

ТЕЛОЦИТЫ В СИНО-АТРИАЛЬНОМ УЗЛЕ ЧЕЛОВЕКА. МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ПЕЙСМЕКЕРНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК И ВОЗМОЖНОСТИ ПРОВОДИТЬ ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ИМПУЛЬС

Митрофанова Л. Б.¹, Горшков А. Н.^{1,2}, Коновалов П. В.¹, Крылова Ю. С.³, Полякова В. О.³, Кветной И. М.³

Синусный узел (СУ) состоит преимущественно из пейсмекерных Р-клеток, переходных Т-клеток, а также из Пуркинье-подобных клеток, располагающихся по периферии узла. Р-клетки, особенно в центре СУ, окружены плотной грубоволокнистой фиброзной тканью и не контактируют с Т-клетками. Мы выдвигаем гипотезу, что в СУ есть телоциты, которые могут играть роль в проведении электрического импульса от пейсмекерных клеток к рабочему миокарду.

Цель. Морфологический анализ телоцитов в составе СУ.

Материал и методы. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование СУ было проведено в 10 аутопсийных случаях. Метод двойной метки использовался с комбинациями первичных антител к HCN4/connexin43 и CD34/connexin43. Конфокальная лазерная микроскопия с 4 коктейлями антител к CD34/S100, CD34/connexin43, SMA/connexin43, S100/vimentin проводилась в 3 из 10 случаев. Дополнительные тканевые образцы СУ от 3 других пациентов подверглись электронной микроскопии и электронной иммуноцитохимии с HCN4.

Результаты. Во всех исследованных СУ были обнаружены клетки с иммунофенотипом телоцитов. В центре узла их было в 2 раза больше, чем на периферии (20,3±4,8 против 10,8±4,4 клеток при х400). Телоциты имели тесные контакты с Р-клетками, сократительным миокардом, сосудами и экспрессировали HCN4. Их ультраструктурные характеристики полностью соответствовали телоцитам, обнаруженным в других органах и других отделах сердца.

Заключение. Был обнаружен еще один тип клеток, способных проводить и, возможно, генерировать электрический импульс в СУ. На наш взгляд, электрическая гетерогенность СУ может быть объяснена присутствием телоцитов.

Ключевые слова: телоциты, синусный узел человека, иммуногистохимическое исследование, электронная и конфокальная микроскопия.

¹ФГБУ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург; ²ФГБУ НИИ гриппа, Санкт-Петербург; ³НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта, Санкт-Петербург, Россия.

Митрофанова Л. Б.* — д.м.н., зав. НИЛ патоморфологии, Горшков А. Н. — к.б.н., зав. лаборатории внутриклеточного сигналинга и транспорта, с.н.с. НИЛ патоморфологии, Коновалов П. В. — к.м.н., врач-патологоанатом патологоанатомического отделения клиники, Крылова Ю. С. — к.м.н., с.н.с. лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, Полякова В. О. — д.б.н., профессор, зав. лабораторией клеточной морфологии отдела патоморфологии, Кветной И. М. — д.м.н., профессор, зав. отдела патоморфологии.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
lubamitr@yandex.ru

ИГХ — иммуногистохимия, КЛСМ — конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, ПСС — проводящая система сердца, СУ — синусный узел, HCN — hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels.

Рукопись получена 11.11.2016
Рецензия получена 30.11.2016
Принята к публикации 02.12.2016

Российский кардиологический журнал 2017, 9 (149): 42–49

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-9-42-49>

SINO-ATRIAL NODE TELOCYTES IN THE HUMAN HEART. MORPHOLOGICAL EVIDENCE FOR PACEMAKING AND CONDUCTION PROPERTIES

Mitrofanova L. B.¹, Gorshkov A. N.^{1,2}, Konovalov P. V.¹, Krylova Yu. S.³, Polyakova V. O.³, Kvetnoy I. M.³

The sinus node (SN) is built predominantly from pacemaking P-cells, transient T-cells, and Purkinje-like cells located on the periphery of the node. P-cells, especially in the center of SN, are surrounded by dense hardfiber fibrous tissue and do not contact with T-cells. We come up with a hypothesis that in the SN there are telocytes that may play role in electrical impulse conduction from pacemaking cells to contracting myocardium.

Aim. Morphological analysis of telocytes in SN.

Material and methods. Histological and immune-histochemical study of SN done on 10 autopsies. The double trace method was used, with combinations of primary antibodies to HCN4/connexin43 and CD34/connexin43. Confocal laser microscopy with 4 cocktails of antibodies to CD34/S100, CD34/connexin43, SMA/connexin43, S100/vimentin was done in 3 among 10 cases. Additional tissue specimens from SN of 3 other patients underwent electronic microscopy and immune cytochemistry analysis with HCN4.

Results. In all studied SN, there were cells with immune phenotype of telocytes. In the center of the node, their number was 2 times more than in periphery (20,3±4,8 versus

10,8±4,4 cells in x400). Telocytes had dense contacts with P-cells, contracting myocardium, vessels, and expressed HCN4. Their ultrastructural characteristics completely resembled telocytes that are found in other organs and other heart tissues.

Conclusion. Another type of cells was found, able to conduct and, probably, generate electrical impulse in the SN. In our opinion, electrical heterogeneity of the SN might be explained by the presence of telocytes.

