

# Применение аллогенного биоматериала для коррекции постинфарктного фиброза миокарда и миокарда и регенерации кардиомиоцитов

С.А.МУСЛИМОВ, Л.А.МУСИНА, С.И. АНДРИЕВСКИХ, А.В.ЧУКИЧЕВ

ФГУ «Всероссийском центр глазной и пластической хирургии Росздрава»  
ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Росздрава»

Уфа, Россия

*РЕФЕРАТ.* В статье рассмотрено влияние биологического материала Аллоплант на морфологическую структуру миокарда в различные сроки экспериментальной ишемии и обоснована возможность его применения в лечении острого расстройства кровообращения сердца и постинфарктного ремоделирования левого желудочка сердца. На модели экспериментального инфаркта миокарда морфологически оценена динамика развития репаративных процессов в подострую и хроническую фазу ишемического повреждения миокарда. Описан хирургический способ имплантации биоматериала Аллоплант при экспериментальной ишемии миокарда. Морфологически охарактеризованы особенности течения репаративных процессов в миокарде после имплантации биологического материала Аллоплант в различные фазы воспалительной реакции. Проведен анализ баланса пролиферативно-клеточных и фибропластических процессов в ишемически поврежденном миокарде в зависимости от сроков имплантации экспрессии PCNA-ядерного антигена полиферирующих клеток и TGF-b1 – трансформирующего фактора роста фибропластов. Выявлено, что формирование функционального регенерата в миокарде экспериментальных животных после использования аллогенного биоматериала сопровождается васкуляризацией и появлением групп миоцитоподобных клеток. Показано влияние аллогенного биоматериала Аллоплант на снижение летальности животных при экспериментальной острой ишемии

*КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:* Аллоплант для стимуляции репарации миокарда, аллотрансплантация.

## СОКРАЩЕНИЯ

ПНВ ЛКА – передняя нисходящая ветвь левой коронарной артерии  
ДБМА – диспергированный биоматериал Аллоплант®

## ВВЕДЕНИЕ

Ишемическая болезнь сердца остается одной из главных причин, определяющих высокий уровень инвалидизации и смертности работоспособного населения во всём мире (Сыркин А.Л., 1998; Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г., 2006 и др.).

Основное место среди заболеваний сердечно-сосудистой системы у взрослого населения занимает ишемическая болезнь сердца – 46,9% случаев (Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. 2002). Хроническая сердечная недостаточность (ХСН), субстратом которой, прежде всего, является кардиосклероз, как наиболее частый исход ишемической болезни

сердца, так же является весьма актуальной медико-социальной проблемой. По данным В.А. Алмазова и С.В. Шляхтова (1995), ХСН страдают около 1% взрослого населения страны, и 10% людей старше 75 лет. Ежегодно случаи ХСН выявляются в группе людей от 35 до 65 лет, составляя в среднем 3 случая на 1000 населения, а в группе старше 65 лет – более 10. Однолетняя выживаемость в группе со среднетяжелым течением ХСН приходится на 79 – 86% населения, в группе с тяжелым течением – 50 – 70% (Терещенко С.Н., 2000).

В последние годы большое внимание уделяется процессу постинфарктного ремоделирования левого желудочка сердца, представляющего собой структурную и функциональную перестройку левого желудочка, которая происходит после острого инфаркта миокарда. Результатом этих морфофункциональных изменений являются выраженная дилатация и изменение геометрической формы левого желудочка, что ведет к его систолической и диастолической дисфункции и развитию хронической сердечной недостаточности (Беленков Ю.Н., 1997). Процессы, происходящие в миокарде после острой ишемии, приводят к необратимым морфологическим и функциональным изменениям в сердце (Румянцев П.П., 1982; Непомнящих Л.М., 1991; Автандилов Г.Г., 1984; Гуцол А.А., 1990; Бышевский А.Ш., 1994; Дмитриева Е.М., 1983; Клишков А.А., 1984; Краковский А.А., 1992; Саркисов Д.С., 1979; Сокрут В.Н., 1991; Сыркин А.Л., 1998; Фетисова Т.В., 1975, 1976; Фролов В.А., 1989 и другие).

Большую эффективность в лечении сердечной недостаточности, связанной преимущественно с коронарной патологией, приобрели малоинвазивные и хирургические методы, такие как транслюминальная ангиопластика и стентирование коронарных артерий, прямая реваскуляризация миокарда или аортокоронарное шунтирование, динамическая кардиомиопластика, реконструктивные операции на левом желудочке и, конечно, трансплантация сердца (Бураковский В.И., Бокерия Л.А., 1996; Краковский А.А., 1992; Шумаков В.И., 2003).

Пересадка сердца, без сомнения, является достаточно радикальным и эффективным методом лечения декомпенсированной сердечной недостаточности (Бураковский В.И., Бокерия Л.А., 1996; Шумаков В.И., 2003), однако повсеместное применение данной технологии сегодня ограничено по ряду причин, среди которых немаловажное значение имеет иммунологический конфликт донора и реципиента, а

так же крайне небольшое количество доноров (Забирски Дж. Б., 1984; Долгих В.Т., 2000).

В последнее время широко обсуждаются возможности применения клеточной трансплантологии в лечении кардиологических больных. Для заместительной терапии инфарктного миокарда используются различные клеточные линии: s клетки-сателлиты поперечно-полосатой мускулатуры или скелетные миобласты, взрослые и фетальные кардиомиоциты, ген-модифицированные клетки костного мозга, стволовые клетки костного мозга, факторы роста гепатоцитов и эндотелиоцитов и т.д. (Сухих Г.Т., Репин В.С., 1998; Потапов И.В., Крашенинников М.Е., Онищенко И.А., 2001; Beltrami A.P., 2001, 2002, 2003; Bittira B., 2003; Strauer B.E., 2002; Hamano K., 2002; Hughes S., 2002; Kadner A., 2002; Li R.-K., 1994, 1995, 2002, 2003; Miyagava S., 2002; Kajstura J., 1995, 1997, 2001, 2003; Menasche P., 2003; Ruhparwar A., 2002; Reinecke H., 2002; Roell W., 2002 и другие). Несмотря на видимую эффективность применения донорских или собственных клеток для лечения некоторых форм сердечной недостаточности, метод клеточной кардиомиопластики имеет ряд нерешенных этических и технических моментов.

