

## КЛЕТОЧНЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ: РОЛЬ ПОЛИПЛОИДИИ КАРДИОМИОЦИТОВ И АКТИВАЦИИ В МИОКАРДЕ ЯДЕРНОГО АНТИГЕНА ПРОЛИФЕРИРУЮЩЕЙ КЛЕТКИ

©Е. В. Шляхто,<sup>1</sup> Л. А. Бокерия,<sup>2</sup> М. Г. Рыбакова,<sup>1</sup> Е. Н. Семернин,<sup>1</sup>  
Г. В. Селиванова,<sup>3</sup> Т. Д. Власова,<sup>3</sup> К. В. Борисов,<sup>2</sup> В. Н. Парфенов,<sup>3</sup> А. Я. Гудкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра факультетской терапии им. акад. Г. Ф. Ланга

Государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. акад. А. Н. Бакулева, Москва,

и <sup>3</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; <sup>1</sup>электронный адрес: alexgud@sptmu.rssi.ru

С целью сравнительного анализа цитоморфологических характеристик гипертрофированной межжелудочковой перегородки (МЖП) сердца обследованы пациенты с тяжелым течением обструктивной гипертрофической кардиомиопатии (ОГКМП) разного возраста, включая детей, и больные эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ). Обнаружено, что течение ОГКМП у детей по сравнению со взрослыми характеризуется выраженной гипертрофией МЖП и сопровождается ускорением полиплоидизации кардиомиоцитов. Средняя плоидность кардиомиоцитов детей с ОГКМП выше, чем аналогичный показатель у взрослых пациентов. Средняя плоидность ядер и количество PCNA (proliferative cell nuclear antigen)-позитивных и полиплоидных ядер кардиомиоцитов у взрослых с ОГКМП достоверно выше, чем у больных ЭАГ. PCNA-позитивные метки в клетках стромы обнаружены только у больных ОГКМП. Полученные данные свидетельствуют о важной роли полиплоидии кардиомиоцитов и активации ядерного антигена пролиферирующей клетки в развитии гипертрофии миокарда при ОГКМП.

**Ключевые слова:** обструктивная гипертрофическая кардиомиопатия, полиплоидия, кардиомиоциты, клетки стромы.

**Принятые сокращения:** ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ОГКМП — обструктивная гипертрофическая кардиомиопатия, КМЦ — кардиомиоциты, МЖП — межжелудочковая перегородка, ЭАГ — эссенциальная артериальная гипертензия, PCNA — ядерный антиген пролиферирующей клетки (proliferative cell nuclear antigen).

Идиопатическая гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) — генетически обусловленное заболевание, в основе которого лежат мутации генов, кодирующих выработку различных белков кардиомиоцита (КМЦ) (Polias et al., 2006). В подавляющем большинстве случаев (95 %) наблюдается асимметричная гипертрофия миокарда — гипертрофия межжелудочковой перегородки (МЖП) (Wigle, 2001). Как правило, наиболее тяжелое течение заболевания и неблагоприятный прогноз наблюдаются при мутациях генов, сопровождающихся выраженной гипертрофией миокарда, и при обструктивной форме заболевания (Braunwald et al., 1964; Bonne et al., 1998). У взрослых пациентов толщину стенки левого желудочка размером 3.0 см и более необходимо учитывать при стратификации риска смерти (Wigle, 2001; Maron et al., 2003).

Гипертрофия миокарда как компенсаторно-приспособительная реакция ассоциирована с запрограммированным ответом в различных типах клеток миокарда, включая КМЦ, фибробласты, клеточные элементы сосудистых стенок и свободные клетки стромы. В основу одной из двух точек зрения на механизмы гипертрофии миокарда положено представление о том, что подавляющее большинство КМЦ взрослого человека являются терминально-дифференцированными клетками с крайне низкой спо-

собностью к митотическому делению. Принято считать, что гипертрофия КМЦ, достигших окончательной дифференцировки, происходит за счет увеличения размера и количества функционирующих внутриклеточных структур (внутриклеточная гипертрофия и регенерация) (Саркисов, 1970). В последние годы большую популярность получила другая точка зрения, согласно которой различные виды стресса стимулируют как гипертрофию, так и пролиферацию КМЦ. В таком случае индукция синтеза ДНК в КМЦ может завершиться делением, образованием дву- или многоядерной клетки, а также увеличением плоидности ядра (Румянцев, 1980; Бродский, Урываева, 1981; Busk, Hinrichsen, 2003; Field, 2004).

Механизмы генетически обусловленной гипертрофии миокарда мало исследованы. Показано, что у детей с врожденными и приобретенными пороками сердца хроническая гиперфункция миокарда стимулирует повышение уровня плоидности не только желудочковых, но и предсердных миоцитов (Brodsky et al., 1994; Ерохина и др., 1995, 1997). Имеются единичные сообщения об увеличении доли полиплоидных ядер КМЦ и активации ядерного антигена пролиферирующей клетки (PCNA) в миокарде больных ГКМП (Matturri et al., 2002; Diaz et al., 2006).