Russ J Cardiol 2017, 9 (149): 42–49

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-9-42-49>

Key words: telocytes, sinus node of the human, immune histochemistry, electronic and confocal microscopy.

¹Federal Almazov North-West Medical Research Centre of the Ministry of Health, Saint-Petersburg; ²Research Institute of Influenza, Saint-Petersburg; ³Ott's SRI of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint-Petersburg, Russia.

Несмотря на то, что сино-атриальный, или синусный, узел (СУ) был описан Keith A. и Flack M. в начале прошлого века, существует много разногласий в его топографии и строении из-за большой вари-

абельности. Мало известно о человеческом СУ, например, о последовательности его активации, экспрессии ионных каналов и региональных различиях [1]. Последнее имеет большое значение для хирургов,

так как точное расположение узла и его артерии невозможно предсказать безошибочно. В любом случае вся область соединения верхней полой вены с правым предсердием должна рассматриваться как зона риска при оперативных вмешательствах [2].

В большинстве случаев СУ находится субэпикардially, представлен плотной фиброзной тканью, состоящей из коллагеновых и эластических волокон, среди которых “замурованы” мелкие округлые светлые Р-клетки — водители ритма размером 5-10 мкм с небольшим количеством миофибрилл, миофиламентов, случайно расположенными митохондриями, слабо развитым саркоплазматическим ретикулумом и лизосомами. Р-клетки образуют небольшие группы, которые окружены базальной мембраной, а каждая клетка — плазматической мембраной [3]. Связь между клетками осуществляется через соприкасающиеся клеточные мембраны и лишь отчасти — через десмосомы. В СУ описывают также переходные Т-клетки с контактами конец-в-конец, конец-в-бок, бок-в-бок, с расположенными под углом большим количеством миофибрилл, чем в Р-клетках и размером от 12 до 16 мкм, длиной от 40 до 250 мкм, а также крупные бледные Пуркинье-подобные клетки с меньшим количеством миофибрилл и большим содержанием митохондрий диаметром от 20 до 50 мкм [4]. Большую часть клеточного состава узла составляют клетки-пейсмекеры (Р-клетки), меньшую — крупные клетки Пуркинье-подобного типа [5]. Последние находятся по периферии СУ. Р-клетки, Т-клетки и Пуркинье-подобные клетки являются специализированными формами кардиомиоцитов в составе узла. Кроме того, в СУ описывают фибробласты, макрофаги, тучные клетки, перициты, шванновские клетки, кровеносные сосуды и нервные волокна. Крупные пучки нервных волокон и ганглиев располагаются вокруг узла, в основном, в эпикарде. Считается, что генерируемый Р-клетками электрический импульс передается на рабочий миокард через Т-клетки [6]. На наш взгляд, интересным является факт, что клетки-пейсмекеры, особенно в центральной зоне СУ, разделены друг от друга грубой фиброзной тканью и не контактируют с Т-клетками. Остается непонятным, как же осуществляется проведение электрического импульса.

Телоциты — уникальный тип интерстициальных клеток со специфическими отростками — телоподиями, и дилатированными сегментами — подомами. Они имеют одновременно иммунофенотип интерстициальных, эндотелиальных, гладкомышечных, нервных, тучных и гемопоэтических стволовых клеток, экспрессируют CD117, vimentin, CD34, SMA, S100, NSE, а также connexin43 — белок щелевых межклеточных контактов (gap junctions) [7]. Телоциты найдены в матке, маточных трубах, кишечнике, молочной железе, поджелудочной железе, коже, мио-

карде желудочков и предсердий и других органах, обладают пейсмекерной активностью [8]. В телочитах желудка кошки найдены Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN) [9], присутствующие в Р-клетках СУ. Это интегральные белки катионных каналов мембран клеток сердца, центральной и периферической нервной системы и фоторецепторов сетчатки глаза. HCN-каналы обозначают как “каналы-водители ритма”, поскольку они участвуют в генерации ритмической активности клетками сердца и головного мозга.

Таким образом, остаются вопросы: 1) как проводится электрический импульс от Р-клеток к сократительному миокарду правого предсердия, 2) все ли мы знаем о клеточном составе СУ?

Мы выдвигаем гипотезу о том, что в СУ находятся телоциты, которые, возможно, принимают участие в проведении электрического импульса к сократительному миокарду.

Цель исследования: морфологический анализ телоцитов в составе СУ.

Материал и методы

Все аутопсии выполнялись в СЗФМИЦ имени В.А. Алмазова в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и были одобрены Этическим комитетом Центра. Макроскопическое, гистологическое и иммуногистохимическое исследование СУ выполнялось у 10 умерших от сердечно-сосудистых, онкологических и гематологических заболеваний пациентов (табл. 1), конфокальная микроскопия — у 3 из них. Дополнительные образцы СУ для электронной микроскопии были получены от 3 других больных. Образцы забирались в течение 15-30 мин после смерти. Таким образом, исследовалось 13 СУ.

Макроскопическое исследование СУ. Для исследования СУ мы иссекали фрагмент передней стенки правого предсердия с правым ушком, 1 см верхней полой вены и *crista terminalis*, в центре которого находилась пограничная борозда (рис. 1). Затем перпендикулярно пограничной борозде, от правого ушка к верхней полой вене с шагом в 3 мм скальпелем выполнялись серийные срезы (рис. 2).