В середине 70-х годов в г. Уфа в ходе решения проблемы снижения антигенных свойств аллотрансплантантов профессором Э.Р. Мулдашевым и его единомышленниками был создан и клинически широко внедрен спектр биологических материалов под торговой маркой Аллоплант<sup>tm</sup>. Сегодня данный препарат успешно используется не только в хирургии глаза, но и в реконструктивно-восстановительной, пластической, челюстно-лицевой хирургии, гепатологии и гастрохирургии (Муслимов С.А., 2000).

Основным эффектом действия материалов серии Аллоплант является стимуляция регенерации тканей и дифференцировки клеточных элементов, и как следствие этого, снижение интенсивности образования рубцовой ткани (Мулдашев Э.Р., 1994; Нигматуллин Р.Т., 1995). Его низкие антигенные свойства, способность полностью резорбироваться не вызывают усиления воспалительной реакции в зоне повреждения. Результатирующей всех этих свойств является образование функционально полноценного регенерата (Мулдашев Э.Р., 1994; Нигматуллин Р.Т., 1995; Муслимов С.А., 1984).

Данные биологические свойства, представляющие не только теоретический, но и практический интерес, привели нас к мысли о возможности исполь-

зования диспергированной формы материала Аллоплант с целью ремоделирования ишемически поврежденного миокарда.

#### *Цель исследования*

Изучить влияние биологического материала Аллоплант на морфологическую структуру миокарда в различные сроки экспериментальной ишемии и обосновать возможность его применения в лечении острого расстройства кровообращения сердца.

#### *Задачи исследования*

1. Воспроизвести адекватную модель экспериментального инфаркта миокарда и морфологически оценить динамику развития репаративных процессов в подострую и хроническую фазу ишемического повреждения миокарда.
2. Разработать хирургический способ имплантации биоматериала Аллоплант при экспериментальной ишемии миокарда.
3. Морфологически охарактеризовать и сравнить особенности течения репаративных процессов в инфарцированном миокарде после имплантации биологического материала Аллоплант в различные фазы воспалительной реакции.
4. Оценить баланс пролиферативно-клеточных и фибропластических процессов в ишемически поврежденном миокарде в зависимости от сроков имплантации биологического материала Аллоплант на основе иммуногистохимических исследований экспрессии PCNA-ядерного антигена пролиферирующих клеток и TGF-b1-трансформирующего фактора роста фибробластов.

#### *Научная новизна*

Впервые для стимуляции репаративных процессов и ремоделирования инфарцированного миокарда экспериментально использована диспергированная форма биологического материала Аллоплант. Установлено, что выбранный способ введения аллогенного биоматериала в миокард является безопасным и надежным. Доказано, что низкий уровень индуктора фиброза – трансформирующего фактора роста TGF-b1 и слабая пролиферативная активность фибробластов при применении аллогенного биоматериала, обуславливают минимальное раз-

витие фиброза в ишемизированной зоне миокарда кроликов. Выявлено, что формирование функционального регенерата в миокарде экспериментальных животных после использования аллогенного биоматериала сопровождается васкуляризацией и появлением групп миоцитоподобных клеток. Применение аллогенного биоматериала при экспериментальной острой ишемии снижает летальность животных. Обнаружено, что введение аллогенного материала в ишемизированный миокард животного на поздних сроках вызывает частичную инволюцию грубого рубца с образованием рыхлой соединительной ткани и не приводит к формированию аневризмы левого желудочка в месте имплантации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование проведено на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и базе отдела морфологии ФГУ «Всероссийский Центр глазной и пластической хирургии Росздрава», г. Уфа.

Экспериментальные исследования были проведены нами на 48 беспородных кроликах. Все животные были разделены на две группы – контрольную (18 кроликов) и опытную (30 кроликов). Эксперименты на животных выполнялись согласно приказу МЗ СССР «О гуманном обращении с экспериментальными животными» № 755 от 12 августа 1977 г. с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13 ноября 1984 г. №724).

С использованием внутримышечной анестезии раствором кетамина доступом через левую плевральную полость и полость перикарда осуществлялась визуализация передней нисходящей ветви левой коронарной артерии (ПНВ ЛКА) и последующая её перевязка в средней трети с целью создания острой ишемии области миокарда левого желудочка. В дальнейшем, на сроке 5 (22 кролика) и 30 (8 кроликов) суток, после острой ишемии, в опытной группе кроликов в ишемизированную зону выполнялась имплантация диспергированной формы биологического материала Аллоплант, растворенного в физиологическом растворе. В контрольной

группе по аналогичной методике вводился физиологический раствор. Из эксперимента животные выводились путем инсуляции летальной дозы паров раствора фторотана на 3, 7, 14, 21, 30 и 90 сутки.

После выведения животных из эксперимента, сердца извлекались из грудной полости путем отсечения магистральных сосудов (аорта, легочная артерия, легочные вены и полые вены) с оставлением допустимой их длины. Полученный препарат тщательно отмывался от сгустков. Вдоль поперечной оси сердца происходила нарезка миокарда желудочков. Участки миокарда с макроскопически видимым повреждением выделялась из окружающего интактного миокарда, с оставлением миокарда периинфарктной области. Полученные препараты фиксировались в 10% растворе нейтрального формалина, после чего отмывались в физиологическом растворе, обезживались в серии спиртов возрастающей концентрации и заливались в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 и окрашивали по методам ван-Гизона, Маллори, гематоксилином и эозином. Процентное соотношение (на 1000 клеток) мезенхимных клеток и фибробластов считали на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Микроскопические исследования проводились с использованием световых микроскопов JENVAL и AXIO IMAGER Z1 (фирмы «CARL ZEISS», Германия).

Для электронномикроскопического исследования кусочки тканей фиксировали в 2,5% глутаральдегиде, приготовленном на какодилатном буфере (pH 7,2–7,4), с последующей дофиксацией в 1% растворе OsO<sub>4</sub>. Материал обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике (Б. Уикли, 1975). Предварительно изготавливали полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали их толуидиновым синим на 2,5%-ном растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронномикроскопического исследования. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-III 8800 (Швеция). Ультратонкие срезы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу (Уикли Б., 1975) и изучали в трансмиссионном микроскопе Jeol-100XB (Япония) при увеличениях 5,8 000–20 000.

