

## СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ НЕ ИГРАЮТ СУЩЕСТВЕННОЙ РОЛИ В РЕПОПУЛЯЦИИ МИОЦИТОВ СЕРДЦА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА

© *Е. В. Байдюк*,<sup>1,\*</sup> *А. Я. Гудкова*,<sup>2</sup> *Г. А. Сакута*,<sup>1</sup> *Е. Н. Семернин*,<sup>2</sup>  
*А. В. Степанов*,<sup>1</sup> *Б. Н. Кудрявцев*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,*  
*и* <sup>2</sup> *С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова,*  
*Санкт-Петербург, 197022;*

\* *электронный адрес: katya bay@mail.ru*

В настоящее время существуют две точки зрения на способность сердца взрослого человека к регенерации. Одна из них предполагает, что миокард обладает слабой способностью к регенерации. Согласно другой, миокард способен обновляться с высокой скоростью за счет присутствия в нем резидентных стволовых клеток. Цель данной работы состояла в проверке этих гипотез путем исследования распределения кардиомиоцитов по размеру и плоидности у людей разного возраста. Используя цитофлуориметрию и интерферометрию, определяли сухую массу, объем и плоидность миоцитов, изолированных из левого желудочка нормального сердца 12 мужчин в возрасте 20—30 ( $n = 7$ ) и 40—50 ( $n = 5$ ) лет. Средняя сухая масса кардиомиоцитов у мужчин в возрасте 20—30 лет составила  $6906 \pm 182$  пг ( $10^{-12}$  г), а в возрасте 40—50 лет —  $9126 \pm 263$  пг; объемы миоцитов составили  $55\,250 \pm 1457$  и  $73\,005 \pm 2106$  мкм<sup>3</sup> соответственно. Клетки с объемами, промежуточными между клетками на стадии «делящихся миоцитов», и зрелыми миоцитами, отсутствовали. Число кардиомиоцитов в левом желудочке в возрастной группе 20—30 лет составило  $(3.18 \pm 0.05) \cdot 10^9$ , а в возрасте 40—50 лет —  $(2.06 \pm 0.6) \cdot 10^9$ . Большую часть популяции миоцитов составляли одноядерные клетки с тетраплоидными ядрами (41.3 %). Доля миоцитов различных классов плоидности и их средняя плоидность не изменялись в интервале 20—50 лет. На основании полученных данных сделан вывод о том, что стволовые клетки не играют заметной роли в восстановлении числа утраченных миоцитов. Гипертрофия миоцитов, обусловленная ростом их цитоплазмы, является основным механизмом компенсации функции левого желудочка сердца в ходе старения человека.

Ключевые слова: сердце человека, кардиомиоциты, плоидность, гипертрофия, старение, стволовые клетки.

Все млекопитающие стареют, хотя и с разной скоростью. Этот процесс, по-видимому, начинается с рождением и, ускоряясь по мере увеличения возраста, постепенно изменяет структуру и функцию различных органов, в том числе сердца (Scalia et al., 2010; Chan et al., 2011). Потеря кардиомиоцитов (КМЦ) рассматривается в качестве одного из главных показателей старения сердечно-сосудистой системы (Chaudhary et al., 2011). Полагают, что в миокарде человека в интервале от 20 до 90 лет путем апоптоза теряется 40—50 % КМЦ (Weisfeld, 1998).

Проблема восстановления популяции КМЦ, утраченных в ходе старения или в результате болезни, привлекает внимание многих исследователей (Sanyo et al., 2014; Polizzotti et al., 2015). В течение десятилетий КМЦ млекопитающих считались постмитотическими клетками, пролиферативная активность которых почти полностью теряется спустя короткое время после рождения (Румянцев, 1982). В результате они оказываются неспособными заменить клетки, утраченные в результате естественного изнашивания или в ходе адаптации сердца к стрессовым воздействиям. Бергман с соавторами (Bergmann et al., 2009), используя оригинальный метод изучения оборота

КМЦ в сердце взрослого человека, основанный на включении изотопа углерода <sup>14</sup>C в миокард людей во время ядерных испытаний, показали, что в возрасте 20 лет скорость обновления КМЦ в сердце человека составляет примерно 1 % в год, а в возрасте 75 лет — 0.3 %. Эти величины оборота КМЦ сравнимы со значениями, которые обычно получают при оценках пролиферативной активности миоцитов в левом желудочке (ЛЖ) сердца взрослых млекопитающих, например с помощью инъекций <sup>3</sup>H-тимидина (Soonpaa, Field, 1997; Romyantsev, 1981).

Очень слабая пролиферативная способность КМЦ взрослого сердца, особенно КМЦ желудочков, дала основание считать, что основным способом повышения функциональной активности миокарда или его регенерации в ответ на повреждение является внутриклеточная регенерация, связанная с увеличением числа органоидов и различных внутриклеточных структур (Саркисов, 1970; Ferrans, 1984). Морфологическим проявлением такой регенерации является гипертрофия мышечных клеток сердца, обусловленная в основном ростом их цитоплазмы.

В соответствии с другой точкой зрения (Anversa et al., 2006; Kajstura et al., 2010; Leri et al., 2011; Kajstura et al.,

2012; Anversa et al., 2013; Hayashi, Hosoda, 2015), сердце млекопитающих обладает высокой способностью к обновлению популяции КМЦ благодаря присутствию в нем компартмента резидентных стволовых клеток, ответственных за гомеостаз миокарда и его регенерацию. Согласно этой гипотезе, образование новых КМЦ в сердце млекопитающих не только не заканчивается в раннем постнатальном периоде, но даже ускоряется по мере увеличения их возраста (Kajstura et al., 2010, 2012). Предполагается, что, прежде чем стать зрелыми КМЦ, резидентные недифференцированные *c-kit*<sup>+</sup>-стволовые клетки должны пройти ряд стадий: *c-kit*<sup>+</sup>-стволовая клетка → недифференцированная клетка-предшественник → слабодифференцированная клетка-предшественник → делящийся КМЦ → зрелый КМЦ. Считается также, что делящиеся КМЦ являются относительно небольшими клетками, которые способны делиться митотически и содержат небольшое количество миофибрилл в цитоплазме. Позже, однако, они перестают делиться и

накапливают миофибриллы, постепенно увеличиваются в размере, превращаясь в зрелые, полностью сформированные КМЦ (Anversa et al., 2013).

