

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.127-005.8

Лебедева А.И.<sup>1,2</sup>, Муслимов С.А.<sup>1,2</sup>, Гареев Е.М.<sup>1</sup>, Попов С.В.<sup>3</sup>, Афанасьев С.А.<sup>3</sup>, Кондратьева Д.С.<sup>3</sup>

## Аллогенный биоматериал – индуктор регенерации ишемически поврежденного миокарда в эксперименте

<sup>1</sup>ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, 450075, Уфа, Россия, ул. Р. Зорге, д. 67/1;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450000, Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3;

<sup>3</sup>ФГБНУ НИИ кардиологии «Томский национальный исследовательский медицинский центр», 634012, Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111а

**Введение.** Современные технологии восстановления поврежденного миокарда после инфаркта недостаточно эффективны и не отвечают требованиям полноценной реабилитации больных. Аллогенный биоматериал является стимулятором регенерации мягких тканей и применяется в различных областях медицины: в хирургии, травматологии, офтальмологии, и др.

**Цель** работы – исследование стимуляции регенерации ишемически поврежденного миокарда с помощью биоматериала Аллоплант (БМА) в эксперименте.

**Методика.** Экспериментальные исследования были проведены на 100 крысах-самцах Вистар массой 0,18 – 0,25 кг. Всем животным была проведена коронароокклюзия путем лигирования коронарной артерии. В опытной группе одновременно с стенозированием сосуда интрамиокардиально в бассейн стенозированной артерии вводили суспензию аллогенного биоматериала в количестве 12 мг в физиологическом растворе. В контрольной группе животным вводили физиологический раствор. Взятие материала для исследования проводили через 3, 7, 14, 30 и 45 сут. В работе использовали гистологические, электронно микроскопические, морфометрические и статистические методы исследования.

**Результаты.** После интрамиокардиального введения БМА в ишемизированный миокард площадь рубца была меньше в 2,74 раза по сравнению с контрольной группой, где биоматериал не применялся. В опытной группе на фоне некротически поврежденных кардиомиоцитов формировался регенерат, состоящий из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Отмечалась высокая степень васкуляризации на протяжении всего эксперимента, частицы БМА фагоцитировались макрофагами, продукты биodeградации БМА способствовали ингибированию фиброгенеза, а БМА оказывал кардиопротекторный эффект и индуцировал клеточную регенерацию в ишемически поврежденном миокарде. В периинфарктной зоне зафиксированы разрозненные малодифференцированные клетки с признаками кардиомиогенной дифференциации, наряду с юными кардиомиоцитами выявлены в большом количестве клетки Аничкова.

**Заключение.** Интрамиокардиальное введение БМА уменьшает площадь рубца при инфаркте. Продукты биodeградации БМА снижают скорость рубцевания, оказывают кардиопротективный эффект и индуцируют клеточную регенерацию ишемически поврежденного миокарда.

**Ключевые слова:** миокард; ишемия; регенерация; интрамиокардиальное введение; аллогенный биоматериал; ангиогенез; ингибирование фиброза; крысы; юные кардиомиоциты

**Для цитирования:** Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Попов С.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Аллогенный биоматериал – индуктор регенерации ишемически поврежденного миокарда в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(1): 60-69.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.60-69

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования; сбор и обработка материала; написание текста – Лебедева А.И.; концепция и дизайн исследования – Муслимов С.А.; сбор и обработка материала – Кондратьева Д.С.; сбор и обработка материала; редактирование – Афанасьев С.А.; статистическая обработка материалов – Гареев Е.М.; редактирование – Попов С.А.

**Для корреспонденции:** Лебедева Анна Ивановна, e-mail: Jeol02@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания: регистрационный номер НИОКР № 056-00110-18-00.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.12.2019

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Lebedeva A.I.<sup>1,2</sup>, Muslimov S.A.<sup>1,2</sup>, Gareev E.M.<sup>1</sup>, Popov S.V.<sup>3</sup>, Afanasiev S.A.<sup>3</sup>, Kondratieva D.S.<sup>3</sup>

## Allogeneic biomaterial as an inductor of regeneration in the myocardium injured by experimental ischemia

<sup>1</sup>Russian Eye and Plastic Surgery Centre, R. Zorge Str. 67/1, Ufa 450075, Russian Federation;

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Lenina Str. 3, Ufa 450000, Russian Federation;

<sup>3</sup>Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Kievskaya Str. 111a, Tomsk 634012, Russian Federation

**Introduction.** Modern technologies for recovery of injured myocardium after a heart attack are not sufficiently effective and do not meet requirements for full rehabilitation of patients. Allogeneic biomaterial is a stimulator of soft tissue regeneration and has been used in various fields of medicine, including surgery, traumatology, ophthalmology, etc.