Иммуногистохимические исследования проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм с

минимальной площадью 1 см<sup>2</sup>. Использовали непрямой стрептавидин-биотиновый метод с применением моноклональных антител к PCNA – Proliferative Cells Nuclear Antigen – ядерному антигену пролиферирующих клеток и TGF- $\beta$  – трансформирующему фактору роста- $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology). Пролиферативную клеточную активность мезенхимных и юных фибробластов характеризовали по процентному соотношению позитивно окрашенных на PCNA клеток (на 100 просчитанных клеток).

В современных исследованиях большое распространение получил метод оценки пролиферативной активности клеток с помощью иммуногистохимического анализа уровня экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток (proliferative cellular nuclear antigen – PCNA). Данный антиген является не гистонным кислотным ядерным белком массой 36 кД, необходимым для синтеза ДНК и относится к вспомогательным белкам ДНК-полимеразы дельта. Некоторые исследования с использованием PCNA-антител показали, что PCNA аккумулируется в ядрах клеток в S фазе митотического цикла и расценивается как маркер пролиферации. Преимуществом данной методики является её простота и быстрота при использовании специального моноклонального метода PC 10 (Lavezzi A.M., Terni L., Matturri L., 2000).

Для анализа интенсивности фибропластических процессов использовалась иммуногистохимическая оценка экспрессии трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ , известного как индуктор фиброза. Трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$  – transforming growth factor) является по современным данным (Abraham D.J. et al., 2000) индуктором фиброза, так как усиливает экспрессию фактора роста соединительной ткани (Connective tissue growth factor), который, в свою очередь, стимулирует пролиферацию фибробластов и активный синтез ими коллагена (Leask A., Abraham D. J., 2004). Уровень экспрессии трансформирующего фактора роста – TGF $\beta$ , определяли путем измерения относительной площади специфического окрашивания на гистологических срезах с помощью аппаратно-программного комплекса анализа изображений Биоскан-2 (Канако, Беларусь).

Полученные количественные результаты исследования были обработаны при помощи стандартного пакета статистических программ параметрическими методами (Реброва О.Ю., 2002; Боровиков В.П., 2003). Были применены описательные статистиче-



ские данные (среднее значение, стандартное отклонение, количество случаев), t-критерий оценки различий средних двух независимых выборок. Для оценки динамических изменений каждой группы (контрольной и опытной) был использован дисперсионный анализ, с помощью которого исследовали различия выборочных дисперсий на 3, 7, 14, 21, 30, 90 сутки. Высчитывали показатели, демонстрирующие различие выборочных дисперсий – коэффициент влияния фактора (КВФ), коэффициент Фишера (F). Для проверки изменений в контрольной и опытной группах на разных сроках исследования был применен двухфакторный дисперсионный анализ, позволяющий выявить взаимодействие факторов – сравнить две группы во времени.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внешний вид сердец был практически идентичен у всех животных. Полость перикарда была вовлечена в спаечный процесс весьма умеренно. Отсутствовали внешние признаки формирования аневризмы левого желудочка. Лигатура, с помощью которой производили перевязку артерии, локализовалась в намеченном месте – границе между верхней и средней третью ПНВ ЛКА. Проводя сравнительное изучение внешнего вида сердца у животных опытной и контрольной групп, мы не выявили выраженных макроскопических отличий. Оценивая состояния окружающих тканей, мы не выявили инфекционных воспалительных реакций в виде гнойных очагов или рубцово измененных тканей, подтверждающих закончившуюся репарацию после микробного воспаления. Легочная ткань не была ателектазирована, равно как и не было плевральных наложений, что подтверждает адекватность проводимой антибактериальной терапии и профилактики пневмоторакса. Края раны были адекватно сопоставлены с образованием послеоперационного гомогенного рубца.

## ДИНАМИКА ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ В МИОКАРДЕ КРОЛИКА ПОСЛЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ОСТРОЙ ИШЕМИИ

В контрольной группе животных после воспроизведения острой ишемии миокарда и последующим введении физиологического раствора выявлены определенные морфологические преобразования. Спустя двое суток в очагах поражения в большом

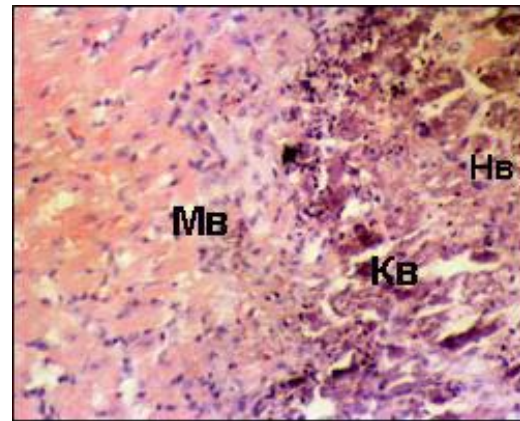


Рис.1 Область инфаркта через 3 суток после перевязки коронарной артерии. Клеточный вал (Кв), отграничивающий некротизированные мышечные волокна (Нв). Мв – окружающие мышечные волокна. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x200.

количестве обнаруживались сегментоядерные нейтрофильные гранулоциты. Концентрируясь вокруг очагов некроза кардиомиоцитов и отграничивая некротизированные мышечные волокна, они образовывали относительно широкий клеточный вал (рис.1)

Начиная с четвертых суток снаружи от лейкоцитарного вала выявлялись макрофаги. В процессе резорбции погибшей ткани они постепенно продвигались в глубокие отделы очага поражения. Среди воспалительных клеток обнаруживались крупные веретеновидные и отростчатые клетки: электронно-микроскопически определялись мезенхимные и малодифференцированные фибробластоподобные клетки. Фибробластоподобные клетки дифференцировались в фибробласты с многочисленными расширенными каналами гранулярного эндоплазматического ретикулула и несколькими пластинчатыми комплексами Гольджи в цитоплазме, свидетельствующими об активной

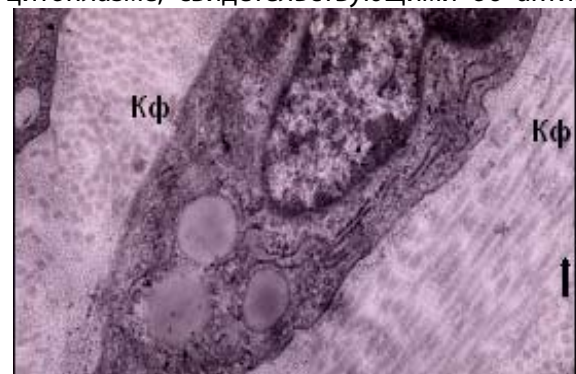


Рис.2 Зрелый фибробласт с каналами ГЭР (1) и липидными вакуолями (Л) в цитоплазме среди плотно упакованных новообразованных коллагеновых фибрилл (Кф) через 7 суток после перевязки коронарной артерии. Электронная микрофотография. Увел. x19000.