В настоящей работе мы поставили перед собой задачу оценить вклад стволовых клеток в регенерацию сердца взрослого человека с помощью изучения распределения КМЦ в ЛЖ сердца по размеру и плоидности. Размер КМЦ определяли путем измерения сухой массы отдельных клеток, поскольку этот параметр в отличие от линейного размера, площади или объема клеток не зависит от условий, в которых производится пробоподготовка (Venke, 1966).

## Материал и методика

Миокард левого желудочка сердца человека. Исследования возрастных изменений миокарда ЛЖ сердца человека проведены на аутопсийном материале. Материал миокарда ЛЖ получен от 12 мужчин, погибших в возрасте от 20 до 50 лет в результате различных несчастных случаев (дорожно-транспортные, производственные или бытовые травмы, суицид и т. д.) через 12—24 ч после смерти. Какие-либо признаки патологии сердца у них отсутствовали.

Фиксация, приготовление срезов, окрашивание. Кусочки ЛЖ сердца человека фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и заливали в парафиновые блоки по стандартной методике (Роскин, 1957), из которых затем приготавливали срезы толщиной 6 мкм и окрашивали гематоксилин-эозином по Майеру. Для выявления соединительной ткани срезы окрашивали в течение 1 ч пикросирусом (0.01%-ный раствор сириуса красного F3BA (Bio-Optica Milano SPA, Италия)) в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты. После окраски препараты споласкивали в 30%-ной уксусной кислоте (2 мин), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в канадский бальзам (Junqueira et al., 1979).

Определение доли мышечной и соединительной тканей в миокарде ЛЖ сердца. Анализ гистологических срезов ЛЖ, окрашенных пикросирусом, производили с помощью анализатора изображений Video-Test (Штейн и др., 1998), используя объектив 10×0.30 и интерференционный светофильтр ( $\lambda_{\max} = 550$  нм). Долю соединительной ткани в ЛЖ рассчитывали по формуле:

$$Q_{ст} = S_{ст} / (S_{п.з.} - S_{р.}),$$

где  $Q_{ст}$  — доля соединительной ткани от площади среза, %;  $S_{п.з.}$  — площадь поля зрения микроскопа ( $\text{мкм}^2$ );  $S_{ст}$  — площадь соединительной ткани,  $\text{мкм}^2$ ;  $S_{р.}$  — площадь просветов сосудов, разрывов ткани,  $\text{мкм}^2$ . Долю мышечной ткани определяли по формуле

$$Q_{мт} = 100 - Q_{ст},$$

где  $Q_{мт}$  — доля мышечной ткани от площади среза, %;  $Q_{ст}$  — доля соединительной ткани от площади среза, %. Для каждого человека анализировали 20—30 полей зрения.

Изоляция кардиомиоцитов, окрашивание мазков и определение содержания ДНК в клетках. Для приготовления мазков изолированных КМЦ на предметных стеклах (рис. 1, а) использовали ме-

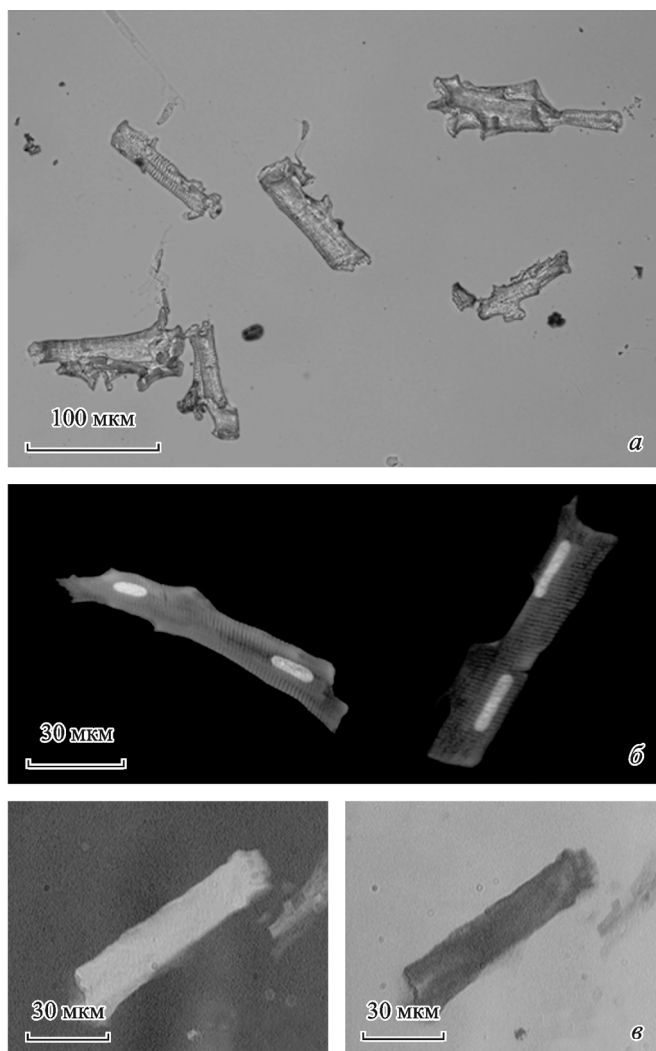


Рис. 1. Кардиомиоциты (КМЦ), изолированные из левого желудочка сердца с помощью метода щелочной диссоциации ткани.

а — общий вид (фазовый контраст); б — КМЦ, окрашенные по Фельгену на ДНК с использованием реактива типа Шиффа аурамина- $\text{SO}_2$ ; в — неокрашенные КМЦ: слева — установка поля на темноту, справа — установка объекта на темноту. Измерение сухой массы клеток с помощью интерференционного микроскопа.

тодику щелочной диссоциации ткани (Белов и др., 1975). ДНК в ядрах КМЦ выявляли на препаратах-мазках с помощью реакции Фельгена (флуоресцентный вариант), в которой использовали реактив типа Шиффа — аурамин-SO<sub>2</sub> (рис. 1, б) (Kasten, 1961; Розанов, Кудрявцев, 1967). Цитофлуориметрию ДНК в ядрах одноядерных и двуядерных КМЦ производили с помощью импульсного микрофлуориметра (Кудрявцев и др., 1979). На каждом препарате измеряли около 200 КМЦ. При определении уровней плоидности КМЦ в качестве диплоидного стандарта использовали ядра фибробластов, находящиеся на препаратах с КМЦ. Среднюю плоидность КМЦ, N(c), рассчитывали по формуле

$$N(c) = \sum n_i \cdot 2^i,$$

где n<sub>i</sub> — относительное число клеток i-того класса плоидности (i = 1 — диплоидный класс, i = 2 — тетраплоидный и т. д.).

