14 сутки эмбриогенеза. Большинство этих клеток локализовалось в компактном слое миокарда (субэпикардиально). В этот период их средняя численная плотность составляла  $0,13 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$ . Эти клетки отличались от кардиомиоцитов вытянутой или отросчатой формой, более плотным ядром, большим ядерно-цитоплазматическим соотношением. Клетки располагались преимущественно между кардиомиоцитами, а также периваскулярно (вблизи синусоидов или первичных капилляров).

На 16 сутки эмбриогенеза (рис. 1) наблюдалось значительное увеличение числа стромальных клеток ( $0,39 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$ ), причем в субэпикардиальных слоях количество соединительнотканых клеток было больше, чем в глубоких, субэндокардиальных, слоях (соответственно  $0,45$  и  $0,33 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$ ).

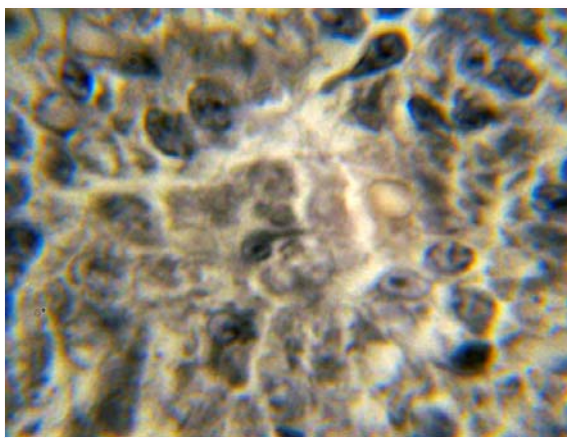


Рис. 1. Фрагмент миокарда левого желудочка (субэпикард), 16 сутки эмбриогенеза. Окраска железным гематоксилином Гейденгайна. Фибробластоподобные клетки имеют более плотное ядро, вытянутую неправильную форму.  $\times 1000$ .

Такая закономерность подтверждает сведения о миграции соединительнотканых клеток из формирующегося эпикарда и заселения ими сначала компактного слоя миокарда, затем и глубоких его слоев (Gittenberger-de Groot A.A., 1998).

Следует отметить, что этот период соответствовал интенсивному образованию сосудов микроциркуляторного русла в миокарде (Козлов В.А., 1996), а также накоплению гликозаминогликанов и структурных гликопротеинов в его межклеточном веществе, необходимых для по-

следующего фибриллогенеза (Павлов Г.Г., 1991; Твердохлеб И.В., 1996; Jenkins C., 2007).

В период с 18 по 22 сутки пренатального развития наблюдался умеренный рост количества соединительнотканых клеток на единицу площади миокарда (рис. 2). Так, на 18 сутки эмбриогенеза в миокарде стенки левого желудочка

насчитывалось 0,56, на 20 сутки – 0,63, на 22 сутки –  $0,67 \times 10^3$  ядер соединительнотканых клеток на  $1 \text{ мм}^2$  миокарда. С учетом увеличения массы всего сердца (Козлов В.А., 1996), удельное количество стромальных клеток в этот период увеличивалось незначительно.