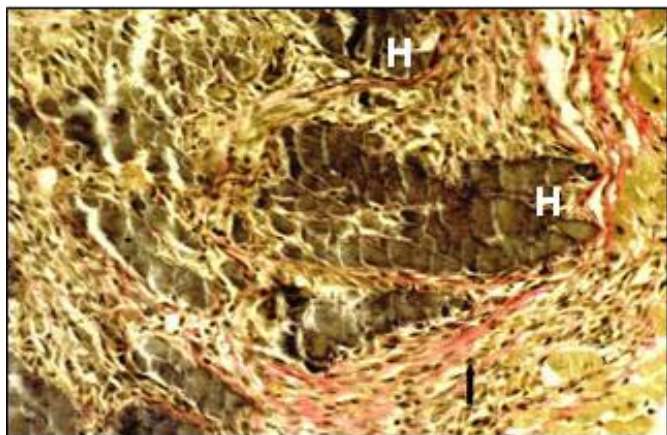
синтетической деятельности клеток.

В конце первой недели заболевания в отечных интерстициальных пространствах между разру-

**Таблица 1.** Относительная площадь окрашивания на срезах миокарда экспрессированного TGF  $\beta$ 1 у кроликов контрольной группы (в %)

Срок исследования и количество животных	Среднее $\pm$ станд.откл. (контрольная группа)	Критерии различия МК между двумя группами в динамике		
		КВФ	F	p
3-7 сутки, n=4	17,00 $\pm$ 1,15	97%	445,66	0,001
14-21 сут., n=4	31,50 $\pm$ 1,05			
На 30 сут., n=3	26,00 $\pm$ 1,63			
На 90 сут., n=2	16,20 $\pm$ 0,92			

КВФ – коэффициент влияния фактора; F – коэффициент Фишера, p – достоверность

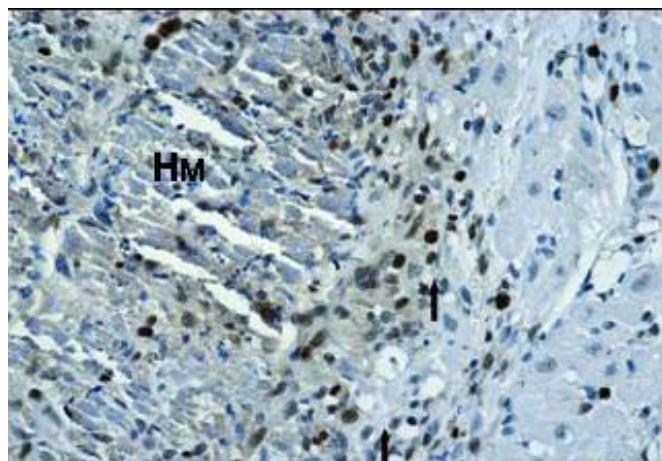


*Рис.3 14 сутки после перевязки коронарной артерии кролика. Появление новообразованных коллагеновых волокон (1) вокруг некротизированных мышечных волокон (H). Окраска по методу ван-Гизона. Увел. x200.*

шающимися кардиоциодами уже определялись плотно упакованные пучки новообразованных коллагеновых фибрилл. Между ними иногда выявлялись зрелые фибробласты с большими липидными вакуолями в цитоплазме (рис. 2).

Через 14 суток в участках, где кардиомиоциты подвергались полной деструкции, наблюдались признаки выраженной лейкоцитарной, гистиоцитарной и фибробластической реакции. Расслоившиеся и фрагментированные мышечные волокна обволакивались нежными соединительнотканными волокнами, которые разрастались наподобие паутины, заполняя лакуны между разрушенными волокнами (рис. 3).

Зрелые фибробласты также характеризовались крупными размерами. В фибробластах определялись овальные или удлинённые ядра с конденсированным хроматином. В широкой цитоплазме наблюдался хорошо развитый ГЭР с резко расширенными каналами, в которых определялось хлопьевидное содержимое. Эндоплазматическая сеть занимала почти весь объем цитоплазмы. Клетки с подобным строением можно отнести к коллагено-



*Рис.4 Проплиферация клеток в области инфаркта миокарда кролика через 3 суток после перевязки коронарной артерии. Hm – некротизирующиеся кардиомиоциты. Проплиферирующие клетки – (1) Непрямой иммунопероксидазный метод выявления PCNA. Увел. x200.*

бластам II типа, которые в свою очередь принадлежат к ряду клеток, интенсивно продуцирующих коллаген.

В этот же срок эксперимента иммуногистохимически на препаратах выявлялось относительно большое количество трансформирующего фактора роста TGF $\beta$ 1, известного как индуктор фиброза (таблица 1).

Проведенные нами иммуногистохимические исследования показали, что начиная с 3 суток эксперимента на препаратах определяются признаки пролиферации мезенхимных клеток и юных фибробластов в виде экспрессии пролиферирующими ядрами клеток антигена PCNA, окрашивающегося в интенсивный коричневый цвет (рис. 4).

При подсчете пролиферирующих клеток был проведен однофакторный дисперсионный анализ и была отмечена высокая пролиферативная активность мезенхимных клеток: она составила на 3 – 7 сутки 34/9x1,73%; на 14 – 21 сутки 11,00x1,25%; на 30 сутки 1,00x0,47% (при p<0,001). На 90 сутки пролиферативная активность клеток значительно ослабевала (Таблица 2).