Генетически обусловленная гипертрофия миокарда при ГКМП нередко сопровождается нарушением архитектоники миокарда и значительным увеличением стромы миокарда за счет различных форм фиброза (Emeriau et al., 1976; Factor et al., 1991; Davies, McKenna, 1995; Marian et al., 1995). Мы нашли в литературе только одну работу, посвященную иммуногистохимическому анализу маркеров пролиферации (Ki-67 и PCNA) в ядрах клеток стромы миокарда больных ГКМП (Martinez-Diaz et al., 2004). В связи с этим очевидно, что продолжение исследований клеточных механизмов гипертрофии миокарда больных ГКМП является настоящей необходимостью.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении структурно-функционального состояния ядер КМЦ и клеток стромы в МЖП пациентов с обструктивной ГКМП (ОГКМП) разного возраста. В задачи исследования входило оценить толщину МЖП, проанализировать морфологию миокарда, определить плоидность ядер КМЦ, а также количество PCNA-позитивных ядер КМЦ и клеток стромы у пациентов с ОГКМП разного возраста.

### Материал и методика

Обследованы 19 детей и 47 взрослых пациентов с ОГКМП. Возраст пациентов детской группы во время клинического и морфологического исследования варьировал от 5 лет до 21 года ( $14.1 \pm 1.1$  года), а взрослых пациентов — от 27 до 82 лет ( $49.8 \pm 3.2$  года). Сочетание ОГКМП с врожденными пороками сердца выявлено у 5 из 66 пациентов (7.6%). У 5 других пациентов (7.6%) имело место сочетание с системными заболеваниями соединительной ткани. У 15 из 47 взрослых пациентов диагностировано сочетание ОГКМП и ЭАГ (31.9%). Для подавляющего большинства пациентов с ОГКМП, включенных в данное исследование, характерна высокая степень выраженности клинических и морфологических проявлений заболевания, соответствующая 100% пенетрантности. Крайняя степень выраженности гипертрофии МЖП явилась абсолютным показанием для хирургической коррекции ОГКМП. У 19 пациентов прогрессирующее течение заболевания привело к летальному исходу. За период с 1998 по 2006 г. умерли 2 детей и 17 взрослых пациентов. Эхокардиографическое исследование проводили на аппарате Sonoline G60S (Siemens, Германия) по стандартному протоколу (Devereux et al., 1986; Шиллер, Осипов, 1993) с использованием датчика с частотой 3.5 МГц.

Морфологическому исследованию подлежали интраоперационные образцы миокарда правой и левой половин МЖП больных ОГКМП, а в случаях летального исхода — экспресс-аутопсии миокарда МЖП. Образцы миокарда фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, заливали в парафин и приготавливали срезы миокарда толщиной 8—10 мкм. Использовали методы стандартного окрашивания гистологических срезов миокарда гематоксилином и эозином, а также по Ван Гизону. Морфометрический анализ площади стромы миокарда проводили с использованием оптической установки (световой микроскоп Zeiss AxioStar Plus, Германия) и цифровой видеокамеры (Baumer Optronics, Германия) и программы компьютерного анализа видеозображения Video Test v.4 (Видеотест-4, Россия). Степень выраженности беспорядочного расположения КМЦ и мышечных волокон оценивали полуколичественно, используя шкалу от 0 до 4 баллов (Sutton et al., 1980).

Содержание ДНК определяли в ядрах изолированных КМЦ, окрашенных по Фельгену; гидролиз препаратов проводили в 5 н. HCl в течение 8 мин при 37 °С. Мазки изолированных КМЦ получали методом диссоциации миокарда в 50%-ном растворе КОН (3 ч) после предварительной фиксации материала в 10%-ном нейтральном формалине в течение 15 сут. Содержание ДНК в ядрах измеряли цитофотометрически (цитофотометр МЦФУ-1; ЛОМО, Санкт-Петербург). При определении степени плоидности КМЦ в качестве диплоидного стандарта (2c) использовали ядра лимфоцитов пациентов с ОГКМП, содержание ДНК в которых составило  $2.03 \pm 0.03$  усл. ед. (Селиванова, Власова, 1990). PCNA выявляли иммуногистохимически, используя моноклональные антитела к PCNA, согласно инструкции фирмы-производителя (Santa Cruz Biotechnologies, США). В качестве вторых антител использовали конъюгированную стрептавидин-хрен-пероксидазу (ДАКО, Дания). При сравнительном анализе уровня плоидности и количества PCNA-позитивных КМЦ и клеток стромы взрослых пациентов с ОГКМП использовали аналогичные цитоморфологические показатели правой и левой половин МЖП у 15 умерших с ЭАГ, сопоставимых по полу и возрасту.

### Результаты

У 35 из 66 пациентов (53.3%) с ОГКМП толщина МЖП оказалась максимальной в ее верхней трети, а у остальных (46.7%) диагностирована среднежелудочковая форма ОГКМП, при которой толщина МЖП максимальна в ее средней трети.

Анализ зависимости выраженности асимметричной гипертрофии МЖП от возраста пациентов с ОГКМП (рис. 1) показал, что максимальное число пациентов с