**The aim** of this work was to study stimulation of regeneration with a biomaterial Alloplast (BMA) in the myocardium injured by experimental ischemia.

**Methods.** This experimental study was conducted on 100 Wistar male rats weighing 0.18-0.25 kg. All animals underwent coronary occlusion by ligation of the coronary artery. In the experimental group, a saline suspension of allogeneic biomaterial (12 mg) was injected intramyocardially into the territory of the stenosed artery simultaneously with the artery ligation. In the control group of animals, a physiological solution was administered. Histological methods used in the study included light-optical microscopy for hematoxylin and eosin staining, Mallory staining, electron microscopy, and morphometry. Hearts were taken for the study at 3, 7, 14, 30, and 45 days.

**Results.** After the BMA intramyocardial injection into the ischemic myocardium, the scar area was 68.5% smaller than in the control group, where the biomaterial was not used. In the experimental myocardium with necrotic cardiomyocytes, an area of regeneration formed, which consisted of loose fibrous connective tissue. Extensive vascularization was observed throughout the experiment. BMA particles were phagocytized by macrophages, and products of BMA biodegradation facilitated fibrogenesis. BMA exerted a cardioprotective effect and induced cell regeneration in the ischemic myocardium. In the periinfarction zone, isolated low-differentiated cells with signs of cardiomyogenic differentiation were observed. Along with young cardiomyocytes, a large amount of Anichkov cells was found.

**Conclusion.** Intramyocardial administration of BMA reduced the scar size in myocardial infarction. Products of BMA biodegradation slowed the scar formation, exerted a cardioprotective effect, and induced cell regeneration in the myocardium injured by ischemia.

**Keywords:** myocardium; ischemia; regeneration; intramyocardial administration; allogeneic biomaterial; angiogenesis; fibrosis inhibition; rats; young cardiomyocytes

**For citation:** Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Popov S.V., Afanasiev S.A., Kondratieva D.S. Allogeneic biomaterial as an inductor of regeneration in the myocardium injured by experimental ischemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 60-69. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.60-69

**For correspondence:** Anna I. Lebedeva, doctor of Biological Sciences, PhD, senior research assistant of the Department of morphology, «Eye and Plastic Surgery Centre» of the Russian Federation Health Ministry, 67/1, Zorge str., Ufa, Russia, 450075; «Bashkir State Medical University» of the Russian Federation Health Ministry, 3, Lenin str., Ufa, Russia, 450000, e-mail: Jeol02@mail.ru

**Contribution:** research concept and design; collection and processing of the material; writing the text – Lebedeva A.I.; research concept and design – Muslimov S.A.; collection and processing of the material – Kondratieva D.S.; collection and processing of the material, editing – Afanasiev S.A.; statistical processing – Gareev E.M., editing – Popov S.A.

**Acknowledgment.** The work was supported by state task: registration number NIOCR № 056-00110-18-00.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

### Information about the authors:

Lebedeva A.I., <https://orcid.org/0000-0002-9170-2600>

Muslimov S.A., <https://orcid.org/0000-0002-9076-0251>

Popov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-9050-4493>

Afanasiev S.A., <https://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

Kondratieva D. S., <https://orcid.org/0000-0002-4004-2497>

Received 24.12.2019

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

До настоящего времени не существует адекватных и эффективных методов стимуляции регенерации миокарда. Клеточный кардиогенный пул сердца существенно ограничен и не может компенсировать зону обширных повреждений миокарда. До сих пор широ-

ко используется метод органной трансплантации. Применение данной манипуляции связано с риском иммунного отторжения органа и ограничивается морально-этическими, религиозными и законодательными аспектами. Менее радикальными являются методы

клеточной терапии, кардиомиопластика стволовыми клетками различного происхождения: фетальными клетками, клетками пуповинной крови, скелетными миоцитами и т.д. [1]. Однако восполнение кардиомиоцитарного пула не может служить полноценным методом восстановления миокарда, так как не решается проблема ремоделирования постинфарктного фиброза. Как правило, формированию рубца в мышечной ткани способствует стремительное накопление стромальных элементов и низкая скорость или отсутствие репликации мышечных клеток [2]. В этом аспекте перспективным представляется применение диспергированного аллогенного биоматериала. Продукты биодеградации биоматериала ингибируют профиброгенную клеточную активность и снижают скорость коллагенообразования, тем самым стимулируют клеточные элементы тканевого ложа [3, 4]. Цель работы – исследование регенеративных возможностей биоматериала Аллоплант (БМА) в ишемически поврежденном миокарде в эксперименте.