**Таблица 2.** Динамика количества пролиферирующих мезенхимных клеток миокарда кроликов контрольной группы (в %)

Срок исследования и количество животных	Среднее±станд.откл. (контрольная группа)	Критерии различия МК между двумя группами в динамике		
		КВФ	F	p
3-7 сутки, n=4	34,90±1,73	99%	1856,94	0,001
14-21 сут., n=4	11,00±1,25			
На 30 сут., n=3	1,00±0,47			
На 90 сут., n=2	0,20±0,42			

КВФ – коэффициент влияния фактора; F – коэффициент Фишера, p – достоверность

Пролиферативная активность юных фибробластов на 3-7 сутки составляла 43,70±1,06%; на 14 – 21 сутки 20,50±0,74; на 30 сутки 5,00±0,57%; а к 90 суткам снижалась до 3,00±0,57% (Таблица 3).

В непосредственной близости от рубцовой ткани выявлялись признаки выраженной контракции кардиомиоцитов. Окруженные пучками коллагеновых волокон, кардиомиоциты состояли из резко сократившихся деформированных саркомеров с измененными утолщенными и деформированными Z-линиями.

При подсчете пролиферирующих клеток был проведен однофакторный дисперсионный анализ и была отмечена высокая пролиферативная активность мезенхимных клеток: она составила на 3 – 7 сутки 34/9х1,73%; на 14 – 21 сутки 11,00х1,25%; на 30 сутки 1,00х0,47% (при p<0,001). На 90 сутки пролиферативная активность клеток значительно ослабевала (Таблица 2).

Пролиферативная активность юных фибробластов на 3-7 сутки составляла 43,70±1,06%, на 14 – 21 сутки 20,50±0,74, на 30 сутки 5,00±0,57%, а к 90 суткам снижалась до 3,00±0,57% (Таблица 3)

В непосредственной близости от рубцовой ткани выявлялись признаки выраженной контракции кардиомиоцитов. Окруженные пучками коллагеновых волокон, кардиомиоциты состояли из резко

сократившихся деформированных саркомеров с измененными утолщенными и деформированными Z-линиями. В окружающем миокарде отмечалась гипертрофия большинства мышечных волокон. На ультраструктурном уровне в таких участках обнаруживались признаки набухания митохондрий и разрушения их крист.

Таким образом, развитие выраженных рубцовых изменений миокарда кроликов при инфаркте сопровождается адаптивно-компенсаторными изменениями или перестройкой окружающих тканей, то есть при инфаркте миокарда процессы ремоделирования затрагивают как инфарцированный

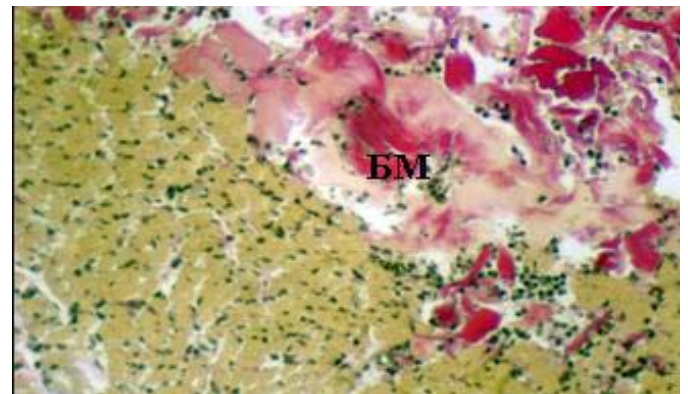


Рис.5 Гомогенизация частиц биоматериала (БМ) через 3 суток после введения при остром инфаркте миокарда у кролика. Окраска по методу ван-Гизона. Увел. x125.

**Таблица 3.** Одинамика количества пролиферирующих фибробластов миокарда кроликов контрольной группы (в %)

Срок исследования и количество животных	Среднее±станд.откл. (контрольная группа)	Критерии различия МК между двумя группами в динамике		
		КВФ	F	p
3-7 сутки	43,70±1,06	99%	3756,21	0,001
14-21 сутки	20,50±0,74			
На 30 сутки	5,00±0,57			
На 90 сутки	3,00±0,57			

КВФ – коэффициент влияния фактора; F – коэффициент Фишера, p – достоверность

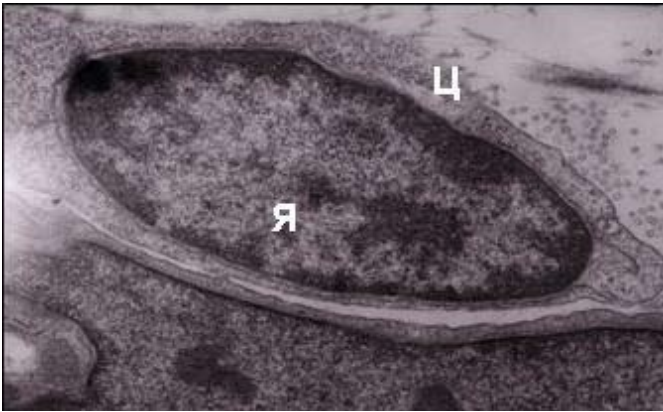


Рис.6 Мезенхимные клетки с большим количеством рибосом в узкой цитоплазме (Ц) в инфильтрате вокруг частиц БМА через 3 суток после введения при остром инфаркте миокарда у кролика. Я – ядро. Электронная микрофотография. Увел. x10000.

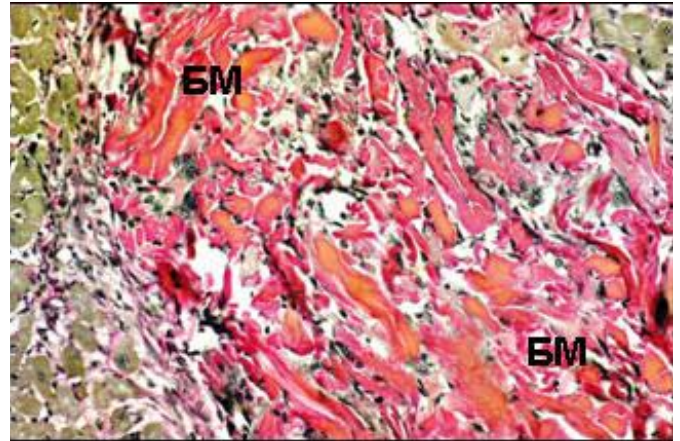


Рис.8 Изменение тинкториальных свойств частиц биоматериала (БМ) через 7 суток после введения при остром инфаркте миокарда у кролика. Окраска по методу ван-Гизона. Увел. x200