Определение сухой массы и объема КМЦ. Сухую массу КМЦ измеряли на неокрашенных, фиксированных метанолом препаратах-мазках, заключенных в глицерин, с помощью интерференционного микроскопа МБИН-4 (ЛОМО, Санкт-Петербург) в монохроматическом свете, используя интерференционный светофильтр (λ<sub>max</sub> = 550 нм) и объектив 10×0.30 (рис. 1, в). Сухую массу клеток рассчитывали по формуле

$$M = \delta S / 100\alpha,$$

где M — сухая масса клетки, пг (10<sup>-12</sup> г); δ — оптическая разность хода лучей, см; S — площадь клетки, см<sup>2</sup>; α — удельное приращение показателя преломления, см<sup>3</sup>/г (Beneke 1966). Оптическую разность хода определяли методом установки на темноту по формуле

$$\delta = (\phi_1 - \phi_2) / K \cdot \lambda,$$

где δ — разность хода лучей, см; φ<sub>1</sub>, φ<sub>2</sub> — отсчеты по шкале компенсатора Сенармона, градусы; λ — длина волны света, см; K = 180°.

Площадь клетки измеряли с помощью анализатора изображений. Удельное приращение показателя преломления для белков в глицерине составляет 0.00095 см<sup>3</sup>/г (Pellegrino et al., 1963). Для каждого человека измеряли не менее 100 КМЦ. Объемы КМЦ рассчитывали при использовании значения концентрации сухой массы для нормального мышечного волокна, равного 0.125 г/см<sup>3</sup> (Sandritter, Scomazzoni, 1964).

Определение количества кардиомиоцитов в ЛЖ сердца человека. Число КМЦ в миокарде ЛЖ сердца человека определяли по формуле

$$N = P \cdot R \cdot f / M,$$

где N — количество КМЦ в ЛЖ; P — сырая масса ЛЖ сердца, г; R — доля мышечной ткани в миокарде ЛЖ (R = 1 - Q); Q — доля соединительной ткани; f — коэффициент перехода от сырой массы миокарда к сухой, составляющий, по нашим данным, 0.273; M — средняя сухая масса одного КМЦ в ЛЖ сердца, г.

Статистика. Данные, проанализированные с помощью SigmaPlot 9.0 для ОС Windows, представлены средними значениями с ошибкой (Systat Software Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Различия между средними значениями определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

## Результаты

Масса ЛЖ сердца, доля мышечной и соединительной тканей в ЛЖ человека разного возраста. Масса ЛЖ сердца (без межжелудочковой перегородки) у исследованных мужчин составила в среднем 86.4 ± 2.2 г. В возрастной группе 20—30 лет (n = 7) масса ЛЖ была на 13.2 % больше (p < 0.01), чем в группе 40—50 лет (n = 5). Доля паренхимы и доля соединительной ткани в ЛЖ сердца человека в возрастном интервале 20—50 лет не изменялись и составляли 87.5 ± 0.9 и 12.5 ± 0.9 % соответственно.

Сухая масса, объем и число миоцитов в ЛЖ сердца человека разного возраста. У мужчин в возрасте 20—30 лет сухая масса одного КМЦ составила в среднем 6906.0 ± 182.1 пг, а в возрасте 40—50 лет — 9125.6 ± 263.3 пг, т. е. с возрастом сухая масса КМЦ увеличилась на 32.1 % (p < 0.001). Объемы КМЦ в этих группах мужчин составили 55 250 ± 1457 и 73 005 ±

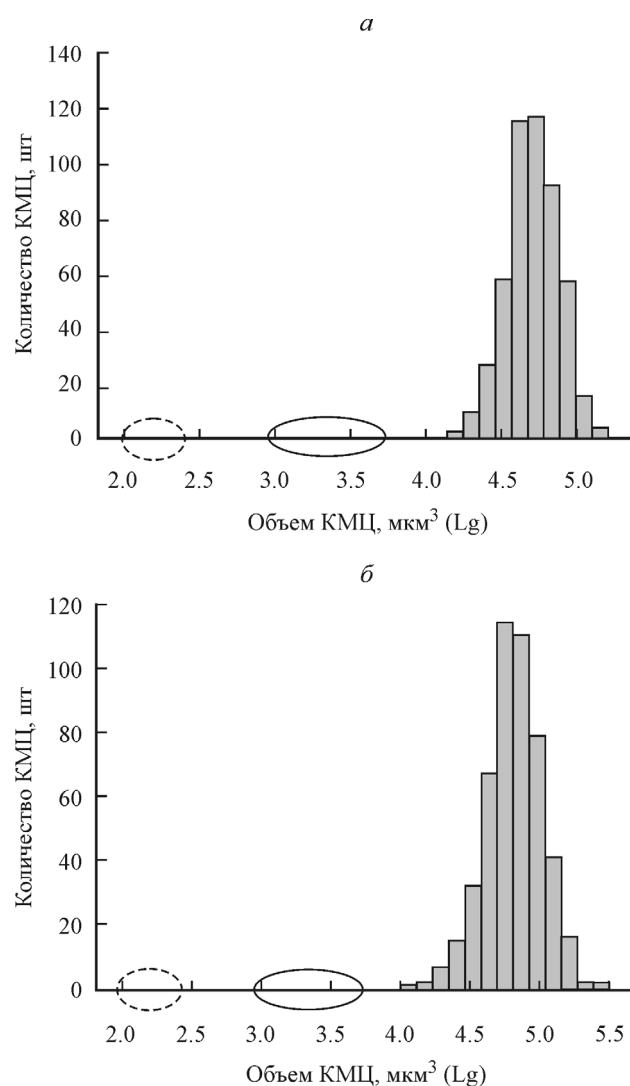


Рис. 2. Гистограммы распределения кардиомиоцитов (КМЦ) человека по объему в возрасте 20—30 (а) и 40—50 (б) лет.

Штриховой линией показан предполагаемый объем c-kit<sup>+</sup>-резидентных стволовых клеток сердца (110—220 мкм<sup>3</sup>; по: Ferreira-Martins et al., 2012); сплошной линией показана область «делящихся КМЦ» с предполагаемым объемом 1000—5000 мкм<sup>3</sup>; по: Anversa et al., 2006; Bergmann et al., 2012.