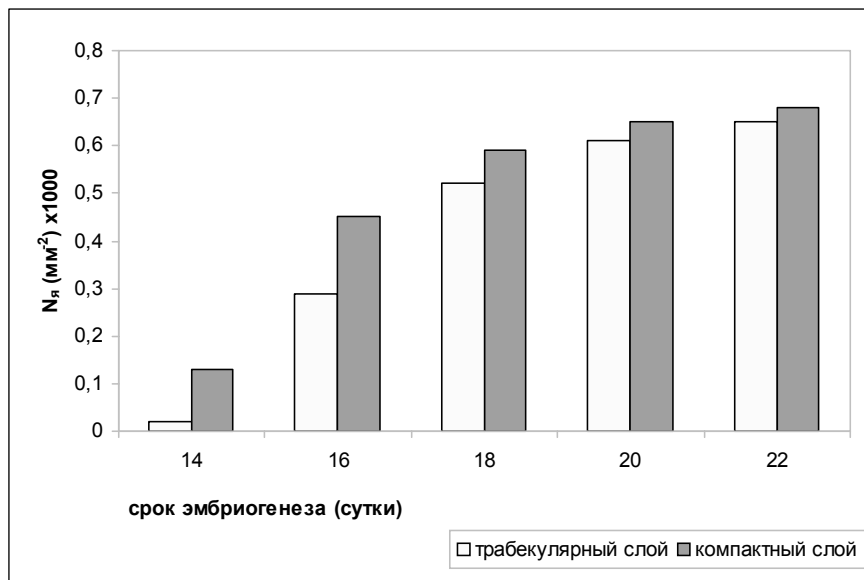


Рис. 2. Численная плотность клеток внесосудистой стромы миокарда стенки левого желудочка в пренатальном периоде.

К моменту рождения (рис. 3) число стромальных клеток в миокарде стенки левого желудочка составляло 0,71, правого –  $0,66 \times 10^3$  ядер на  $1 \text{ мм}^2$ . Среди популяции фибробластоподобных клеток выявлялись периваскулярные (адвентициальные) и интерстициальные фибробласты, которые не имели существенных морфологических отличий.

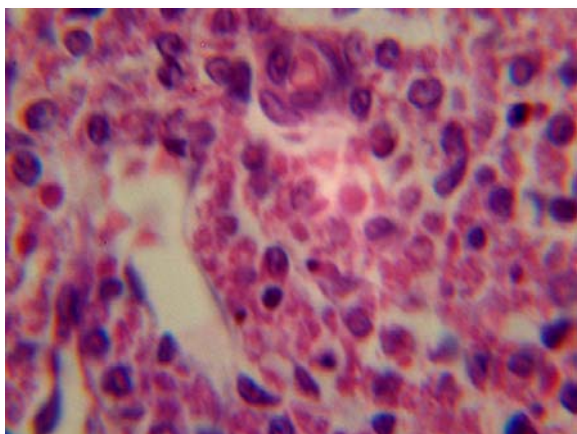


Рис. 3. Фрагмент миокарда левого желудочка (субэндокард), новорожденные. Фибробласты обнаруживаются между кардиомиоцитами и около сосудов. Окраска фосфорно-вольфрамовым гематоксилином.  $\times 900$ .

Ранний постнатальный кардиогенез характеризовался новым усилением роста числа соединительнотканых клеток (во всех слоях миокарда). Эта динамика отражает перестройку гистоархитектуры миокарда в связи с переходом к легочному дыханию и повышению функциональной нагрузки на сердечную мышцу (Загоруйко Г.Е., 1989). На 5 сутки постнатального периода средняя численная плотность соединительнотканых клеток составила для миокарда стенки левого желудочка 1,20, для миокарда стенки правого желудочка –  $1,19 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$ . Таким образом, темп увеличения количества соединительнотканых клеток в миокарде правого желудочка был несколько выше, чем в левом, что объясняется сравнительно большим увеличением его нагрузки в раннем постнатальном периоде.

К 10 дню постнатального развития крыс в миокарде желудочков отмечалось максимальное относительное количество соединительнотканых клеток (рис. 4). Их средняя численная плотность в стенке левого желудочка составила 1,61, правого –  $1,60 \times 10^3$  ядер на  $1 \text{ мм}^2$ .

В дальнейшем, на 15-е и 20-е сутки постнатального развития, этот показатель претерпевал обратную динамику (рис. 5, 6), что, наиболее вероятно, связано с опережающим ростом и дифференцировкой кардиомиоцитов (Загоруйко Г.Е., 1989; Твердохлеб И.В., 1996; Wulfsohn D. et al., 2004). Так, на 15 сутки средняя численная плот-

ность соединительнотканых клеток составила – 1,53, а на 20 сутки – уже  $1,31 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$ . Существенных различий в количестве стромальных клеток на единицу площади миокарда правого и левого желудочков нами не наблюдалось. В то же время распределение этих клеток по слоям миокарда было различным. Наибольшее количество клеток отмечалось в поверхностных (субэпикардиальных) слоях миокарда.