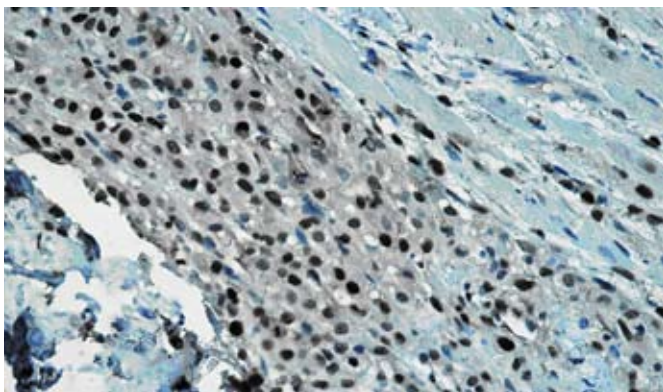


Рис.7 Экспрессия PCNA (окраска коричневого цвета) в ядрах фибробластов и мезенхимных клеток через 3 суток после введения биоматериала. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления PCNA. Докраска гематоксилином. Увел. x200

участок, так и здоровый миокард.

Таким образом, развитие выраженных рубцовых изменений миокарда кроликов при инфаркте сопровождается адаптивно-компенсаторными изменениями или перестройкой окружающих тканей, то есть при инфаркте миокарда процессы ремоделирования затрагивают как инфарцированный участок, так и здоровый миокард.

## ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В МИОКАРДЕ КРОЛИКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ДБМА ПОСЛЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ОСТРОЙ ИШЕМИИ

При остром инфаркте миокарда кролика, на 3 сутки после введения ДБМА в периинфарктную зону миокарда (т.е. на 8 сутки после наложения лигатуры), в частицах введенного биоматериала определялись признаки гомогенизации и выраженного лизиса коллагеновых волокон (рис. 5).

Иммуногистохимические исследования с применением моноклональных антител показали, что в ядрах юных фибробластов и мезенхимных клеток экспрессируется ядерный антиген PCNA, что является признаком их пролиферации (рис.7). Через 7 суток после введения ДБМА в миокард кроликов наряду с возрастанием клеточной плотности и толщины клеточного вала вокруг частиц биоматериала выявлялись признаки их набухания и гомогенизации, вследствие чего они плотно прилегали друг к другу. Процессы лизиса коллагеновых волокон биоматериала макрофагами продолжались, что выражалось в изменении их тинкториальных свойств, т.е. они по-разному окрашивались (рис. 8). В составе клеточного инфильтрата наблюдалось преобладание макрофагов разной степени зрелости, мезенхимных и юных фибробластоподобных клеток.

В данный срок эксперимента уже обнаруживались начальные признаки формирования грануляцион-

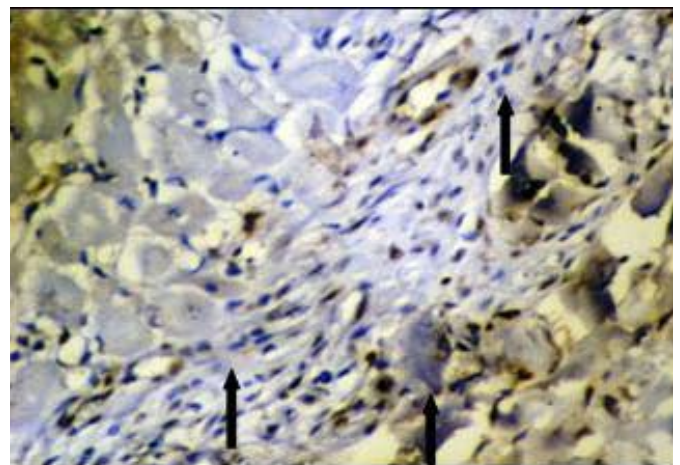


Рис.9 Экспрессия PCNA ядрами эндотелиоцитов (!) через 7 суток после введения биоматериала. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления PCNA. Докраска гематоксилином. Увел. x200.



ной ткани в очаге инфаркта. Частицы аллогенного биоматериала резорбировались макрофагами и замещались нежными тонкими коллагеновыми волокнами. В грануляционной ткани обнаруживалось большое количество эндотелиоцитов, экспрессирующих PCNA, что является показателем их митотической активности и свидетельствует о новообразовании капилляров (рис. 9).

На 14 сутки клеточная инфильтрация вокруг частиц диспергированного аллогенного биоматериала была примерно той же интенсивности, что и в предыдущий срок эксперимента, а в составе инфильтрата продолжали преобладать фагоцитарные и секреторные макрофаги, мезенхимные и фибробластоподобные недифференцированные клетки. В результате интенсивной резорбции фагоцитарными макрофагами количество введенных в миокард частиц ДБМА уменьшалось.

По периферии очага имплантации аллогенного биоматериала определялась более зрелая новообразованная соединительная ткань, которая содержала новообразованные тонкостенные сосуды. Отдельные эндотелиоциты иммуногистохимически продолжали экспрессировать антиген пролиферации PCNA. У окружающих очаги инфаркта кардиомиоцитов структура была различной – от наличия признаков дистрофических изменений различной степени до нормы.

К 21 суткам качественный состав клеток инфильтрата не менялся, уменьшилось количество нерезорбированных частиц биоматериала, несколько увеличилась площадь соединительнотканного регенерата. Кроме того, на границе регенерата и мышечных волокон, преимущественно в составе новообразованной соединительной ткани, в направлении к окружающим мышечным волок-

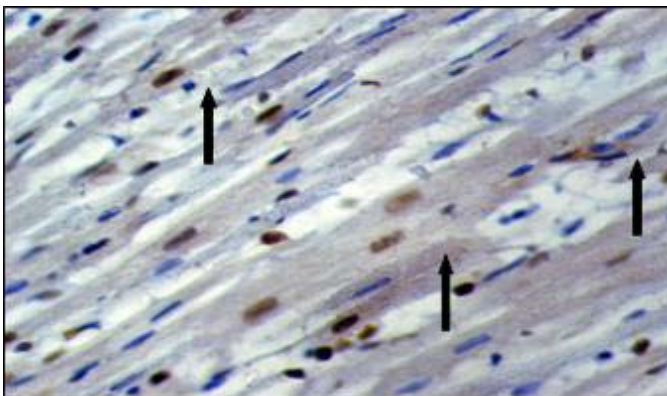


Рис.10 Экспрессия PCNA ядрами кардиомиоцитов (!) через 21 сутки после введения биоматериала при остром инфаркте миокарда у кролика. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления PCNA. Докраска гематоксилином. Увел. x400

нам определялась миграция крупных малодифференцированных клеток с крупными светлыми овальными ядрами. В близлежащих отдельных участках миокарда, около новообразованной соединительной ткани, стали обнаруживаться PCNA-положительные, т.е. проявляющие митотическую активность миоциты (рис. 10). На препаратах эти группы клеток с овальным ядром были близко расположены друг к другу, инкорпорированы между собой, пролиферативно активны и иногда окружены фибробластами. Причем миоцитоподобные клетки были объединены в группу по типу синцития, что свидетельствует об их функциональном состоянии.