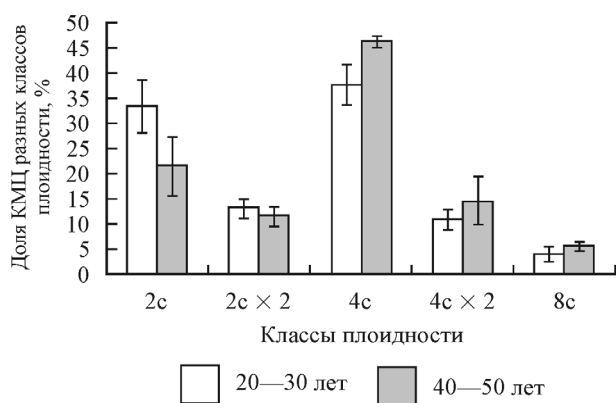


Рис. 3. Распределение кардиомиоцитов по классам плоидности у мужчин в возрасте 20—30 лет (светлые столбики) и в возрасте 40—50 лет (темные столбики).

Все величины выражены как среднее значение и его ошибка.

2106 мкм<sup>3</sup> соответственно. Распределения КМЦ по размеру в обеих возрастных группах были близки к нормальному распределению. Левосторонняя асимметрия гистограмм распределения КМЦ по размерам отсутствовала (рис. 2). Число миоцитов в ЛЖ сердца мужчин в возрастном интервале 20—50 лет уменьшалось на 35.2 % ( $p < 0.001$ ), в возрастной группе 20—30 лет оно составило  $(3.18 \pm 0.05) \cdot 10^9$ , а в группе 40—50 лет —  $(2.06 \pm 0.6) \cdot 10^9$  клеток.

Уровни плоидности одноядерных и двуядерных миоцитов в ЛЖ сердца взрослого человека разного возраста. Результаты цитофотометрического определения содержания ДНК в ядрах миоцитов, окрашенных по Фельгену, показали, что одноядерные тетраплоидные (4c) клетки составляют большинство КМЦ в ЛЖ сердца человека (рис. 3). Доля этих клеток составила в среднем 41.3 % (индивидуальные колебания — от 22.0 до 57.3 %). Доля одноядерных диплоидных (2c) миоцитов составила 28.4 % (индивидуальные колебания от 6.9 до 54.1 %). Одноядерные октаплоидные (8c) миоциты в ЛЖ сердца человека гораздо более редки, чем 2c- и 4c-миоциты. Относительное количество 8c-миоцитов составило в среднем 4.7 % (индивидуальные колебания — от 0.6 до 12.2 %). Одноядерные 16c-КМЦ встречались не у всех исследованных людей, и их относительное количество никогда не превышало 1 %. Доля двуядерных миоцитов в ЛЖ сердца человека составила в среднем 25.6 % (индивидуальные колебания от 8.3 до 43.8 %). При этом двуядерные миоциты 2c×2 и 4c×2 встречались с примерно равной частотой (около 12.5 %). Доля миоцитов с двумя октаплоидными ядрами (8c×2) в ЛЖ сердца составила в среднем 0.5 % (индивидуальные колебания — от 0 до 3.4 %). Доля 2c-, 4c-, 8c- и 16c-ядер миоцитов в ЛЖ сердца взрослых мужчин в среднем составляла  $43.1 \pm 4.2$ ,  $52.2 \pm 3.6$ ,  $4.6 \pm 1.1$  и  $0.03 \pm 0.03$  % соответственно.

Относительные количества КМЦ в соответствующих классах плоидности клеток у мужчин в возрасте 20—30 и 40—50 лет не различались. Среднее число геномов в миоцитах в возрастном интервале 20—50 лет также не изменялось ( $p < 0.05$ ). В возрастной группе 20—30 лет средняя плоидность КМЦ составила  $4.0 \pm 0.2$  c, а в группе 40—50 лет —  $4.4 \pm 0.3$  c.

## Обсуждение

Результаты нашей работы показали, что масса ЛЖ сердца мужчин уменьшается с возрастом. Схожие данные, свидетельствующие о том, что масса ЛЖ сердца мужчин снижается в ходе старения, были получены ранее (Olivetti et al., 1991, 1995, 2000). В цитируемых работах было также показано, что при увеличении возраста у мужчин наблюдается уменьшение числа миоцитов, которое сопровождается увеличением их объема. В нашей работе было найдено, что в возрастном интервале 20—50 лет число миоцитов в ЛЖ сердца мужчин уменьшается на 35.2 %, а сухая масса и объем каждого миоцита увеличиваются в среднем на 32.1 %. Таким образом, в ходе старения гипертрофия КМЦ почти полностью компенсирует их потерю.

Во многих работах с помощью абсорбционной цитометрии ядер и клеток, окрашенных по Фельгену, было показано, что полиплоидия является характерной чертой сердца взрослого человека и животных (Brodsky, Uryvaeva, 1985; Adler, Friedburg, 1986; Adler, 1991; Brodsky, 1991; Brodsky et al., 1991; Кудрявцев и др., 1997; Шляхто и др., 2007). При этом в отличие от других млекопитающих особенностью популяции миоцитов ЛЖ сердца человека является присутствие в ней большого числа одноядерных клеток (Brodsky, 1991). По нашим данным, доля последних у некоторых людей может превышать 90 %. Доля двуядерных (2c×2, 4c×2 и 8c×2) миоцитов в ЛЖ сердца человека составила в сумме 25.6 %, что соответствует данным других авторов (Olivetti et al., 1996; Anversa et al., 2007). При этом в отличие от ранее полученных данных (Brodsky, 1991; Brodsky et al., 1991) мы не обнаружили превышения количества 4c×2-миоцитов над остальными классами двуядерных клеток. Миоциты 2c×2 и 4c×2 встречались с примерно равной частотой (рис. 3).

Недавно с помощью проточной цитометрии ядер было показано, что подавляющее большинство ядер КМЦ в сердце человека являются диплоидными. Доля ди-, тетра- и октаплоидных ядер миоцитов в ЛЖ сердца составила 83, 14 и 3 % соответственно (Kajstura et al., 2010, 2012). Однако эти результаты противоречат фактически всем данным, известным в настоящее время. Критикуя своих оппонентов, авторы утверждают, что метод цитометрии с использованием окрашивания клеток по Фельгену слишком неточен для оценки плоидности ядер из-за высокой чувствительности хроматина к гидролизу и различным условиям во время проведения этой реакции (Kajstura et al., 2012).