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование. Парафиновые срезы СУ окрашивались гематоксилином и эозином, по ван Гизону и трихромом Массона. Выполнялись традиционное иммуногистохимическое исследование с одним первичным антителом к HCN4 и метод двойной метки с 2 первичными антителами: коктейль CD34/HCN4 и CD34/connexin43. При этом использовались кроличье поликлональное антитело к HCN4 (Alamone Labs, Jerusalem, Israel), мышинное моноклональное антитело к CD34 (clone QBEnd-10, DAKO, Denmark), кроличье поликлональное антитело к connexin43 (Diagnostic Biosystems, USA). Затем выполнялось

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов, морфологические данные и методы исследования

№	Пол	Возраст	Заболевание	Причина смерти	Масса сердца (г)	Средняя длина и ширина СУ на гистологическом срезе (см)	Методы исследования
1	М	65	ДКМП	ХСН	563	1,0 x 0,2	Г, ИГХ, КЛСМ
2	М	68	ИБС	ОИМ	463	1,2 x 0,2	Г, ИГХ, КЛСМ
3	Ж	28	Некомпактный миокард ЛЖ	ТЭЛА	587	1,2 x 0,2	Г, ИГХ, КЛСМ
4	М	41	Аортальный стеноз	ХСН	764	0,8 x 0,5	Г, ИГХ
5	М	55	ДКМП	ХСН	678	0,8 x 0,1	Г, ИГХ
6	Ж	19	Лейкоз	Пневмония	320	1,0 x 0,4	Г, ИГХ
7	М	63	Аортальный стеноз	ХСН	704	0,7 x 0,3	Г, ИГХ
8	Ж	48	Рак матки	Интоксикация	356	1,5 x 0,5	Г, ИГХ
9	М	69	ИБС	ОИМ	438	1,2 x 0,3	Г, ИГХ
10	Ж	72	ИБС	ОИМ	479	1,0 x 0,7	Г, ИГХ
11	М	65	ИБС	ОИМ	478	1,0 x 0,2	Г, ЭМ
12	М	46	Лейкоз	Пневмония	398	1,2 x 0,5	Г, ЭМ
13	М	49	Лейкоз	Пневмония	378	1,0 x 0,3	Г, ЭМ

Сокращения: Г — гистологическое исследование, ИГХ — иммуногистохимическое исследование, КЛСМ — конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, ЭМ — электронная микроскопия, ДКМП — дилатационная кардиомиопатия, ЛЖ — левый желудочек, ОИМ — острый инфаркт миокарда, ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии.

морфометрическое исследование размеров узла и его клеток с помощью Leica LAS Image Analysis System (LeicaQWin Plus v3, Leica Microsystems IS, Cambridge, UK).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) проводилась с 4 коктейлями первичных антител: CD34/S100, CD34/connexin43, SMA/connexin43, vimentin/S100. Использовались вышеуказанные для иммуногистохимического исследования антитела, а также кроличье поликлональное антитело к S100 (DAKO, Denmark), мышинное моноклональное антитело к SMA (clone IA4, DAKO, Denmark), мышинное моноклональное антитело к виментину (clone V9, DAKO, Denmark).

В качестве вторичных антител применялись Alexa Fluor 647[®] goat anti-mouse (Abcam, UK), Alexa Fluor 488[®] goat anti-rabbit (Abcam, UK). После промывания срезы контрастировались с DAPI (appliChem). В результате мышинные антитела имели красную флуоресценцию, кроличьи — зеленую, двойное (одновременное) окрашивание антителами — оранжево-желтую флуоресценцию, а ядра клеток окрашивались в синий цвет. КЛСМ проводилась на Olympus FV1000D (Япония).

Электронная микроскопия. Для электронной микроскопии образцы СУ фиксировались в 2,5%-ом растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего промывались в трёх сменах фосфатного буфера. Далее выполнялась фиксация кусочков в 1% растворе тетроксид осмия на том же буфере, при той же температуре в течение 1 ч. После фиксации

объекты были дегидратированы в серии растворов этанола возрастающей концентрации, пропитаны ацетоном и заключены в эпоксидную смолу Эпон. Полутонкие срезы (1-2 мкм) были окрашены толуидиновым синим для выбора зон СУ. Затем из блоков, содержащих клетки проводящей системы, на ультрамикротоме Leica UC7 были получены ультратонкие срезы толщиной 50-70 нм. Срезы были помещены на медные сетки и отконтрастированы в спиртовом растворе уранил-ацетата и водном растворе цитрата свинца. Электронномикроскопическое исследование срезов было выполнено на микроскопе Libra JEM 1011 (JEOL, Japan).