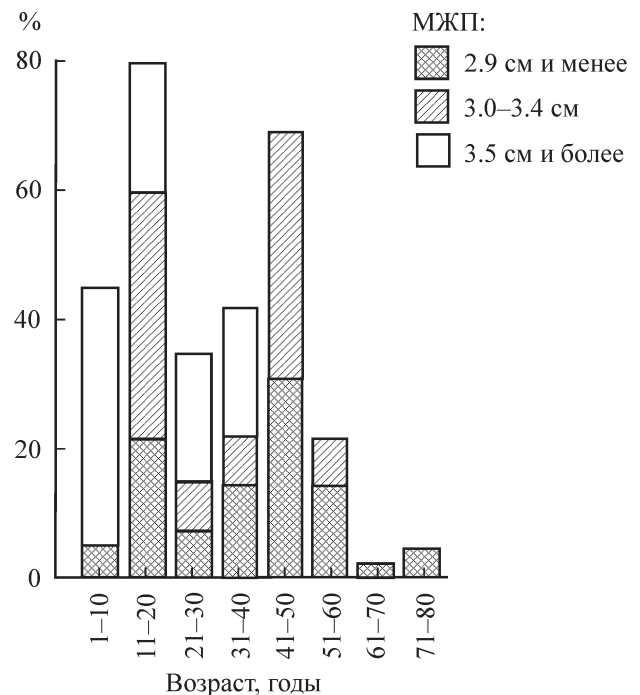


Рис. 1. Зависимость толщины межжелудочковой перегородки (МЖП) в ее верхней трети от возраста пациентов с обструктивной гипертрофической кардиомиопатией.

По вертикали — доля пациентов с указанной толщиной МЖП, %.



крайней выраженностью гипертрофии миокарда (толщина МЖП в верхней трети 3.5 см и более) — в возрасте до 20 лет. В возрасте 21—40 лет частота случаев ОГКМП с крайне выраженной гипертрофией миокарда приблизительно одинакова. В этих возрастных группах число пациентов с толщиной МЖП в верхней трети 3.5 см и больше значительно выше, чем с толщиной 3.0—3.4 или 2.9 см и меньше. Среди пациентов старше 41 года не встречалось случаев, когда толщина МЖП в верхней трети была 3.5 см и больше. У пациентов с ОГКМП в возрасте 61 года и старше толщина МЖП в верхней трети не превышала 2.9 см. Схожий характер зависимости найден при анализе связи между возрастом пациентов с ОГКМП и толщиной МЖП в ее средней трети.

В группе ЭАГ выявлена симметричная гипертрофия миокарда. Толщина МЖП в верхней трети варьировала от 1.0 до 1.4 см ( $1.06 \pm 0.6$  см). Во всех случаях толщина в верхней и средней третях МЖП была одинаковой.

Микроскопически у всех пациентов с ОГКМП в месте максимального утолщения МЖП обнаруживали участки беспорядочного расположения КМЦ (рис. 2). Распространенность и степень нарушений архитектоники миокарда варьировали от случая к случаю и в пределах анализируемых полей зрения гистологических препаратов миокарда одного и того же пациента. У детей с ОГКМП тяжесть нарушений архитектоники миокарда была более выражена и в подавляющем большинстве случаев соответствовала 2, 3 или 4 баллам. У взрослых пациентов тяжесть нарушений архитектоники миокарда варьировала от 0 до 4 баллов (шкалу см.: Sutton et al., 1980). Доля стромы в правой половине МЖП у детей варьировала от 1.08 до 6.67 % ( $3.62 \pm 0.30$  %) и была ниже ( $P < 0.005$ ), чем у взрослых пациентов, у которых этот показатель колебался от 2.12 до 10.60 % ( $5.36 \pm 0.34$  %).

Проанализирована плоидность ядер КМЦ из правой и левой половин МЖП пациентов с ОГКМП и больных ЭАГ. Максимальная плоидность ядра КМЦ для каждого пациента детской группы варьировала в широких пределах — от 16.7 до 119.4с. Максимальная плоидность ядра КМЦ взрослых с ОГКМП колебалась от 11.3 до 80.9с. Средняя плоидность ядер КМЦ в группе детей с ОГКМП варьировала от случая к случаю в пределах от 5.16 до 34.5с. Средняя плоидность ядра КМЦ в группе взрослых с ОГКМП колебалась у разных пациентов от 3.5 до 17.7с. Средняя плоидность ядра КМЦ детей с ОГКМП ( $15.2 \pm 2.1$ с) была выше ( $P < 0.017$ ), чем у взрослых пациентов ( $9.88 \pm 0.7$ с).

Доля полиплоидных ядер КМЦ (содержание ДНК более 5с) у детей с ОГКМП варьировала от 12 до 100 %, а у взрослых пациентов — от 9 до 96 %. У детей с ОГКМП среднее количество полиплоидных ядер КМЦ ( $83.3 \pm 4.4$  %) было выше, чем у взрослых пациентов ( $64.8 \pm 3.4$  %;  $P < 0.001$ ). Доля полиплоидных ядер КМЦ у взрослых пациентов с ОГКМП выше, чем у больных ЭАГ ( $41.2 \pm 6.8$  %;  $P < 0.005$ ).

Средняя плоидность ядер КМЦ в левой половине МЖП у пациентов с ЭАГ варьировала от индивидуума к индивидууму в пределах от 4.5 до 9.2с, составляя в среднем  $6.7 \pm 0.7$ с. Та же величина для правой половины МЖП больных ЭАГ варьировала от случая к случаю в меньших пределах (3.5—4.7с, в среднем  $3.9 \pm 0.1$ с) и была ниже ( $P < 0.013$ ), чем средняя плоидность ядер КМЦ в левой половине МЖП больных ЭАГ. Средняя плоидность ядра КМЦ из правой ( $P_1 < 0.001$ ) и левой ( $P_2 < 0.01$ ) половин МЖП больных ЭАГ была ниже, чем аналогичный по-