Все недостатки цитометрии препаратов, окрашенных по Фельгену, о которых говорят авторы, имеют значение только при оценке размера генома. В этом случае проточная цитометрия, позволяющая оценить размер генома у различных видов животных с точностью менее чем 1 %, является наилучшим методом (Розанов, Виноградов, 1998). Однако чувствительность хроматина к различным условиям проведения реакции Фельгена при оценке плоидности ядер не имеет значения. Для надежной оценки плоидности достаточно, чтобы коэффициент вариации при измерении содержания ДНК в ядрах или клетках не превышал 7—8 %, а современные цитометры позволяют измерить содержание ДНК в ядрах клеток с еще большей точностью.

Главным преимуществом цитометрии ДНК в клетках, окрашенных по Фельгену, по сравнению с про-

точной цитометрией является возможность наблюдать измеряемый объект, что позволяет определить степень ploидности каждого ядра в двуядерных (или многоядерных) клетках. Более того, в настоящее время с помощью проточной цитометрии технически невозможно анализировать содержание ДНК в столь крупных клетках, как КМЦ млекопитающих, длина которых, например у человека, может превышать 100 мкм, а ширина достигает 15—20 мкм (Legato, 1973). В связи с этим авторам, применяющим проточную цитометрию, приходится использовать не целые КМЦ, а их ядра.

Миоциты в сердце человека и животных составляют лишь около 25 % клеточной популяции миокарда (Шляхто и др., 2007). Поэтому в суспензии ядер, изолированных из миокарда, помимо диплоидных ядер КМЦ присутствует значительно большее количество диплоидных ядер, не принадлежащих миоцитам. Вследствие этого даже при использовании иммуномечения ядер КМЦ специфическими антителами (например, к тропонину I) очень трудно отличить ядра КМЦ от ядер других клеток (Bergmann et al., 2011, 2012). Учитывая вышесказанное, можно предположить, что обнаруженная высокая доля диплоидных ядер КМЦ в сердце человека (Kajstura et al., 2010, 2012) может быть обусловлена значительным загрязнением взвеси ядер КМЦ диплоидными ядрами клеток других типов.

В отличие от данных проточной цитометрии модальным классом ploидности КМЦ у исследованных нами мужчин являлись одноядерные 4с-клетки, доля которых составляла в среднем 41.3 %. Доля одноядерных 2с-миоцитов в ЛЖ сердца исследованных нами мужчин составила лишь 28.4 %. Даже при пересчете наших данных с клеточной ploидности на ядерную ploидность доля миоцитов с 4с-ядрами (52.2 %) в ЛЖ сердца человека заметно превышала долю 2с-ядер (43.1 %).

Многие исследователи отмечали значительную вариабельность числа геномов в миоцитах человека. По разным данным, ploидность КМЦ в ЛЖ нормального сердца человека может варьировать от 4с до 10с, составляя в среднем  $6.2 \pm 0.5с$  (Brodsky et al., 1991). Однако мы не обнаружили столь высокой ploидности у миоцитов человека. Средняя ploидность миоцитов в ЛЖ сердца у исследованных нами мужчин составила  $4.2 \pm 0.2с$  ( $3.2с$ — $5.3с$ ) и лишь немного превышала среднюю ploидность миоцитов ЛЖ сердца у большинства других млекопитающих, в частности крысы и мыши (Кудрявцев и др., 1997).

Известно, что полиploидия в сердце и печени необратима. Полиploидные КМЦ в миокарде, как и гепатоциты в печени, образуются в результате прохождения неполного клеточного цикла (Brodsky, Uryvaeva, 1985; Кудрявцев и др., 1997). Степень ploидности клеток при прохождении каждого следующего клеточного цикла может только увеличиваться, приводя к накоплению в популяции клеток высоких классов ploидности. Таким образом, анализ динамики относительного числа КМЦ различных классов ploидности, например в ходе старения, дает возможность оценить уровень ДНК-синтетических процессов даже в очень медленно пролиферирующих клеточных популяциях (Stein, Kudryavtsev, 1992; Kudryavtsev et al., 1993), к которым относится и популяция миоцитов в ЛЖ сердца млекопитающих.

Отсутствие изменений в распределении КМЦ ЛЖ сердца по классам ploидности (рис. 3) и стабильность уровней их средней ploидности при увеличении возраста человека позволяют заключить, что синтез ДНК в попу-

ляции дифференцированных функционирующих КМЦ отсутствует или находится на очень низком уровне. Этот вывод подтверждается чрезвычайной редкостью первичных опухолей миокарда, частота которых колеблется от 0.001 до 0.2 % (Butany et al., 2005; Leja et al., 2011). Кроме того, представляется маловероятным, чтобы столь крупные клетки, как КМЦ взрослого человека, средний объем которых составляет  $50\,564 \pm 7398$  мкм<sup>3</sup> (Mollova et al., 2013), а по нашим данным, еще больше —  $55\,250 \pm 1457$  (20—30 лет) и  $73\,005 \pm 2106$  (40—50 лет) мкм<sup>3</sup>, могли бы вступать в клеточный цикл (Anversa et al., 2006; Kajstura et al., 2010; Leri et al., 2011). При этом надо иметь в виду, что перед делением клетки должны удвоить свою массу и объем. Кроме того, эти клетки столь плотно наполнены миофибриллами, что в них очень трудно разместить митотический аппарат (Rumyantsev, 1981).