Для электронной иммуноцитохимии фрагменты СУ фиксировались в 4% растворе параформальдегида в фосфатном буфере с добавлением 0,2% глутаральдегида в течение 1 часа. Далее объекты дегидратировали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключали в акриловую смолу LRWhite (Sigma inc.). Полимеризация смолы проходила в закрытых желатиновых капсулах при температуре +52° С. На ультрамикротоме Leica UC7 были получены ультратонкие срезы изучаемого материала толщиной 50-70 нм. Срезы были собраны на никелевые сетки для электронной микроскопии. С целью блокирования неспецифического связывания антител срезы на сетках обрабатывали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma Inc.) в фосфатном буфере в течение 15 мин при комнатной температуре. HCN4 на ультратонких срезах выявляли непрямой методом. В качестве первичного было использовано кроличье поликлональное антитело HCN4 (Alamone Labs, Israel). Сеточки со срезами инкубировали в рас-



Рис. 1. Фрагмент передней стенки правого предсердия с правым ушком и верхней полой веной. Пограничная борозда указана отрезком.



Рис. 2. Серийные срезы передней стенки правого предсердия с синусным узлом. Зона синусного узла с артерией обведена кружком.

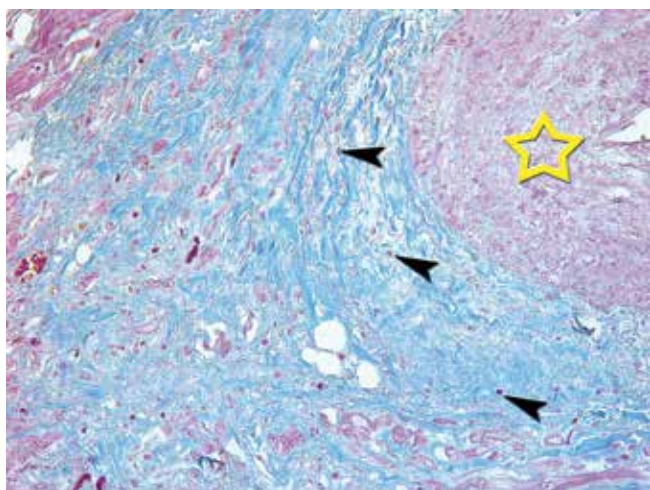


Рис. 3. Синусный узел. Специализированные клетки-пейсмекеры проводящей системы сердца “замурованы” в грубую фиброзную ткань (указаны стрелками; центральная артерия указана звездочкой; трихром Массона, $\times 100$).

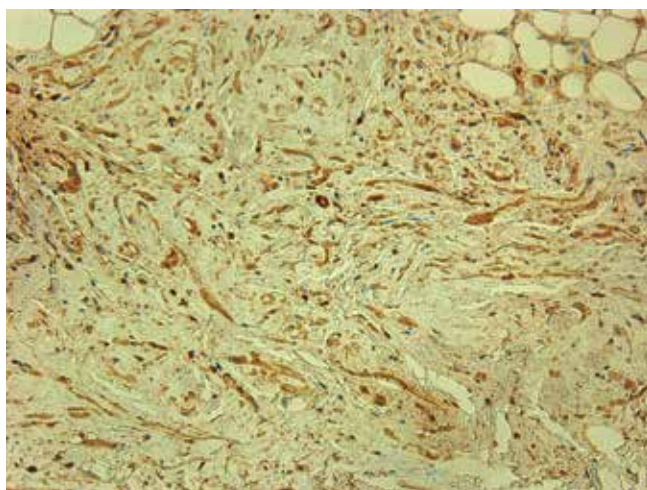


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование. HCN4 в клетках проводящей системы сердца (коричневое окрашивание). $\times 200$.

творе указанных антител на фосфатном буфере (1:100) в течение 1 часа и отмывали в 0,05% растворе Твина-20 в фосфатном буфере. В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм (Sigma; разведение 1:100, инкубация в течение 1 часа). После проведения иммунной реакции сетки со срезами были контрастированы в водном растворе уранил-ацетата и водном растворе цитрата свинца. Электронно-микроскопическое исследование срезов выполнялось на том же микроскопе JEOL JEM 1011. Цифровые электронные микрофотографии были получены с использованием камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.).

Статистический анализ. Статистическая обработка проводилась с применением программы “Statistica 10” (StatSoft, USA). Для оценки количественных