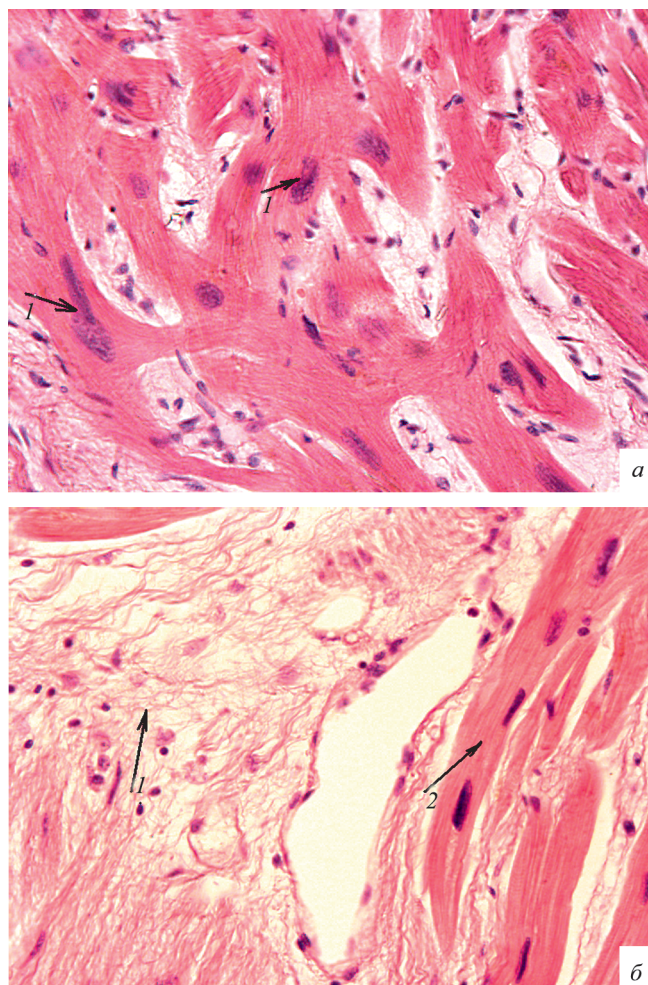


Рис. 2. Примеры нарушения архитектоники миокарда.

*а* — кардиомиоциты (КМЦ) с множественными, беспорядочно расположенными межмышечными мостиками, в результате которых образуются КМЦ неправильной звездчатой формы; деление ядер КМЦ без деления цитоплазмы (стрелка 1). *б* — увеличение доли стромы в миокарде больных обструктивной гипертрофической кардиомиопатией; тонкие извитые, беспорядочно расположенные коллагеновые волокна (стрелка 1); дисконплексация мышечных волокон по типу ветвления; близко расположенные ядра кардиомиоцитов (стрелка 2). Об. 40 $\times$ , ок. 10 $\times$ .

казатель КМЦ из правой половины МЖП больных ОГКМП. При этом значения средней плоидности ядер КМЦ правой и левой половин МЖП больных ОГКМП не различались.

В МЖП детей и взрослых с ОГКМП встречались крупные ядра КМЦ неправильной, уродливой формы, например звездчатые, подковообразные, палочковидные, многолопастные и т. п., а также парные ядра. Важной особенностью КМЦ пациентов с ОГКМП разного возраста оказалось наличие в них «цепочек» ядер, состоящих из 3 и более соприкасающихся ядер (деление ядер без деления цитоплазмы). Метка PCNA обнаружена не над всеми ядрами в «цепочке», что свидетельствует об асинхронности протекания синтетических процессов и может служить объяснением возможности появления нечетного количества ядер в «цепочке». У детей с ОГКМП доля PCNA-позитивных ядер КМЦ варьировала от 1 до 14 % ( $5.6 \pm 0.8$  %) и не отличалась от аналогичного показателя у взрослых пациентов ( $4.1 \pm 0.3$  %), у которых доля PCNA-позитивных ядер КМЦ колебалась от 1 до 12 % (рис. 3, *а*).



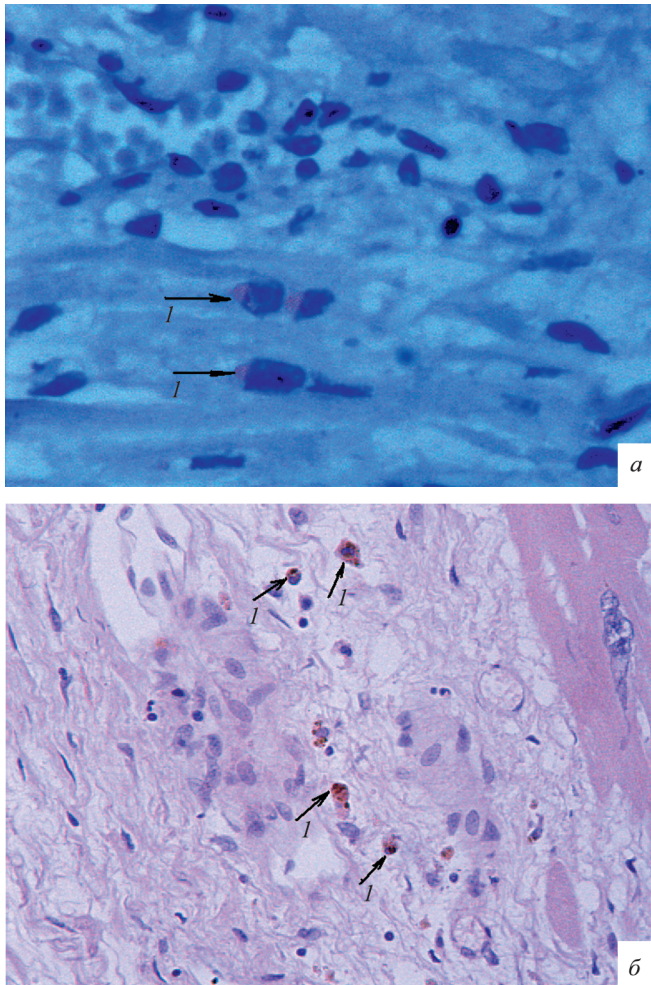


Рис. 3. PCNA-позитивные ядра кардиомиоцитов (а) и клеток стромы (б) пациентов с обструктивной гипертрофической кардиомиопатией.