Недавно была выдвинута гипотеза, предполагающая высокую способность сердца взрослого человека к физиологической регенерации (Anversa et al., 2006; Kajstura et al., 2010, 2012). Гипотеза основана на допущении высокой скорости оборота клеток в миокарде взрослого человека в ходе его старения, в результате которого вся популяция миоцитов в сердце в течение жизни может полностью обновляться много раз. Согласно гипотезе, высокая скорость оборота КМЦ достигается за счет непрерывной замены изношенных старых КМЦ новыми, которые образуются из резидентных стволовых клеток сердца в следующем ряду поколений: с-kit<sup>+</sup>-стволовая клетка → прогениторная клетка → клетка-предшественник → амплифицирующийся КМЦ, способный к митотическому делению и содержащий в цитоплазме небольшое количество миофибрилл → зрелый, полностью сформированный КМЦ (Anversa et al., 2013). Если бы гипотеза авторов была верна, то на гистограммах распределения КМЦ по размерам (рис. 2, а, б) от стадии амплифицирующихся КМЦ, содержащих малое количество миофибриллярных белков, до зрелых КМЦ, цитоплазма которых содержит огромное количество этих белков, присутствовал бы непрерывный ряд размеров клеток. Однако по данным нашей работы (рис. 3), клетки с промежуточными размерами между амплифицирующимися КМЦ, объем которых предположительно составляет 1000—5000 мкм<sup>3</sup> (Anversa et al., 2006), и зрелыми миоцитами ЛЖ сердца взрослого человека, средний объем которых, по нашим данным, составлял в возрасте 20—30 лет  $55\,250$  мкм<sup>3</sup> (6906 пг), а в возрасте 40—50 лет —  $73\,005$  мкм<sup>3</sup> (9125 пг), отсутствовали. Кроме того, гистограммы должны были бы иметь выраженную левостороннюю асимметрию, которая отражала бы медленное и постепенное накопление миофибрилл в цитоплазме молодых КМЦ, после того как они прекратили делиться. Однако этого также не наблюдается.

Гипотеза о высокой скорости оборота КМЦ в сердце взрослого человека предполагает высокую скорость поступления в миокард новых миоцитов из пула с-kit<sup>+</sup>-резидентных стволовых клеток сердца. Полагают, что эта скорость возрастает по мере увеличения возраста человека и достигает  $3 \cdot 10^6$  кл./сут (Anversa et al., 2006; Kajstura et al., 2010). В ходе формирования зрелых КМЦ из недифференцированных диплоидных стволовых с-kit<sup>+</sup>-клеток последние должны стать одноядерными или двуядерными миоцитами с ядрами различной ploидности в определенном соотношении. Известно, что распределение клеток по классам ploидности в различных органах, в том числе в сердце, легко изменяется под влиянием различных факторов внешней и внутренней среды (Brodsky,

Угуваева, 1985; Brodsky et al., 1985, 1988). Между тем, несмотря на различия условий, в которых происходит полиплоидизация миоцитов у молодых людей и лиц среднего возраста (Scalia et al., 2010; Chan, Veinot, 2011), распределение КМЦ по классам плоидности и средний уровень их плоидности в возрастном интервале 20—50 лет остаются неизменными (рис. 2). Стабильность относительно числа одноядерных и двухядерных миоцитов в сердце взрослого человека после 20 лет отмечалась и другими авторами (Olivetti et al., 1996; Шляхто и др., 2007). Если бы стволовые клетки участвовали в репопуляции миоцитов сердца, то в группе лиц старшего возраста по сравнению с молодыми взрослыми наблюдался бы сдвиг распределения КМЦ по классам плоидности. Поскольку этого не происходит, можно заключить, что стволовые клетки сердца не участвуют в репопуляции миокарда взрослого человека.

Таким образом, данные, полученные нами, не подтверждают точку зрения о ведущей роли стволовых клеток в регенерации миокарда млекопитающих. К аналогичному заключению пришли и другие авторы (Байдюк и др., 2013; Senyo et al., 2013; Walsh et al., 2014). Кроме того, наши данные позволяют заключить, что в случае потери КМЦ в ходе старения сердца гипертрофия оставшихся миоцитов, обусловленная ростом их цитоплазмы (накоплением миофибрилл), служит основным механизмом компенсации функции этого органа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00730).