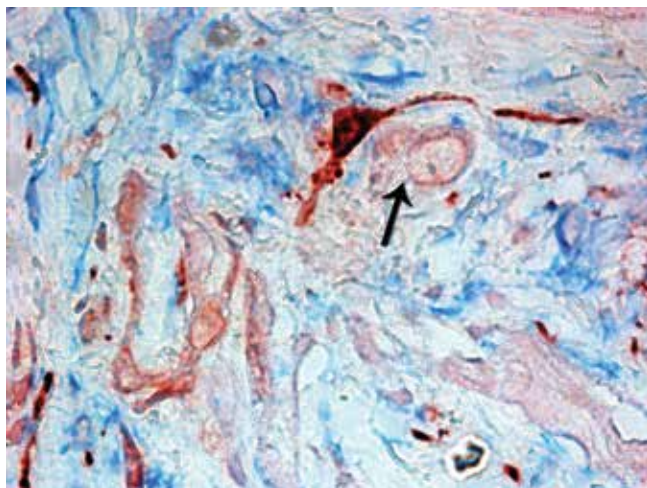
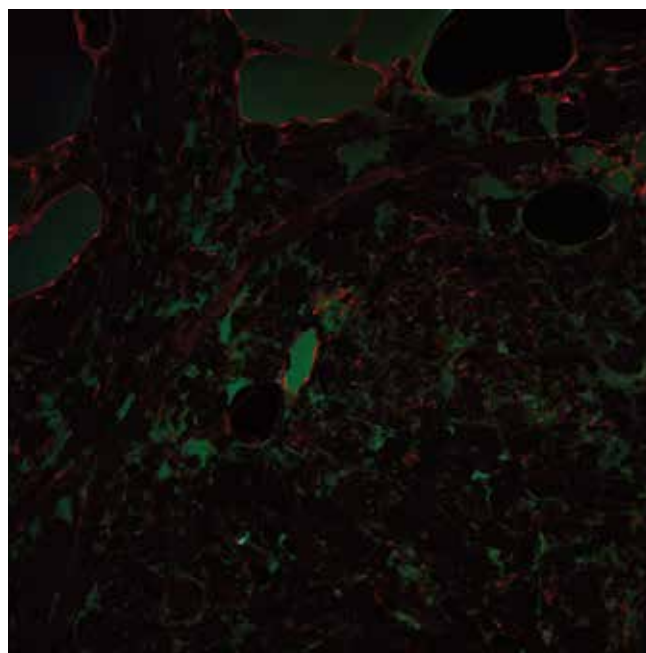
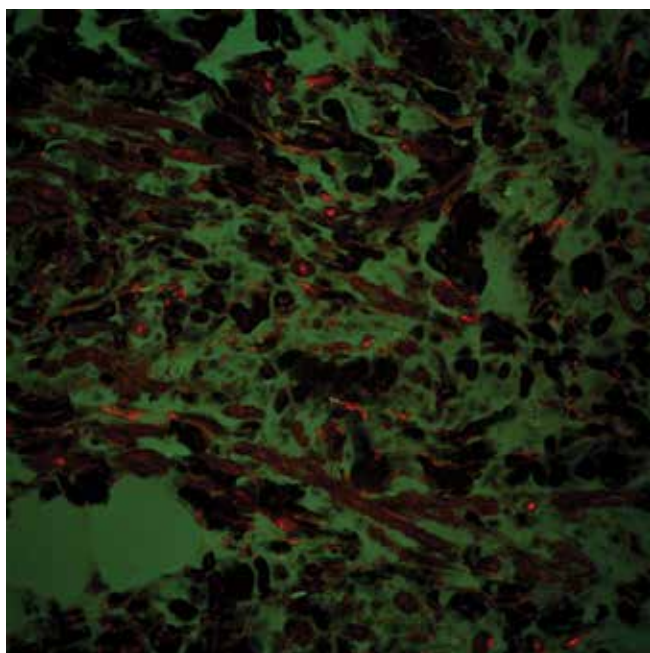


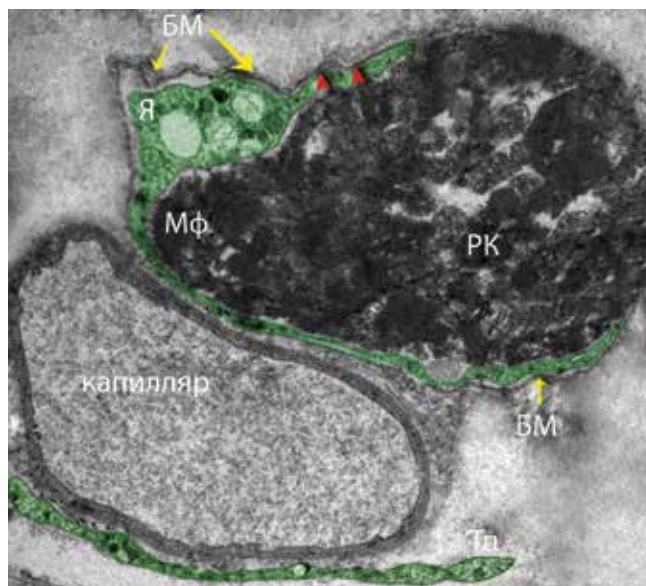
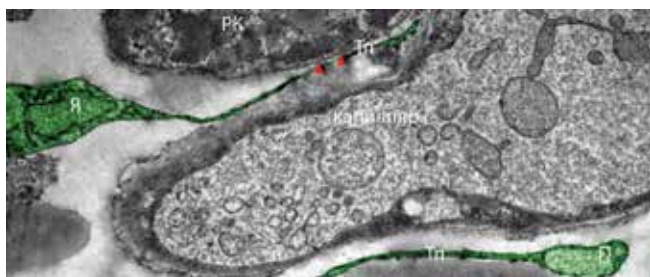
Рис. 5. Иммуногистохимическое исследование. Двойная метка connexin43 и CD34. Клетка с иммунофенотипом телоцита и телоподиями (бордовое окрашивание) рядом с клеткой-пейсмеком (указана стрелкой). $\times 1000$.