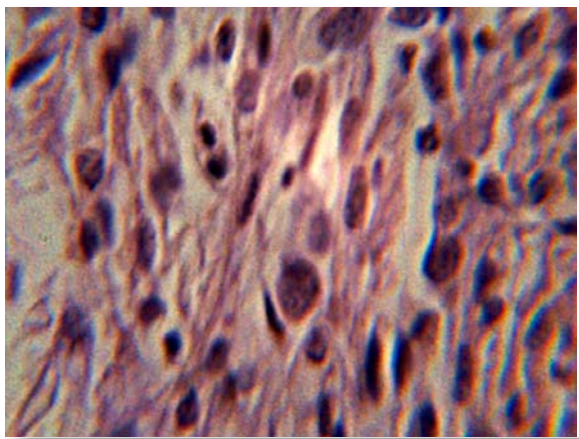


Рис. 4. Фрагмент миокарда правого желудочка (средний слой), 10 сутки. Преобладание клеток стромы (интерстициальные фибробласты и адвентициальные клетки, эндотелиоциты) над кардиомиоцитами. Окраска фосфорно-вольфрамовым гематоксилином.  $\times 1000$ .

## Заключение

В результате проведенного исследования нами получена динамика количества соединительнотканых клеток в миокарде желудочков. Наибольшая интенсивность динамики числа стромальных клеток была отмечена дважды – на 14-16 сутки эмбрионального развития и в первые две недели после рождения. Динамика количества соединительнотканых клеток в компактном миокарде в пренатальном периоде имеет более высокие темпы по сравнению с трабекулярным миокардом. Такая закономерность может указывать на миграцию клеток со стороны развивающегося эпикарда в направлении к эндокарду. На всех этапах кардиогенеза динамика количественных изменений в соединительнотканном компоненте миокарда коррелировала с процессами дифференцировки кардиомиоцитов и развитием микрососудистого русла.

Полученные данные позволяют судить о количественных особенностях процессов миграции и пролиферации соединительнотканых клеток развивающегося миокарда. Однако выявление конкретных механизмов и путей клеточной миграции в различных отделах миокарда требуют применения более совершенных методов исследования и дальнейшего изучения.

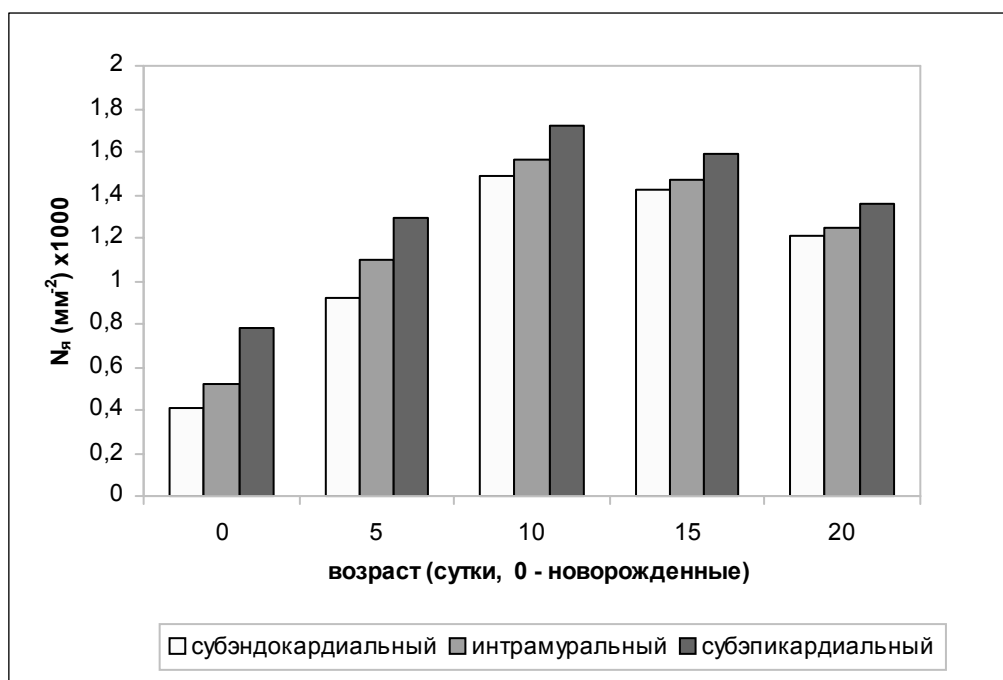


Рис. 5. Численная плотность клеток внесосудистой стромы различных слоев миокарда стенки левого желудочка в раннем постнатальном развитии.