Ядра с «меткой» PCNA показаны стрелками 1. Об. 100×, ок. 10×.

Необходимо отметить, что метки PCNA обнаружены не только в оседлых, но и в свободных клетках стромы миокарда больных ОГКМП и выявлялись повсеместно (и в стенках сосудов, и между мышечными волокнами). У детей с ОГКМП доля PCNA-позитивных ядер клеток стромы (свободных и оседлых) варьировала от 2 до 11 % ( $5.5 \pm 0.6$  %) и также не отличалась от аналогичного показателя у взрослых пациентов ( $5.9 \pm 0.7$  %), у которых доля ядер с меткой PCNA варьировала от 0 до 17 % (рис. 3, б). В миокарде пациентов с ЭАГ встречались единичные PCNA-позитивные ядра КМЦ. PCNA-позитивных ядер клеток стромы в миокарде больных ЭАГ не обнаружено.

### Обсуждение

Итак, нами была предпринята попытка изучения особенностей патогенеза ГКМП в разных возрастных группах пациентов с обструктивной формой заболевания и выраженной гипертрофией миокарда, при которой толщина МЖП у многих пациентов достигала крайней степени — более 3.5 см. Морфологические характеристики ми-

окарда взрослых пациентов с ГКМП принято сопоставлять с аналогичными данными больных ЭАГ таких же пола и возраста. Как и в ряде других исследований, показано, что средняя ploидность и количество полиploидных КМЦ при ОГКМП выше, чем при ЭАГ (Matturri et al., 1997, 2002; Diaz et al., 2006). Повышение уровня ploидности и увеличение количества полиploидных КМЦ при ЭАГ возникают в ответ на действие гемодинамических факторов (Yabe et al., 1983; Brodsky et al., 1994). Причины, лежащие в основе ускорения полиploидизации КМЦ и активации PCNA в КМЦ и клетках стромы при генетически обусловленной гипертрофии у больных ОГКМП, неизвестны. Полиploидизация является разновидностью пролиферации, при которой митотический цикл осуществляется не до конца. Полиploидия вместе с увеличением «дозы» генов может увеличить транскрипционную, а также метаболическую активность в полиploидных клетках. Мультипликация генома может способствовать дифференцировке клеток как части программы развития. Множественные генные копии могут также быть «выгодными» и для преодоления повреждения ДНК, вызванного факторами среды и генетическими ошибками, и как защита против окислительного повреждения в органах, которые работают на пределе своих метаболических возможностей. Более того, полиploидизация не требует реорганизации цитоскелета и может способствовать более быстрому росту КМЦ (Бродский, 1995). Все это, по-видимому, важно для выживания КМЦ с генетически обусловленными дефектами структурных белков. Высокой ploидности ядер КМЦ больных ОГКМП по сравнению с пациентами, больными ЭАГ, соответствует высокий индекс метки PCNA в ядрах КМЦ. Таким образом, в медленно обновляющихся популяциях клеток, каковыми являются КМЦ человека, при разных видах гипертрофии (генетически обусловленной и вторичной по отношению к повышению артериального давления) обнаружен различный ростовой ответ КМЦ.

Прогрессирование асимметричной гипертрофии МЖП у детей с ОГКМП наблюдали многие авторы (Maron, Roberts, 1981; Maron et al., 1986, 2003; Maron, 2004). В настоящей работе не только показано прогрессирование асимметричной гипертрофии миокарда у детей и подростков, но и установлено, что при прогрессировании гипертрофии МЖП в пубертатном и препубертатном периодах важную роль играют такие процессы в КМЦ, как активация PCNA, ускорение полиploидизации и увеличение количества ядер высокой ploидности. Совпадение периодов ускоренного роста ребенка и прогрессирования гипертрофии МЖП с полиploидией КМЦ (закономерным явлением онтогенеза) — важная особенность, характеризующая течение ОГКМП у детей. Как известно, у здорового новорожденного около 90 % ядер миоцитов желудочкового миокарда являются диплоидными. Переход к полиploидному состоянию начинается в раннем постнатальном периоде, и к 9 годам большинство ядер КМЦ становятся тетраploидными (Sandritter, Scomazzoni, 1964; Sandritter, Alder, 1978; Румянцев, 1980; Alder, Friedburg, 1986). Строгая приуроченность полиploидизации КМЦ к определенному периоду жизни свидетельствует о ее генетической детерминированности. Одним из возможных объяснений более высокого содержания ДНК в ядрах КМЦ у детей может быть факт совпадения периода естественной полиploидизации с вкладом механизмов, активируемых в этот период и обусловленных мутациями различных белков КМЦ.