### Методика

Экспериментальные исследования с применением биоматериала Аллоплант были проведены на 100 крысах-самцах Вистар 0,18 – 0,25 кг. Все животные были разделены на 2 группы – контрольную ( $n = 50$ ) и опытную ( $n = 50$ ). Моделирование инфаркта миокарда осуществляли путем перевязки г. *interventricularis parvasonalis a. coronarii sin.* левого желудочка наложением шва «викрил» при левосторонней торакотомии под внутримышечным наркозом (раствор зоветила). Сердце выводили за пределы грудной клетки и накладывали лигатуру на коронарную артерию. Рану засыпали антибиотиком и, удалив воздух из грудной полости, послойно зашивали. В опытной группе лигирование артерии сопровождали введением суспензии БМА в бассейн стенозированной артерии в количестве 12 мг. Биоматериал предварительно разводили физиологическим раствором. Объем вводимой суспензии составлял 600 мкл для одного животного. Доза биоматериала взята произвольно. Размер частиц БМА составлял 50–80 мкм. Животных выводили из опыта путем инсуляции летальной дозы паров эфира на 3-и, 7-е, 14-е, 30-е и 45-е сут. На каждый срок исследования использовали по 10 животных. Исследования выполнялись согласно правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Strasburg, 1986), в соответствии с руководством по лабораторным животным

и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [5]. Аллогенный биоматериал разработан в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ г. Уфы. Биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР №87 901-87 от 22.07.1987 г. Для настоящего исследования аллогенный биоматериал был изготовлен из сухожилий крыс, диспергирован. Сердца животных, выведенных из эксперимента подвергали стандартным гистологическим процедурам Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Маллори. Для электронномикроскопического исследования из сердечной ткани вырезали кусочки размером 1–2 мм<sup>3</sup> и обрабатывали по общепринятой методике. Предварительно готовили полутонкие срезы на ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия) и окрашивали их раствором толуидинового синего на 2,5%-ном растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронномикроскопического исследования. Ультратонкие контрастировали 2%-м водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония). Для определения размера постинфарктного рубца миокарда каждое сердце поперечными разрезами делили на 5 секторов. Из них изготавливали гистологические препараты и подвергали морфометрической обработке. Всего было использовано 500 срезов. Индекс площади рубца (ИПР) сердец крыс измеряли на препаратах, окрашенных по Маллори, с использованием программы ITEM (Olympus) следующим образом: отношение площади рубца к площади стенки левого желудочка умножали на 100%. Суммарную площадь просвета капилляров (СППК) измеряли в 20 полях зрения для каждого среза при увеличении  $\times 200$ .

Анализ изменений параметров СППК и ИПР был проведен с применением непараметрических (ранговых) методов – однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллесу и сравнения некоррелированных выборок по критерию Манна-Уитни [6]. Значения выражали в виде медианы и квартилей (Q25% и Q75%). Все расчеты производили в пакете прикладных программ Statistica 6.

### Результаты

Через 3 сут после проведенной коронароокклюзии как в опытной, так и в контрольной группах выявлялись признаки ишемического повреждения миокарда в виде крупноочагового трансмурального некроза мышечной стенки левого желудочка. В кардиомиоцитах

выявлялись признаки восковидного некроза, зернистой дистрофии, утрата клетками поперечной исчерченности, пикноз ядер (**рис. 1, а**). В строме перифокальной области наблюдались признаки отека, очаги кровоизлияний, геморрагическое пропитывание. Демаркационная зона была представлена клетками воспалительного экссудата – нейтрофилами, макрофагами, лимфоцитами. В кровеносных сосудах отмечалось краевое стояние и эмиграция лейкоцитов. Кардиомиоциты субэндокардиальной и субэпикардиальной зон подвергались лизису и фагоцитозу макрофагами, формировавшими клеточный вал. В миокарде левого желудочка после окклюзии коронарной артерии определялись признаки коагуляционного некроза. Признаки формирования рубца на данном сроке отсутствовали.