К 30 суткам биоматериал постепенно резорбировался и замещался новообразованной обильно васкуляризованной рыхлой соединительной тканью. Новообразованные сосуды были тонкостенные. Эндотелиоциты в цитоплазме содержали большое количество пиноцитозных пузырьков, что свиде-

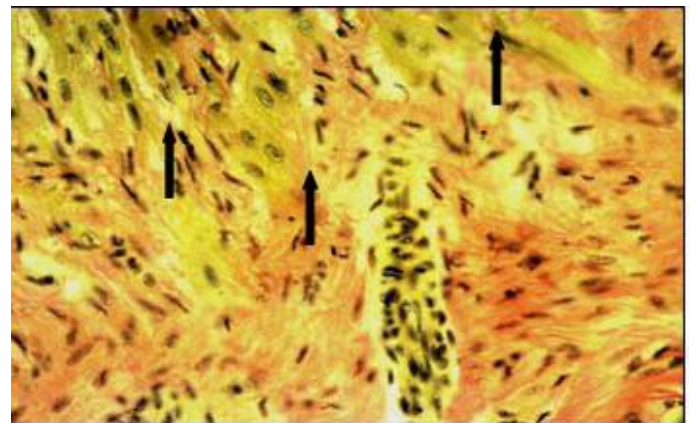


Рис.11 Экспрессия PCNA ядрами кардиомиоцитов (!) через 21 сутки после введения биоматериала при остром инфаркте миокарда у кролика. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления PCNA. Докраска гематоксилином. Увел. x400

тельствовало об интенсификации трансэндотелиального обмена.

На 60 сутки частицы аллогенного биоматериала, введенные в миокард кроликов, полностью резорбировались макрофагами и замещались относительно рыхлой васкуляризованной соединительной тканью. В толще сформировавшегося регенерата на гистологических препаратах определялись короткие тяжи миоцитоподобных клеток (рис.11). Они располагались между волокнами и клетками соединительной ткани, и местами даже соединялись с близлежащими кардиомиоцитами. На ультраструктурном уровне данные скопления миоцитоподобных клеток напоминали «почки ро-

ста», так как клетки соединялись между собой в симпласты и по структуре были очень похожи на миообласты. При электронно-микроскопическом исследовании окружающей регенерат ткани миокарда кроликов особо выраженных дистрофических изменений не обнаружено. Лишь в отдельных кардиомиоцитах отмечались слабые признаки набухания митохондрий, иногда некоторой изрезанности ядерной кариолеммы. Улучшению структуры миокарда кроликов, вероятно, способствовали и кровеносные сосуды сформировавшегося соединительнотканного регенерата, так как в эндотелиоцитах сосудов, соседствующих с мышечными волокнами, обнаруживались признаки усиления

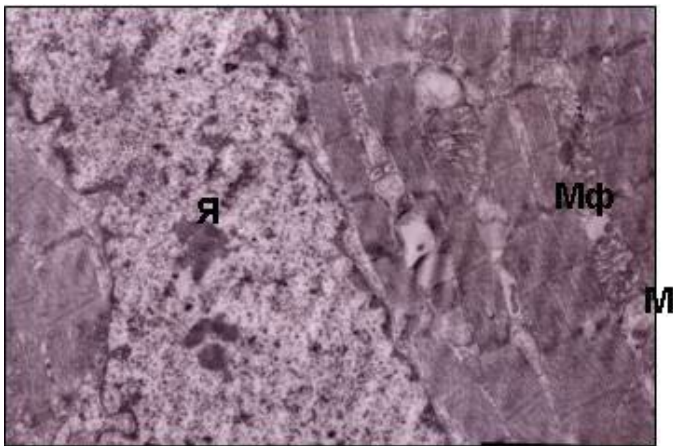


Рис.12 Ультраструктура кардиомиоцита на 60 сутки после введения БМА при остром инфаркте миокарда у кролика. Я – ядро; М – митохондрии; Мф – миофибриллы. Электронная микрофотография. Увел. x19000.

трансэндотелиального обмена в виде наличия в цитоплазме множества пиноцитозных пузырьков. Большой частью кардиомиоциты вокруг регенерата имели структуру, характерную для нормы, хотя у некоторых клеток еще были расширены каналы саркоплазматической сети. Но миофибриллы уже имели правильную архитектуру, а между ними в ряд цепочкой располагались овальные митохондрии с тонкими кристами (рис.12). В конечные сроки эксперимента (90 суток), структура новообразованной соединительной ткани в месте введения в миокард частиц биоматериала отличалась отсутствием грубых пучков коллагеновых волокон, а также относительно большей плотностью сосудистой сети, чем в контрольной группе. Значительную часть образовавшегося регенерата занимали тяжи мышечных волокон (рис.13). На ультраструктурном уровне определялось, что данные мышечные волокна были несколько сжаты заполняющими межпучковые пространства прослойками колла-

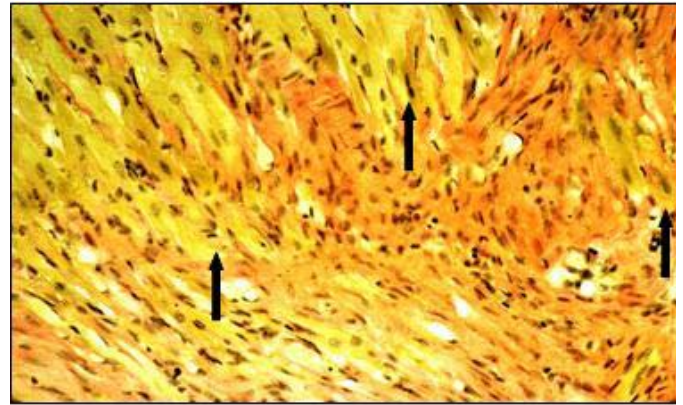


Рис.13 Новообразованная соединительная ткань с прослойками мышечных волокон (↑) на 90 сутки после введения аллогенного биоматериала при остром инфаркте миокарда у кролика. Окраска по методу ван-Гизона. Увел. x400.