Полипloidию КМЦ, являющуюся результатом незавершенного митоза, по мнению Бродского (1995), можно рассматривать как компенсаторный резерв гипертрофии миокарда. С другой стороны, такие события, как увеличение доли ядер КМЦ, содержащих PCNA, ускорение полиплоидизации ядер КМЦ в асимметрично утолщенной МЖП детей и взрослых с ОГКМП (по сравнению с симметрично утолщенной МЖП больных ЭАГ), отражают, по-видимому, повышенную пролиферативную активность миоцитов. Однако в этой ситуации необходимо учитывать два обстоятельства, которые могут способствовать затруднению полноценных митозов в КМЦ. Во-первых, плотность миофибрилл создает непреодолимый барьер при прохождении цитокинеза терминально-дифференцированными КМЦ (Soonpaa, Field, 1998). Во-вторых, у больных ГКМП дополнительные препятствия при прохождении цитокинеза КМЦ могут возникать вследствие тяжелой дезорганизации миофибрилл и миоцитов, а также увеличения доли стромы в миокарде (Tezuka, 1975). По нашим данным, у детей с ОГКМП степень нарушения архитектоники миокарда достоверно выше, чем у взрослых. В определенной мере это может объяснять, почему обнаруженная цитометрически и иммуногистохимически потенциально высокая способность КМЦ больных ОГКМП к пролиферации реализуется преимущественно на уровне ядер. Высокий пролиферативный потенциал КМЦ из МЖП больных ОГКМП характеризуется делением ядер без деления цитоплазмы, активацией PCNA пролиферирующей клетки и увеличением частоты таких клеточных событий, как полиплоидия ядер или незавершенные митозы в популяции КМЦ.

В то же время увеличение уровня ploидности ядер и доли PCNA-позитивных КМЦ не только свидетельствует об активации их пролиферативной способности, но и служит основанием для предположения о существовании в миокарде больных ОГКМП достаточного количества КМЦ, не достигших терминальной дифференцировки. В пользу такого предположения служат данные, которые продемонстрировали, что гипертрофированный миокард пациентов с врожденными и приобретенными пороками сердца колонизирован большим количеством миоцитов, экспрессирующих маркеры ранних предшественников и неокончательно дифференцированных КМЦ (Urbanek et al., 2003). Необходимо отметить, что пациенты, у которых диагностировано сочетание патологий (ГКМП и различные врожденные пороки), встречаются не так редко (Harrison et al., 1977; Feizi et al., 1978; Conte et al., 1998; Bruce et al., 1999). В последние годы появились первые свидетельства в пользу общности некоторых механизмов развития врожденных пороков и ГКМП (Garg, 2003).

Заслуживает внимание то, что у детей с ОГКМП показатель, характеризующий активность синтеза ДНК в КМЦ (доля PCNA-позитивных ядер), сопоставим с аналогичным показателем у взрослых пациентов. Однако необходимо отметить, что не все PCNA-позитивные ядра, наблюдаемые в исследуемом образце ткани, свидетельствуют об активности репликации ДНК. Метка PCNA может также присутствовать в ядрах клеток, в которых происходит репарация ДНК, независимо от конечной эффективности этого процесса (устранение повреждения или несостоятельность репарации и гибель) (Soonpaa, Field, 1998; Kanoh et al., 1999; Koda et al., 2003). Поэтому одно из логичных объяснений сопоставимых значений доли PCNA-позитивных КМЦ при снижении среднего содержания ДНК в ядрах КМЦ у взрослых пациентов с ОГКМП может быть

связано с активностью репарации ДНК в ответ на более выраженное повреждение КМЦ. В этой ситуации активация PCNA пролиферирующей клетки в свободных и оседлых клетках стромы обусловлена вторичностью изменений стромы по отношению к гибели КМЦ.

Известно, что течение заболевания в ряде случаев может осложниться развитием некоронарогенного инфаркта миокарда, площадь и глубина которого при ГКМП у взрослых варьируют от небольших очагов до обширных трансмуральных рубцов (Fujiwara et al., 1987; Varnava et al., 2000). При этом доля стромы в миокарде взрослых с ОГКМП больше, чем у детей, а доля PCNA-позитивных клеток стромы в миокарде пациентов детского возраста сопоставима с аналогичным показателем у взрослых с ОГКМП. Данное обстоятельство не позволяет исключить генетическую обусловленность повышенной активации пролиферативной способности оседлых и свободных клеток стромы миокарда и в определенной мере — независимость этого процесса от гемодинамической и структурной ситуации. Подобное предположение не является неожиданным. Постоянный рост коллагенового матрикса и прогрессирование фиброза отмечены при экспериментальной ГКМП у хомячков (Nigro et al., 1997). Это само по себе является важным обстоятельством, так как в оседлых и свободных клетках стромы синтезируется множество цитокинов, ростовых и плеотропных факторов, вовлеченных в клеточную миграцию, пролиферацию и дифференцировку.

Таким образом, механизмы, лежащие в основе гипертрофии МЖП пациентов с ОГКМП, включают в себя кроме уже идентифицированных генетических дефектов ускоренную полиплоидизацию КМЦ и активацию PCNA в ядрах КМЦ оседлых и свободных клеток стромы миокарда. Существуют серьезные основания предполагать существование в миокарде больных ОГКМП определенной доли КМЦ, не достигших окончательной дифференцировки, обладающих повышенной готовностью к пролиферации, которая в свою очередь реализуется в условиях генетически обусловленного нарушения архитектоники сократительных элементов и увеличения доли стромы миокарда.