### Список литературы

- Байдюк Е. В., Штейн Г. И., Степанов А. В., Кудрявцев Б. Н. 2013. О роли стволовых клеток сердца в физиологической и репаративной регенерации миокарда человека. Терапевтический вестник Узбекистана. 4 : 45—46. (Baidyuk E. V., Stein G. I., Stepanov A. V., Kudryavtsev B. N. 2013. About the role of stem cells of the heart under physiological and reparative regeneration of human myocardium. Therapeutic Bulletin of Uzbekistan. 4 : 45—46.)
- Белов Л. Н., Коган М. Е., Леонтьева Т. А., Костырев О. А., Целлариус Ю. Г. 1975. Получение изолированных клеток методом щелочной диссоциации из тканей, фиксированных формальдегидом. Цитология. 17 : 1332—1338. (Belov L. N., Kogan M. E., Leontjeva T. A., Kostyrev O. A., Cellarius Yu. G. 1975. Preparation of isolated cells by alkaline dissociation of formaldehyde fixed tissues. Tsitologiya. 17 : 1332—1338.)
- Кудрявцев Б. Н., Анацкая О. В., Нилова В. К., Комаров С. А. 1997. Взаимосвязь параметров митохондриального и миофибрилярного аппаратов кардиомиоцитов с уровнем их плоидности и гипертрофии у некоторых видов млекопитающих, различающихся по массе тела. Цитология. 39 (10) : 946—964. (Kudryavtsev B. N., Anatskaya O. V., Nilova V. K., Komarov S. A. 1997. Interrelation between cardiomyocyte myofibrillar and mitochondrial apparatus and cardiomyocyte polyploidy and hypertrophy in mammals with different body weight. Tsitologiya. 39 (10) : 946—964.)
- Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Шалахметова Т. М., Завадская Е. Э., Иоффе В. А., Папаян Г. В., Барский И. Я. 1979. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена в гепатоцитах различной плоидности у взрослых крыс. Цитология. 21 (2) : 218—221. (Kudryavtsev B. N., Kudryavtseva M. V., Shalakhmetova T. M., Zavadskaya E. E., Ioffe V. A., Papayan G. V., Barsky I. Ya. 1979. Cytofluorometric determination of glycogen content in the rat liver cells of different ploidy. Tsitologiya. 21 (2) : 218—221.)
- Розанов Ю. М., Виноградов А. Е. 1998. Прецизионная ДНК-цитометрия: исследование индивидуальной вариабельности размера генома животных. Цитология. 40 (8/9) : 792—800. (Rozaanov Yu. M., Vinogradov A. E. 1998. Precise DNA cytometry: investigation of individual variability in animal genome size. Tsitologiya. 40 (8/9) : 792—800.)
- Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н. 1967. Метод флуоресцентной цитофотометрии для количественного определения ДНК. Цитология. 93 (3) : 361—368. (Rozaanov Yu. M., Kudryavtsev B. N. 1967. A method of fluorescent cytophotometry for the purposes of a quantitative determination of DNA. Tsitologiya. 93 (3) : 361—368.)
- Роскин Г. И. 1957. Микроскопическая техника. М.: Советская наука. 467 с. (Roskin G. I. 1957. Microscopic techniques. Moscow: Sovetskaya Nauka. 467 p.)
- Румянцев П. П. 1982. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука. 288 с. (Rumyantsev P. P. 1982. Cardiomyocytes in the processes of reproduction, differentiation and regeneration. Leningrad: Nauka. 288 p.)
- Саркисов Д. С. 1970. Регенерация и ее клиническое значение. М.: Медицина. 283 с. (Sarkisov D. S. 1970. Regeneration and its clinical significance. M.: Medicine. 283 p.)
- Шляхто Е. В., Бокерия Л. А., Рыбакова М. Г., Семернин Е. Н., Селиванова Г. В., Власова Т. Д., Борисов К. В., Парфенов В. Н., Гудкова А. Я. 2007. Клеточные аспекты патогенеза гипертрофической кардиомиопатии: роль полиплоидии кардиомиоцитов и активации в миокарде ядерного антигена пролиферирующей клетки. Цитология. 49 (10) : 817—823. (Shlyakhto E. V., Bokeria L. A., Rybakova M. G., Semernin E. N., Selivanova G. V., Vlasova T. D., Borisov K. V., Parfenov V. N., Gudkova A. Ya. 2007. Cell aspects of pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy: the role of cardiomyocyte polyploidy and activation of the proliferating cell nuclear antigen in myocardium. Tsitologiya. 49 (10) : 817—823.)
- Штейн Г. И., Пантелеев В. Г., Поваркова А. В., Кудрявцев Б. Н. 1998. Возможности анализатора изображений «ВидеоТест» для проведения микрофотометрических исследований в цитологии. Цитология. 40 (10) : 913—916. (Stein G. I., Panteleev V. G., Povarkova A. V., Kudryavtsev B. N. 1998. Capacities of image analyzer «Videotest» for microphotometric investigations in cytology. Tsitologiya. 40 (10) : 913—916.)
- Adler C. P. 1991. Polyploidization and augmentation of heart muscle cells during normal cardiac growth and in cardiac hypertrophy. In: The development and regenerative potential of cardiac muscle. New York: Harwood Acad. Publ. 227—251.
- Adler C. P., 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.
- Anversa P., Kajstura J., Leri A., Bolli R. 2006. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. Circulation. 113 : 1451—1463.
- Anversa P., Kajstura J., Rota M., Leri A. 2013. Regenerating new heart with stem cells. J. Clin. Invest. 123 : 62—70.
- Anversa P., Leri A., Rota M., Hosoda T., Beazzi C., Urbanek K., Kajstura J., Bolli R. 2007. Concise review: stem cells, myocardial regeneration and methodological artifacts. Stem Cells. 25 : 589—601.
- Beneke G. 1966. Application of interference microscopy to biological material. In: Wied G. L. (ed.). Introduction to quantitative cytochemistry. New York: Acad. Press. 63—92.
- Bergmann O., Bhardwaj R. D., Bernard S., Zdunek S., Barnabe-Heider F., Walsh S., Zupicich J., Alkass K., Buhholz B. A., Druid H., Jovinge S., Frisen J. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science. 324 : 98—102.
- Bergmann O., Zdunek S., Alkass K., Druid H., Bernard S., Frisen J. 2011. Identification of cardiomyocyte nuclei and assessment of ploidy for the analysis of cell turnover. Exp. Cell Res. 317 : 188—194.
- Bergmann O., Zdunek S., Frisen J., Bernard S., Druid H., Jovinge S. 2012. Cardiomyocyte renewal in humans. Circ. Res. 110 : 17—18.