А

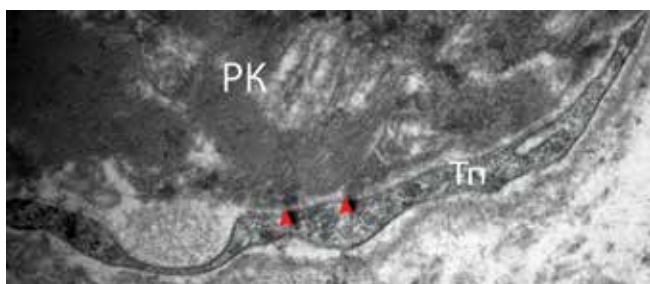
Б

Рис. 6 (А, Б). А — двойная иммунофлуоресценция CD34 (красная флуоресценция эндотелия сосудов) и S100 (ярко-зелёная флуоресценция) в СУ. Наблюдается коэкспрессия CD34 и S100 на отростках телоцитов (оранжевое окрашивание); х60. Б — двойная иммунофлуоресценция виментина (красная флуоресценция) и S100 (ярко-зелёная флуоресценция) в СУ. Наблюдается коэкспрессия виментина и S100 на отростках телоцитов (оранжевое окрашивание в центре); матово-зеленая автофлуоресценция тканей; х40.



А

Б



В

Рис. 7 (А, Б, В). Ультраструктура телоцитов в составе СУ. А — компактная ядросодержащая область телоцита и отходящая от нее телоподия; локальное утолщение (подома) в составе телоподии; локализация телоподии вблизи от кровеносного капилляра и Р-клетки. Б — проникновение телоцита под базальную мембрану Р-клетки (БМ, белые стрелки). Виден межклеточный контакт, в составе которого выявляются электронно-плотные структуры, соединяющие мембраны телоподии и Р-клетки. Телоциты выделены зеленым цветом, межклеточные контакты указаны красными стрелками. В — межклеточный контакт телоподии с Р-клеткой в виде электронно-плотных палочковидных структур.

Сокращения: Я — ядро телоцита, Тп — телоподии, П — подома, РК — Р-клетка, БМ — базальная мембрана Р-клетки, Мф — миофиламенты.

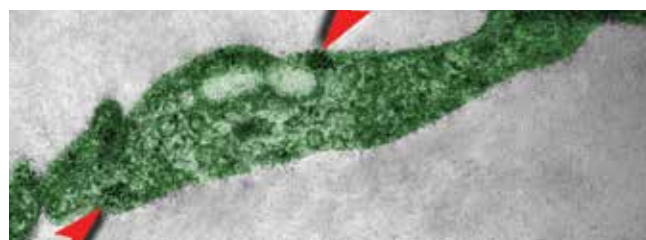


Рис. 8. Электронная иммуноцитохимия СУ. Скопления HCN4 преимущественно на мембране телоподии телоцита (выделен зеленым цветом) в виде кластеров коллоидного золота (красные стрелки).

параметров с нормальным распределением вычислялись следующие показатели: среднее арифметическое (M), ошибка среднего арифметического (m), среднее квадратичное отклонение (δ). Для сравнения нескольких независимых групп по качественным признакам использовался непараметрический критерий Краскила-Уоллиса. Достоверными считались различия, когда вероятность справедливости нулевой гипотезы (p) не превышала 0,05.

Результаты

Световая микроскопия. Во всех 13 случаях был обнаружен СУ, средние размеры которого на гистологических срезах составили $1,0 \pm 0,2 \times 0,3 \pm 0,2$ см. Он был представлен округлыми Р-клетками с бледной цитоплазмой, диаметром 3,6-8,2 мкм, в среднем $4,6 \pm 3,1$ мкм, которые располагались по 1-2 или группами, были “замурованы” в плотную фиброзную ткань и на большем протяжении не имели контактов с другими специализированными клетками проводящей системы сердца (рис. 3). Т-клетки с контактами бок-в-бок и конец-в-бок имели диаметр 6-16 мкм, средний — $11,6 \pm 4,3$ мкм. Клетки типа клеток Пуркинье располагались по периферии СУ, имели бледную цитоплазму, диаметр — от 19 до 40 мкм, в среднем — $29,2 \pm 10,7$ мкм. Узел имел центральную артерию, был окружен жировой тканью, нервными волокнами и ганглиями. В 2 из 10 случаев артерия СУ располагалась не в центре, а на периферии.

Иммуногистохимическое исследование. При иммуногистохимическом исследовании с HCN4 (рис. 4) все специализированные клетки ПСС экспрессировали данный маркер. Кроме этих клеток антиген экспрессировали и клетки треугольной, овальной или булавовидной формы с длинными отростками (характерная структурная организация телочитов) (рис. 4). Иммуногистохимическое исследование с двойной меткой выявило одновременную экспрессию CD34 и connexin43 в этих клетках (рис. 5). При этом, они имели тесный контакт с Р-клетками и рабочими кардиомиоцитами. В этих клетках также одновременно экспрессировались HCN4 и CD34.

Среднее количество этих клеток с иммунофенотипом телочитов в одном поле зрения при $\times 400$ составило $16,2 \pm 4,5$. При этом, характер распределения клеток был неравномерный. Так, наибольшее среднее количество клеток ($20,3 \pm 4,8$) отмечалось в центральной части СУ. Напротив, по периферии узла, преимущественно среди жировой ткани, среднее количество клеток составляло $10,8 \pm 4,4$. Средняя длина клеток была $29,2 \pm 12,4$ мкм, а средний диаметр самой широкой (треугольной, овальной или булавовидной) части клеток был $2,6 \pm 0,6$ мкм.