#### Список литературы

- Бродский В. Я. 1995. Полиплоидия в миокарде — компенсаторный резерв сердца. Бюл. эксперим. биол. мед. 235 : 454—459.
- Бродский В. Я., Урываева И. В. 1981. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука. 257 с.
- Ерохина И. Л., Селиванова Г. В., Власова Т. Д., Емельянова О. И. 1995. Содержание ДНК и белка в кардиомиоцитах предсердия. Размеры и ультраструктура кардиомиоцитов у детей при некоторых врожденных пороках сердца. Цитология. 37 (1/2) : 101—108.
- Ерохина И. Л., Селиванова Г. В., Власова Т. Д., Емельянова О. И. 1997. Корреляция между уровнем полиплоидии и гипертрофии степенью повреждения кардиомиоцитов предсердия человека при некоторых врожденных и приобретенных патологиях сердца. Цитология. 39 (10) : 889—897.
- Румянцев П. П. 1980. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука. 288 с.
- Саркисов Д. С. 1970. Регенерация и ее клиническое значение. М.: Медицина. 284 с.
- Селиванова Г. В., Власова Т. Д. 1990. Цитометрическое сопоставление возрастных изменений содержания ДНК и белка в предсердных кардиомиоцитах людей при некоторых заболеваниях сердца. Цитология. 32 (7) : 704—711.



- Шиллер Н., Осипов М. А. 1993. Клиническая эхокардиография. М.: Внешторгиздат. 347 с.
- Adler C., Friedburg H. 1986. Myocardial DNA content, ploidy level and cell number in geriatric hearts: post-mortem examinations of human myocardium in old age. *J. Mol. Cell Cardiol.* 18 : 39—53.
- Bonne G., Carrier L., Richard P., Hainque B., Schwartz K. 1998. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ. Res.* 83 : 580—593.
- Braunwald E., Lambrew C., Rockoff D. 1964. Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis, I: a description of the disease based upon an analysis of 64 patients. *Circulation.* 30 (Suppl. IV) : 3—19.
- Brodsky V. Y., Sarkisov D. S., Arefyeva A. M., Panova N. W., Gvasava I. G. 1994. Polyploidy in cardiac myocytes of normal and hypertrophic human hearts; range of values. *Virchows Arch.* 424 : 429—435.
- Bruce C., Nishimura R., Tajik A., Schaff H., Danielson G. 1999. Fixed left ventricular outflow tract obstruction in presumed hypertrophic obstructive cardiomyopathy: implications for therapy. *Ann. Thorac. Surg.* 68 : 100—104.
- Busk P. K., Hinrichsen R. 2003. Cyclin D in left ventricle hypertrophy. *Cell Cycle.* 2 : 91—95.
- Conte M., Bongioanni S., Dall'Orto G. 1998. Fixed subaortic stenosis associated with hypertrophic cardiomyopathy: report of a rare familial occurrence. *G. Ital. Cardiol.* 28 : 53—56.
- Davies M., McKenna W. 1995. Hypertrophic cardiomyopathy pathology and pathogenesis. *Histopathology.* 26 : 493—500.
- Devereux R., Alonso D., Lutas E., Gottlieb G., Campo E., Sachs I., Reichel N. 1986. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Amer. J. Cardiol.* 57 : 450—458.
- Diaz F., Gilar M., Sauri A., Bosh A., Luna A. 2006. Usefulness of DNA quantification in diagnosis of hypertrophic cardiomyopathies. A preliminary study. *Forensis Sci. Int.* 157 : 40—45.
- Emeriau J., Le Menn R., Besse P., Bricaud H. 1976. Ultrastructural study of 11 cases of obstructive myocardiology of the left ventricle. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 69 : 475—483.
- Factor S., Butany J., Sole M. 1991. Pathologic fibrosis and matrix connective tissue in the subaortic myocardium of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Amer. Cell Cardiol.* 17 : 1343—1351.
- Feizi O., Farrer Brown G., Emanuel R. 1978. Familial study of hypertrophic cardiomyopathy and congenital aortic valve disease. *Amer. J. Cardiol.* 41 : 956—964.
- Field L. 2004. Modulation of the cardiomyocyte cell cycle in genetically altered animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1015 : 160—170.
- Fujiwara H., Tanaka M., Onodera T., Kawai C. 1987. Hypertrophic cardiomyopathy: mode of death and pathological findings. *Cardiology.* 16 : 3—8.
- Garg V., Kathiriya I., Barne R., Schluterman M., King I., Butler C., Rothrock C., Eapen R., Hirayama-Yamada K., Joo K., Matsuoka R., Cohen J., Srivastava D. 2003. GATA4 mutation cause human congenital heart defects and reveal an interection with TBX5. *Nature.* 424 : 443—447.
- Harrison E., Sbar S., Martin H., Pupello D. 1977. Coexisting right and left hypertrophic subvalvular stenosis and fixed left ventricular outflow obstruction due to aortic valve stenosis. *Amer. J. Cardiol.* 40 : 133—136.
- Kanoh M., Takemura G., Misao J., Hayakawa Y., Aoyama T., Nishigaki K., Noda T., Fujiwara T., Fukuda T., Minatoguchi S., Fujiwara H. 1999. Significance of myocytes with positive DNA In Situ Nick End-Labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 99 : 2757—2764.
- Koda M., Takemura G., Kanoh M. 2003. Myocytes positive for in situ markers for DNA breaks in human hearts which are hypertrophic, but neither failed nor dilated: a manifestation of cardiac hypertrophy rather than failure. *J. Pathol.* 199 : 229—236.
- Marian A., Yu Q., Mann D., Graham F., Roberts R. 1995. Expression of a mutation causing hypertrophic cardiomyopathy disrupts sarcomere assembly in adult feline cardiac myocytes. *Circ. Res.* 77 : 98—106.
- Maron B. 2004. Hypertrophic cardiomyopathy in childhood. *Pediatr. Clin. North Amer.* 51 : 1305—1346.
- Maron B., Casey S., Hurrell D., Aeppli D. 2003. Relation of left ventricular thickness to age and gender in hypertrophic cardiomyopathy. *Amer. J. Cardiol.* 91 : 1195—1198.
- Maron B., Roberts W. 1981. Cardiomyopathies in the first two decades of life. *Cardiovasc. Clin.* 11 : 35—78.
- Maron B., Spirito P., Wesley Y., Arce J. 1986. Development and progression of left ventricular hypertrophy in children with hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 315 : 610—614.
- Martínez-Díaz F., Bernal-Gilar M., Gómez-Zapata M., Luna A. 2004. Expression and significance of cell immunohistochemical markers (HHF-35, CD-31, Bcl-2, P-53 and apopDETECT) in hypertrophic cardiomyopathy. *Histol. Histopathol.* 19 : 9—14.
- Matturri L., Biondo B., Colombo B., Lavezzi A., Rossi L. 1997. Significance of the DNA synthesis in hypertrophic cardiomyopathies. *Basic Res. Cardiol.* 92 : 85—89.
- Matturri L., Milei J., Grana D., Lavezzi A. 2002. Characterization of myocardial hypertrophy by DNA content, PCNA expression and apoptotic index. *Int. J. Cardiol.* 82 : 33—39.
- Nigro V., Okazaki Y., Belsito A. 1997. Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum. Mol. Genet.* 6 : 601—607.
- Poliac L., Barron M., Maron B. 2006. Hypertrophic cardiomyopathy. *Anesthesiology.* 104 : 183—192.
- Sandritter W., Alder P. 1978. Polyploidization of heart muscle nuclei as prerequisite for heart growth and numerical hyperplasia in heart hypertrophy. *Resent. Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.* 12 : 115—127.
- Sandritter W., Scomazzoni G. 1964. Deoxyribonucleic acid content (Feulgen photometry) and dry weight (interference microscopy) of normal and hypertrophic heart muscle fibers. *Nature.* 202 : 100—101.
- Soonpaa M., Field L. 1998. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res.* 83 : 15—26.
- Sutton M. G., Tajik A. J., Smith H. C., Ritman E. L. 1980. Angina in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. A clinical correlate of regional left ventricular dysfunction: a videometric and echocardiographic study. *Circulation.* 61 : 561—568.
- Tezuka F. 1975. Muscle fiber orientation in normal and hypertrophied hearts. *Tohoku J. Exp. Med.* 117 : 289—297.
- Urbanek K., Quaini F., Tasca G. 2003. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *PNAS.* 100 : 10 440—10 445.
- Varnava A., Elliott P., Sharma S., McKenna W., Davies M. 2000. Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease. *Heart.* 84 : 476—482.
- Wigle E. 2001. Cardiomyopathy: the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 86 : 709—714.
- Yabe Y., Abe H., Kashiwakura Y. 1983. DNA synttetic activity of right and left ventricular biopsy specimens in patients with cardiomyopathy. *Adv. Myocardiol.* 4 : 163—170.