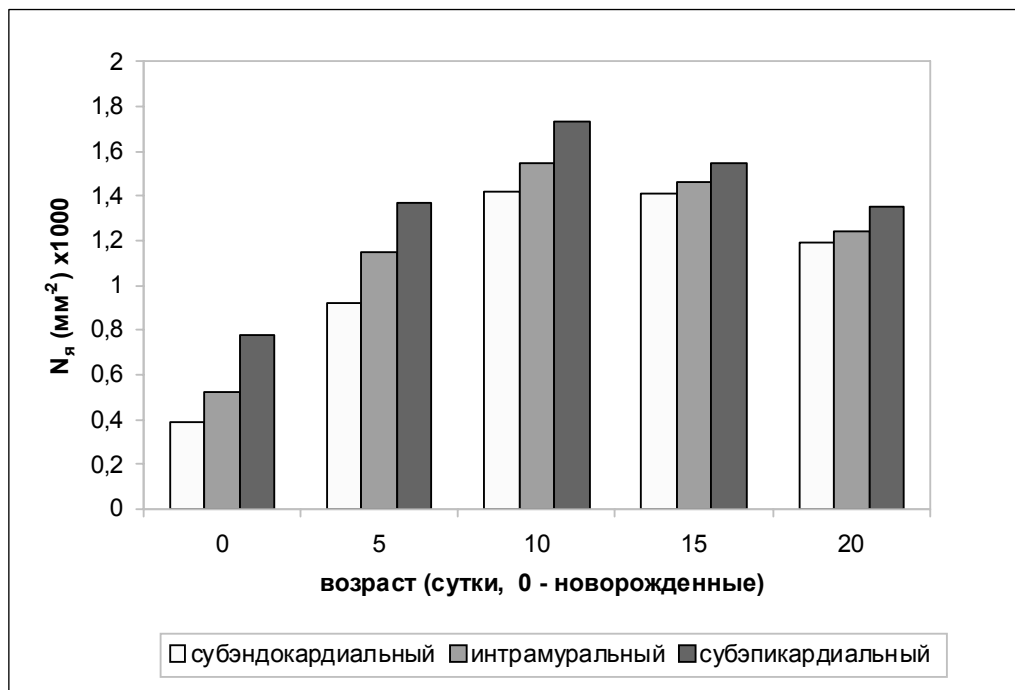


Рис. 6. Численная плотность клеток внесосудистой стромы различных слоев миокарда стенки правого желудочка в раннем постнатальном развитии.

#### Перспективы дальнейших исследований

Планируется изучение онтогенетической динамики волоконных элементов соединительной ткани миокарда, а также выполнение про-

странственной реконструкции соединительнотканного компонента фрагмента желудочкового миокарда.

#### Литературные источники

Загоруйко Г.Е. Раннее постнатальное развитие стромы миокарда крыс // Арх. анат. гистол. эмбр.– Т.97, №11.– С.5-7.

Кнорре А.Г. Эмбриональный гистогенез / Л.: Медицина, 1971.– 431 с.

Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов.- 4-е изд., перераб. и доп.- М.: Высшая школа, 1990.- 352 с.

Лилли Р. Патогистологическая техника / Пер. с англ. под ред. В.В.Португалова.– М.: Мир, 1969.– 645 с.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга как источник получения клеток для восстановительного морфогенеза миокарда / И.В.Потапов, И.А.Кириллов, М.Е.Крашенинников и др. // Тез. Ежегодной Всеросс. и междунар. науч. конф. «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении».– М., 2006.– С.25-26.

Павлов Г.Г. Стромальные компоненты сердца: развитие, структурные и функциональные особенности // Онтогенез.– 1991.– №6.– С.575-590.

Прикладная анатомия сердца / Под ред. В.А.Козлова.- Днепропетровск: Пороги, 1996.– 173 с.

Твердохлеб И.В. Гетерогенность миокарда и ее развитие в нормальном кардиомиогенезе.– Днепропетровск: Пороги, 1996.– 224 с.