Конфокальная микроскопия. Конфокальная микроскопия СУ позволила увидеть коэкспрессию CD34 и S100, CD34 и connexin43, SMA и connexin43, S100

и vimentin в вышеописанных клетках с несколькими длинными, тонкими отростками, соответствующих иммунофенотипу телочитов. Метод позволил выявить густую сеть из длинных отростков-телоподий с дихотомным делением и тесные контакты телоподий телочитов с Р-клетками (рис. 6).

Электронная микроскопия. Электронно-микроскопическое исследование обнаружило, что в интерстиции СУ регулярно присутствуют клетки, имеющие компактную ядросодержащую область размером 6-12 мкм и образующие длинные тонкие, нередко извитые цитоплазматические отростки толщиной 0,1-0,3 мкм, длиной 40 мкм и более (рис. 7А). Достоверно оценить истинную длину отростков на ультратонких срезах затруднительно, т.к. отростки имеют неправильную форму и частично могут уходить из плоскости среза. Ультраструктурная организация данных клеток полностью совпадает с неоднократно описанными ранее в других органах и других областях сердца телочитами [10]. Характерной особенностью упомянутых цитоплазматических отростков (телоподий) являются периодически встречающиеся по их ходу утолщения (подомы) толщиной 0,4-0,8 мкм. В составе СУ телочиты и их телоподии локализованы преимущественно в близости от специализированных клеток проводящей системы сердца и от мелких кровеносных сосудов.

Телоподии часто располагаются непосредственно снаружи базальной мембраны, выстилающей специализированные кардиомиоциты ПСС, на расстоянии 0,2-0,4 нм от их плазматической мембраны. В некоторых случаях нами было выявлено проникновение телочитов под базальную мембрану Р-клеток, сближение мембран телоподий и Р-клетки на 20-30 нм и формирование межклеточных контактов в этой области (рис. 7Б). В данных контактах обнаруживаются электронно-плотные палочковидные структуры, обеспечивающие структурную ассоциацию мембран в составе контакта (рис. 7В). Телочиты активно секретируют во внеклеточную среду везикулы (экзосомы) диаметром 0,1-0,2 нм, по-видимому, являющиеся средством коммуникации с соседними клетками.

Электронно-микроскопическая иммунодетекция HCN4 на ультратонких срезах СУ позволила обнаружить данный белок в составе телоподий телочитов, что соответствует нашим данным иммуногистохимии. Непрямое иммуномечение выявляет HCN4 в виде небольших скоплений коллоидного золота преимущественно на мембране телоподий (рис. 8).

Обсуждение

Таким образом, в результате исследования с использованием иммуногистохимического анализа, в том числе с двойной меткой, КЛСМ и электронной микроскопии, было доказано наличие телочитов

в СУ, которые одновременно экспрессировали connexin43 и CD34, connexin43 и SMA, vimentin и S100, HCN4 и CD34. Этот иммунофенотип может соответствовать только телоцитам. Факт наличия экспрессии коннексина43 в СУ противоречит результатам исследований других авторов [11]. Это, возможно, связано с тем, что работы выполнялись на мелких объектах — мышах.

Региональную неоднородность узла описывают не только с точки зрения морфологии клеток, которую мы в своем исследовании подтвердили, но и пейсмекерной активности, конфигурации потенциала действия и проводимости, плотности ионных токов, экспрессии белков gap junction (Cx40, Cx43 и Cx45), вегетативной регуляции и старения. С электрофизиологической точки зрения СУ является гетерогенной структурой, которая экспрессирует уникальный набор ионных каналов, необходимых для генерации и распространения потенциала действия. Verker AO, et al. впервые на человеческом СУ продемонстрировали роль I_f тока в пейсмекерной активности и определении частоты сердечных сокращений [12]. Ген ионных каналов, отвечающих за этот ток, принадлежит семейству генов HCN, состоящих из четырех изоформ. В СУ человека были описаны три его изоформы — HCN1, -2, -4. Считается, что в сердце человека преобладают изоформы HCN1 и HCN4. Известно также, что HCN1-ток обладает наиболее быстрой кинетикой активации, а HCN4 — самой медленной.

Экспрессия телоцитами HCN4, доказанная нами с помощью иммуногистохимического исследования с двойной меткой и электронной иммуноцитохимии, на наш взгляд, свидетельствует о том, что эти клетки могут проводить электрический импульс от клеток пейсмекеров к рабочему миокарду, и, возможно, даже генерировать электрический импульс. На наш взгляд, Brioschi C, et al. [13], описывающие в своей работе HCN4-позитивные мелкие клетки, организованные в группы, которые связаны между собой 3D сетью тонких отростков, на самом деле описывают Р-клетки, оплетенные сетью телоцитов. Эти же авторы утверждают, что миоциты кроличьего СУ с интенсивной экспрессией HCN4 являются пейсмекерными клетками. Наше исследование демонстрирует, что высокая интенсивность (плотность) экспрессии HCN4 в центральной части СУ вызвана не только наличием там Р-клеток, но и большого количества телоцитов.

В нашей работе было показано, что телоциты находятся рядом не только с клетками-пейсмекерами, но и с рабочим миокардом на границе СУ.