- Brodsky V. Ya.* 1991. Cell polyploidy in the mammalian heart. In: The development and regenerative potential of cardiac muscle. New York: Harwood Acad. Publ. 253—293.
- Brodsky V. Ya., Carlson B. M., Arefieva A. M., Vacilieva I. A.* 1988. Polyploidization of transplanted cardiac myocytes. *Cell Differ Develop.* 25 : 177—183.
- Brodsky V. Ya., Chernyaev A. L., Vasilyeva I. A.* 1991. Variability of the cardiomyocyte ploidy in normal human hearts. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 61 : 289—294.
- Brodsky V. Ya., Delone G. V., Tsirekidze N. N.* 1985. Genome multiplication in cardiomyocytes of fast- and slow-growing mice. *Cell Differentiation.* 17 : 175—181.
- Brodsky V. Ya., Uryvaeva I. V.* 1985. Genome multiplication in growth and development. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 305 p.
- Butany J., Nair V., Naseemuddin A., Nair G. M., Catton C., Yau T.* 2005. Cardiac tumours: diagnosis and management. *Lancet Oncol.* 6 : 219—228.
- Chan K.-L., Veinot J. P.* 2011. Age-related cardiac changes. In: Anatomical basis of echocardiographic diagnosis. London Ltd.: Springer-Verlag. 27—37.
- Chaudhary K. R., El-Sikhry H., Seubert J. M.* 2011. Mitochondria and the aging heart. *J. Geriatr. Cardiol.* 8 : 159—167.
- Ferrans V. J.* 1984. Cardiac hypertrophy. In: Growth of the heart in health and disease. New York: Raven Press. 187—239.
- Ferreira-Martins J., Ogorek B., Cappetta D., Matsuda A., Signore S., D'Amario D., Kostyla J., Steadman E., Ide-Iwata N., Sanada F., Iaffaldano G., Ottolenghi S., Hosoda T., Leri A., Kajstura J., Anversa P., Rota M.* 2012. Cardiomyogenesis in the developing heart is regulated by c-kit-positive cardiac stem cells. *Circ. Res.* 110 : 701—715.
- Hayashi E., Hosoda T.* 2015. How do resident stem cells repair the damaged myocardium? *World J. Stem Cells.* 7 : 182—185.
- Junqueira L. C. U., Bignolas G., Brentan R. R.* 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 11 : 447—455.
- Kajstura J., Gurusamy N., Ogorek B., Goichberg P., Clavero-Rondon C., Hosoda T., D'Amario D., Bardelli S., Beltrami A. P., Cesselli D., Bussani R., del Monte F., Quaini F., Rota M., Beltrami C. A., Buhholz B. A., Leri A., Anversa P.* 2010. Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ. Res.* 107 : 1374—1386.
- Kajstura J., Rota M., Cappetta D., Ogorek B., Arranto C., Bai Y., Ferreira-Martins J., Signore S., Sanada F., Matsuda A., Kostyla J., Caballero M.-V., Fiorini K., D'Alessandro D. A., Michler R. E., del Monte F., Hosoda T., Perrella M. A., Leri A., Buhholz B. A., Loscalzo B. A., Anversa P.* 2012. Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. *Circulation.* 126 : 1869—1881.
- Kasten F. H.* 1961. Auramine O-SO<sub>2</sub> a highly fluorescent Schiff-type reagent for DNA in the Feulgen reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 9 : 599.
- Kudryavtsev B. N., Kudryavtseva M. V., Sakuta G. A., Steinhilber G. I.* 1993. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 64 : 387—393.
- Legato M. J.* 1973. Ultrastructure of the atrial, ventricular and Purkinje cells with special reference to the genesis of arrhythmias. *Circulation.* 47 : 178—189.
- Leja M. J., Dipan J. S., Reardon M. J., Yeh E. T. H.* 2011. Primary cardiac tumors. *Tex. Heart Inst. J.* 38 : 261—262.
- Leri A., Kajstura J., Anversa P.* 2011. Mechanisms of myocardial regeneration. *Trends Cardiovasc. Med.* 21 : 52—58.
- Mollova M., Bersell K., Walsh S., Savla J., Das L. T., Park Sh.-T., Silberstein L. E., dos Remedios C. G., Graham D., Colan S., Kuhn B.* 2013. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 110 : 1446—1451.
- Olivetti G., Cigola E., Maestri R., Corradi D., Lagrasta C., Gambert S. R., Anversa P.* 1996. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28 : 1463—1477.
- Olivetti G., Cigola E., Maestri R., Lagrasta C., Corradi D., Quaini F.* 2000. Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Res.* 45 : 68—75.
- Olivetti G., Giordano G., Corradi D., Melissari M., Lagrasta C., Gambert S. R., Anversa P.* 1995. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 26 : 1068—1079.
- Olivetti G., Melissari M., Capasso J. M., Anversa P.* 1991. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ. Res.* 68 : 1560—1568.
- Pellegrino C., Ricci P., Tongiani K.* 1963. A quantitative cytochemical and physiological study of the rat adrenal cortex in hypertrophy after unilateral adrenalectomy. *Exp. Cell Res.* 31 : 167—182.
- Polizzotti B. D., Ganapathy B., Walsh S., Choudhury S., Amanamanchi N., Bennett D. G., dos Remedios C. G., Haubner B. J., Penninger J. M., Kuhn B.* 2015. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. *Sci. Translat. Med.* 7 : 281ra45.
- Rumyantsev P. P.* 1981. New comparative aspects of myocardial regeneration with special reference to cardiomyocyte proliferative behavior. In: Mechanisms of cell growth. Thomas C. C., Springfield, IL. 311—342.
- 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.
- Scalia G. M., Khoo S. K., O'Neill S.* 2010. Age-related changes in heart function by serial echocardiography in women aged 40—80 years. *J. Womens Health (Larchmt).* 19 : 1741—1745.
- Senyo S. E., Lee R. T., Kuhn B.* 2014. Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Stem Cell Res.* 13 : 532—541.
- Senyo S. E., Steinhauser M. L., Pizzimenti C. L., Yang V. K., Cai L., Wang M., Wu T.-D., Guerin-Kern J.-L., Lechene C. P., Lee R. T.* 2013. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature.* 493 : 433—436.
- Soonpaa M. H., Field L. J.* 1997. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Amer. J. Physiol.* 272 : 220—226.
- Stein G. I., Kudryavtsev B. N.* 1992. A method for investigating hepatocyte polyploidization kinetics during postnatal development in mammals. *J. Theor. Biol.* 156 : 349—363.
- Walsh S., Pontén A., Fleischmann B. K., Jovinge S.* 2010. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation *in vivo* — an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc. Res.* 86 : 365—373.
- Weisfeld M.* 1998. Aging, changes in the cardiovascular system, and responses to stress. *Amer. J. Hypertens.* 11 : 41—45.

STEM CELLS PLAY NO CONSIDERABLE ROLE IN CARDIOMYOCYTE  
REPOPULATION OF ADULT HUMAN HEART

*E. V. Baidyuk*<sup>1,\*</sup>, *A. Ya. Gudkova*<sup>2</sup>, *G. A. Sakuta*<sup>1</sup>, *E. N. Semernin*<sup>2</sup>,  
*A. V. Stepanov*<sup>1</sup>, *B. N. Kudryavtsev*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,  
and <sup>2</sup> I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022;

\* e-mail: katya bay@mail.ru

There are two viewpoints concerning cardiac regeneration. One assumes that the myocardium of an adult human heart has a weak regenerative capacity. According to another, myocardium can renew at a high rate due to the presence of resident stem cells. This study was aimed to test the role of stem cells in myocardium repopulation in adult humans of different age by examining the distribution of cardiomyocytes as to their size and ploidy. Cytofluorimetry and interferometry were used to determine the dry weight, volume and ploidy of myocytes isolated from the left ventricle of the normal heart of 12 men aged 20–30 years ( $n = 7$ ) and 40–50 years ( $n = 5$ ). Dry weight of cardiomyocytes made up  $6906 \pm 182$  pg ( $10^{-12}$  g) aged 20–30 years and  $9126 \pm 263$  pg in men aged 40–50 years. There were no cells with an intermediate volume between amplifying and mature myocytes. The number of cardiomyocytes in the left ventricle made up  $(3.18 \pm 0.05) \cdot 10^9$  cells in the age group 20–30 years and  $(2.06 \pm 0.6) \cdot 10^9$  cells in the age group 40–50 years. Most of the myocyte population was represented by mononucleate cells with tetraploid nuclei (41.3 %). Proportion of myocytes of different ploidy classes did not change in the interval from 20 to 50 years. Our results strongly suggest that stem cells of the heart are not involved in the regeneration of human myocardium during aging. The function of the aging heart is mostly compensated by the hypertrophy of the remaining myocytes.

**Key words:** human heart, cardiomyocyte, ploidy, hypertrophy, aging, stem cell.

---