CELL ASPECTS OF PATHOGENESIS OF HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY:  
THE ROLE OF CARDIOMYOCYTE POLYPLOIDY  
AND ACTIVATION OF THE PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN IN MYOCARDIUM

*E. V. Shlyakhto,<sup>1</sup> L. A. Bokeria,<sup>2</sup> M. G. Rybakova,<sup>1</sup> E. N. Semernin,<sup>1</sup> G. V. Selivanova,<sup>3</sup>  
T. D. Vlasova,<sup>3</sup> K. V. Borisov,<sup>2</sup> V. N. Parfenov,<sup>3</sup> A. Y. Gudkova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>G. F. Lange Chair of Faculty Therapy of I. P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg,  
<sup>2</sup>A. N. Bakulev Research Center of Cardiosurgery, Moscow,  
and <sup>3</sup>Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; <sup>1</sup>e-mail: alexgucl@spmi.rssi.ru

Mechanisms of hypertrophy development in hypertrophic obstructive cardiomyopathy (HOCM) have not been enough investigated. In our study, there have been examined patients with severe HOCM at different ages, including children, and patients with essential arterial hypertension (EAH). There was found, that HOCM in children compared to adults was characterized by considerable interventricular septum (IVS) hypertrophy and it was accompanied by the acceleration of cardiomyocyte polyploidy. The average ploidy level of cardiomyocytes in children with HOCM was higher than analogous indices in adults. The average ploidy level of nuclei, the part of PCNA-positive nuclei and polyploidic nuclei of cardiomyocytes in adults with HOCM were authentically higher than in patients with EAH. Activation of the nuclear antigen in stromal cells was detected only in patients with HOCM. Our findings provide evidence of an important role of cardiomyocyte polyploidy and activation of the proliferating cell nuclear antigen in development of the myocardial hypertrophy in patients with HOCM.

**Key words:** hypertrophic obstructive cardiomyopathy, polyploidy, cardiomyocytes, stromal cells.