A cell culture model using rat coronary artery adventitial fibroblasts to measure collagen production / C.Jenkins, A.Milsted, K.Doane, et al. // BMC Cardiovasc. Disord. – 2007.– Vol.7, №13.– P.2-10.

Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration / A.P.Beltrami, L.Barlucchi, D.Torella et al. // Cell.– 2003.– Vol.114, №6.– P.763-776.

Angelini P., Markwald R. Stem cell treatment of the heart // Tex. Heart Inst. J.– 2005.– Vol.32.– P.479-488.

Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart / Y.Tomita, K.Matsumura, Y.Wakamatsu et al. // JCB.– 2005.– Vol.170.– P.1135-1146.

Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse / I.Banerjee, J.W.Fuseler, R.L.Price, et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.– 2007.– Vol.293.– P. 1883-1891.

Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart / S.M.Wu, Y.Fujiwara, S.M.Cibulsky,

et al. // Cell.– 2006.– Vol.127, №6.– P.1137-1150.

Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions / A.C.Gittenberger-de Groot, F.M.Mark-Paul V.Peeters, et al. // Circ Res.– 1998.– Vol.82.– P.1043-1052.

FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes / N.Rosenblatt-Velin, M.G.Lepore, C.Cartoni et al. // J. Clin. Inv.– 2005.– Vol.115.– P.1724-1733.

Heart repair and stem cells / L.W. van Laake, R.Hassink, P.A.Doevandas, C.Mummery // J. Physiol.– 2006.– Vol.577, №2.– P.467-478.

Intravenously injected mesenchymal stem cells home to viable myocardium after coronary occlusion and preserve systolic function without altering infarct size / R.A.Boomsma, P.D.Swaminathan, L.David, D.L.Geenen // Int. J. Cardiology.– 2007.– Vol.122.– P.17-28.

Khan R., Sheppard R. Fibrosis in heart disease:

understanding the role of TGF in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia // Immunology.– 2006.– Vol.118.– P.10-24.

Mechanosensitivity in cells and tissues / Ed. by A.Kamkin, I.Kiseleva // M: Академия, 2005.– 480 с.

Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium-derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization / H.Lie-Venema, I.Eralp, S.Maas et al. // Anat. Rec.– 2005.– Vol.282A.– P.120-129.

Myocardial regeneration / P.Anversa, D.Torella, J.Kajstura et al. // Eur. Heart J. Suppl.– 2002.– Vol.4.– P.67-71.

Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat / D.Wulfsohn, J.R.Nyengaard, Y.Tang et al. // Anat Rec.– 2004.– Vol.277A.– P.236-247.

#### **Горбунов А.О., Твердохліб І.В. Кількісна онтогенетична динаміка сполучнотканинних клітин у шлуночковому міокарді щурів.**

**Резюме.** У роботі досліджена динаміка кількості сполучнотканинних клітин позасудинної строми у різних ділянках міокарда лівого та правого шлуночків серця щурів в пренатальному та раньому постнатальному періоді онтогенеза. Матеріалом дослідження послужили серця 115 білих щурів. Було досліджено 10 вікових груп – від 14 доби пренатального розвитку до 20 доби постнатального розвитку. Чисельна щільність клітин позасудинної строми міокарда вимірювалась шляхом підрахунку числа їх ядер на одиницю площини зрізу. В пренатальному періоді розвитку окремо було досліджено компактний та трабекулярний шари міокарда, у постнатальному періоді – субендокардіальний, інтрамуральний та субепікардіальний шари міокарда. В результаті проведеного дослідження нами отримана динаміка кількості сполучнотканинних клітин в міокарді шлуночків. Найбільша інтенсивність динаміки числа стромальних клітин була відмічена двічі – на 14-16 добу ембріонального розвитку та в перші два тижні після народження. Динаміка кількості сполучнотканинних клітин у компактному міокарді в пренатальному періоді мала більш вищі темпи у порівнянні з трабекулярним міокардом. Така закономірність може вказувати на міграцію клітин з боку епікарду, що розвивається у напрямку до ендокарда. На всіх етапах кардіогенеза динаміка кількісних змін у сполучнотканинному компоненті міокарда корелювала з процесами диференціювання кардіоміоцитів та розвитком мікросудинного русла.

**Ключові слова:** міокард, розвиток, гістогенез, сполучна тканина.