Телоциты в миокарде были подробно описаны ранее другими авторами с помощью электронной микроскопии [14]. В миокарде выявлена трехмерная сеть из телоподий телоцитов, густо обволакивающих кардиомиоциты и контактирующих со всеми клетками и структурами [15]. Доказано модулирующее влияние телоцитов на миоциты, иммунные, сосудистые и нервные клетки [16]. Кроме gap junctions они имеют точечные, наноконтакты и плоские контакты с иммунными, нервными клетками, эндотелиоцитами, перицитами, шванновскими клетками и кардиомиоцитами. Описывают, что часто телоциты близки к базальной пластинке кардиомиоцитов, но расстояние между двумя клеточными мембранами составляет около 150 нм, в то же время, есть точечные слияния (dot fusion), точечные узлы-контакты (dot junctions), соединяющие клеточные мембраны. В этих местах в цитоплазме кардиомиоцитов отмечают плотный материал (подобный Z-линии). Обычно контакты телоцитов с кардиомиоцитами располагаются в зоне вставочных дисков, реже вне этих зон. В СУ мы видели межклеточные контакты между клетками-пейсмекерами и телоцитами в виде параллельных друг к другу и перпендикулярных к мембранам электронно-плотных наноконтактов, и плоские контакты телоподий с мембраной кардиомиоцита. При этом, телоцит находился под базальной мембраной, общей для двух Р-клеток.

Феномен пейсмекерного сдвига (pacemaker shift) также демонстрирует, что СУ неоднороден. Исследования Voyett MR, et al. выявили электрическую гетерогенность СУ с замедленным проведением импульса в центре и более быстрым по периферии [17]. Ряд авторов считают, что СУ — сложный комплекс неоднородной ткани, имеющий много зон для генерации импульса с доминирующими и дочерними фокусами, которые и обуславливают электрофизиологическую гетерогенность клеток СУ [18]. На наш взгляд, электрическую гетерогенность можно объяснить одновременным наличием 2 типов клеток, способных к проведению электрического импульса в СУ — Т-клеток и телоцитов, а также 2 типов клеток, способных генерировать этот импульс — Р-клеток и телоцитов. Замедленное проведение импульса в центре может быть связано и с тем, что в центральной части СУ телоцитов в 2 раза больше, чем на периферии. Густая 3D-сеть телоподий этих клеток может являться субстратом для macro reentry.

Таким образом, в результате исследования был выявлен еще один тип клеток, на наш взгляд, способных генерировать и проводить электрический импульс в СУ.

Литература

1. Schuessler RB, Boineau JP, Bromberg BI. Origin of the sinus impulse. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996; 7(3): 263-74.
2. Anderson KR, Ho SY, Anderson RH. Location and vascular supply of sinus node in human heart. *Br Heart J* 1979; 41:28-32.
3. Saunchez-Quintana D, Yen Ho S. Anatomy of cardiac and atrioventricular specialized conduction system. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56(11): 1085-92.
4. Waller BF, Gering LE, Branyas NA, Slack JD. Anatomy, histology, and pathology of the cardiac conduction system: Part I. *Clin Cardiol* 1993; 16: 249-52.
5. James TN. Anatomy of the conduction system of the heart. In *The Heart* (Ed. Hurst JW). McGraw-Hill. New York, 1982: 46-56.
6. James TN. Cardiac innervation: anatomic and pharmacologic relations. *Bill N Y Acad Med* 1967; 43(12): 1041-86.
7. Popescu LM, Nicolescu MI. Resident stem cells and regenerative therapy. In: *Telocytes and Stem cells*. New York: Elsevier, 2013: 205-31.
8. Zhu YF, Wang XY, Lowie BJ, Parsons S, White L, Kunze W, Pawelka A, Huizinga JD. Enteric sensory neurons communicate with interstitial cells of Cajal to affect pacemaker activity in the small intestine. *Pflugers Arch* 2014; 466: 1467-75.
9. Si X, Huang L, Gong Y, Lu J, Lin L. Role of calcium in activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels caused by cholecystokinin octapeptide in interstitial cells of cajal. *Digestion* 2012; 85(4): 266-75.
10. Kostin S. Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med* 2010; 14(7): 1917-21.
11. Liu J, Dobrzynki H, Yanni J, Boyett MR, Lei M. Organization of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 729-38.
12. Verkerk AO, Wilders R, van Borren MMGJ, Peters RJG, Broekhuis E, Lam K, Coronel R, de Bakker JMT, Tan HL. Pacemaker current (I_f) in the human sinoatrial node. *European Heart Journal* 2007; 28: 2472-78.
13. Brioschi C, Micheloni S, Tellez JO, Pisoni G, Longhi R, Moroni P, Billeter R, Barbuti A, Dobrzynski H, Boyett MR, DiFrancesco D, Baruscotti M. Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47(2): 221-227.
14. Kostin S. Cardiac telocytes in normal and diseased hearts. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 55: 22-30.
15. Cretoiu D., Hummel E., Zimmermann H., Gherghiceanu M., Popescu L. M. Human cardiac telocytes: 3D imaging by FIB-SEM tomography. *J. Cell. Mol. Med.* 2014; 11(18): 2157-64.
16. Popescu LM, Gherghiceanu M, Cretoiu D, Radu E. The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICC) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ. *J Cell Mol Med* 2005; 9:714-30.
17. Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 2000; 47(4): 658-87.
18. Gomes JA, Winters SL. The origins of the sinus node pacemaker complex in man: demonstration of dominant and subsidiary foci. *JACC* 1987; 9(1): 45-52.