геновых волокон. Митохондрии кардиомиоцитов имели также сжатый вид, они были узкими и вытянутыми вдоль пучков миофибрилл. На границе между кардиомиоцитами и регенератом выявлялись капилляры, характерные по строению для сердечной мышцы. В цитоплазме отростков эндотелиоцитов определялось большое количество пиноцитозных пузырьков, свидетельствующих о восстановлении функциональной способности сосудов, т.е. об активном трансэндотелиальном обмене. Кроме того, в цитоплазме эндотелиоцитов выявлялись многочисленные рибосомы.

В конечном итоге, динамика морфологических изменений в постинфарктной зоне миокарда у животных опытной группы характеризовалась развитием двух видов тканей: рыхлой соединительной и мышечной.

Иммуногистохимический анализ количества мезенхимных клеток, экспрессирующих PCNA, показал, что в контрольной группе в начальные сроки эксперимента мезенхимные клетки в ткани обладали более высокой пролиферативной активностью, чем у животных опытной группы. В дальнейшем пролиферативная активность мезенхимных клеток падала, в то время как в опытной группе количество пролиферирующих мезенхимных клеток долгое время держалось примерно на одном уровне. Таким образом, результаты гистологических, электронно-микроскопических, иммуногистохимических, последующих за ними количественных исследований, их подробный анализ подтвердил наши предположения о том, что введение диспергированного аллогенного материала в миокард может повлиять на структуру формирующегося постинфарктного рубца у кроликов в эксперименте.



В целом динамика морфологических изменений в постинфарктной зоне миокарда у животных опытной группы характеризовалась развитием двух видов тканей: васкуляризированной рыхлой соединительной и мышечной, в отличие от животных контрольной группы, у которых в зоне инфаркта сформировался грубо организованный соединительнотканый рубец.

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная острая ишемия миокарда, воспроизведенная путем перевязки передней нисходящей ветви левой коронарной артерии, является адекватной моделью для изучения ремоделирования миокарда при использовании экзогенных стимулирующих факторов.
2. Разработанный способ введения диспергированного аллогенного биоматериала в миокард с целью оценки его эффективности является надежным и безопасным.
3. Интрамиокардиальное введение аллогенного биоматериала сопровождается минимальной воспалительной реакцией, отсутствием инкапсуляции, полным лизисом и резорбцией материала. Диспергированный Аллоплант активизирует макрофаги и мезенхимную клеточную реакцию, усиливает влияние макрофагальных клеток на структуру образующегося регенерата.
4. Низкий уровень TGF- $\beta$ 1 и слабая пролиферативная активность фибробластов обуславливают минимальное развитие фиброза в ишемизированной зоне миокарда, а более высокая пролиферативная активность эндотелиоцитов и наличие групп миоцитоподобных клеток в зоне введения аллогенного биоматериала подтверждают формирование наиболее адекватного регенерата в миокарде.
5. Введение аллогенного материала в ишемизированный миокард животного на поздних сроках улучшает трофику постинфарктного рубца с образованием рыхлой соединительной ткани и не приводит к формированию аневризмы левого желудочка в месте имплантации.
6. Применение аллогенного биоматериала при экспериментальной острой ишемии снижает летальность животных, что открывают перспективы для клинической апробации технологии имплантации биологического материала Аллоплант в лечении инфаркта миокарда.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Андриевских, С.И. Динамика альтеративных, воспалительных и репаративных процессов в миокарде кролика при экспериментальной ишемии / С.И. Андриевских, А.В. Чукичев, Е.Л. Куренков // Материалы региональной научной конференции "Актуальные вопросы морфогенеза и регенерации органов грудной и брюшной полости". - Екатеринбург, 2003. - С.46.
2. Андриевских, С.И. Кардиомиопластика биологическим материалом Аллоплант/ С.И. Андриевских // Сборник рефератов научно-исследовательских работ аспирантов. - Челябинск, 2003. - С. 41.
3. Андриевских, С.И. Применение диспергированного биоматериала Аллоплант для коррекции ишемического повреждения миокарда в эксперименте / С.И. Андриевских // Материалы Всероссийской научной конференции посвященной столетию со дня рождения профессора А.Н. Максименкова "Анатомо-физиологические аспекты современных хирургических технологий". - г. Санкт-Петербург, 2006. - С. 67.
4. Андриевских, С.И. Стимуляция репаративных процессов в поврежденном миокарде с помощью биологического материала Аллоплант в эксперименте / С.И. Андриевских, С.А. Муслимов, А.В. Чукичев// Материалы 1-го Российско-Чешского форума. - Челябинск 2006. - С. 28.
5. Андриевских, С.И. Перспективы регенеративной терапии сердечной патологии в эксперименте / С.И. Андриевских, С.А. Муслимов, А.В. Чукичев // Материалы 2-го Российско-Чешского форума. - Прага 2008. - С. 24.
6. Андриевских, С.И. Применение аллогенного диспергированного биоматериала для стимуляции регенерации миокарда после ишемического повреждения в эксперименте / С.И. Андриевских, С.А. Муслимов, А.В. Чукичев, Л.А. Мусина // Уральский медицинский журнал. - Екатеринбург, 2008. - №2 (42). - С. 91-94.
7. Мулдашев, Э.Р. Применение аллогенного биоматериала для коррекции постинфарктного рубца и регенерации кардиомиоцитов в эксперименте / Э.Р. Мулдашев, С.И. Андриевских, С.А. Муслимов, А.В. Чукичев, Л.А. Мусина// Материалы IV Всероссийского съезда трансплантологов памяти академика В.И. Шумакова. - Москва. - 2008. - С. 265 - 266.