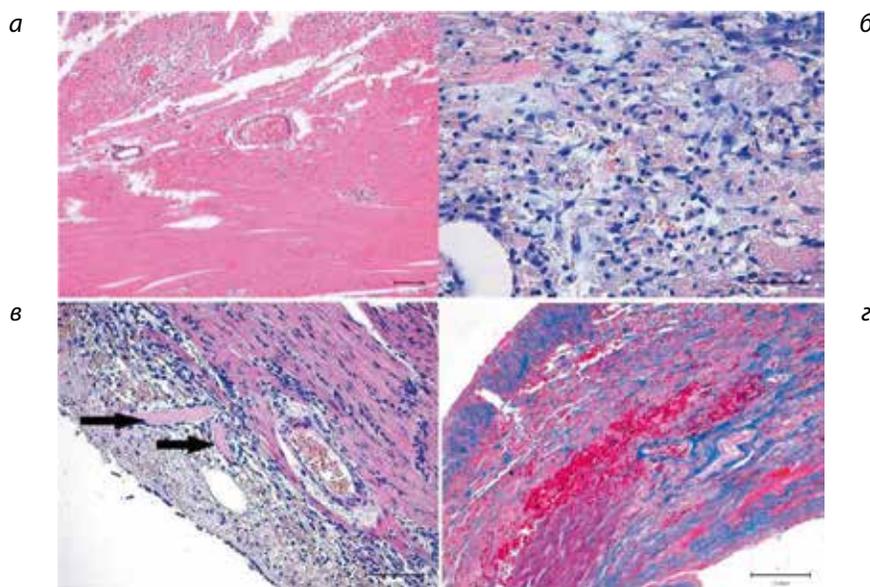
В опытной группе через 3-е сут после коронароокклюзии и применения БМА зона некроза была ограничена от неповрежденного миокарда клеточным валом, представлявшем демаркационную зону. На месте ишемически поврежденных кардиомиоцитов выявлялись признаки формирования грануляционной ткани. Определялись тонкие коллагеновые волокна, инфильтрированные макрофагами, мезенхимными клетками и юными фибробластами. Сеть тонких новообразованных гемокапилляров со свободными просветами пронизывала провизорную ткань (**рис. 1, б**). Частицы аллогенного биоматериала были окружены макрофагальными клетками, признаки активной иммунной

реакции отсутствовали (**рис. 1, в**). Признаков формирования рубца через 3-е сут после введения аллогенного биоматериала также не наблюдалось.

Таким образом, после введения аллогенного биоматериала через 3-е сут после лигирования коронарной артерии острая фаза воспалительной реакции (альтерация, экссудация) трансформировалась в пролиферативную стадию – начиналось замещение грануляционной тканью с привлечением клеток фибробластического ряда, что указывало на более раннее начало процесса заживления. Признаки ишемического повреждения миокарда сохранялись как в контрольной, так и в опытной группах.

Через 7 сут в контрольной группе на месте поврежденных кардиомиоцитов выявлялась волокнистая соединительная ткань в виде плотных параллельных пучков коллагеновых волокон. Фрагменты некротизированных сердечных мышечных волокон на данном сроке продолжали визуализироваться (**рис. 1, г**). Клеточная инфильтрация сохраняла признаки воспалительного экссудата, отмечались признаки разрушения кровеносных сосудов и прогрессирования ишемии. Развивающаяся ткань отличалась высокой клеточной плотностью, с низким содержанием кровеносных сосудов. Интерстициальные пространства были сужены.

После применения БМА спустя 7 сут частицы введенного аллогенного биоматериала не визуализировались вследствие их фагоцитоза макрофагами. Вокруг сохранившихся некротизированных сердечных мышеч-



**Рис. 1.** Ишемическая дистрофия миокарда. а – тромбоз кровеносных сосудов через 3 сут после коронароокклюзии крысы,  $\times 100$ . б – формирование грануляционной ткани, инфильтрация макрофагами, мезенхимными клетками, фибробластами в миокарде крысы через 3 сут после коронароокклюзии и введения БМА,  $\times 400$ . в – инфильтрация макрофагами частиц БМА ( $\uparrow$ ). Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ . г – замещение поврежденных кардиомиоцитов плотной волокнистой соединительной тканью через 7 сут после коронароокклюзии. Окраска по Маллори,  $\times 200$ .

ных волокон формировалась грануляционная ткань, представленная коллагеновыми волокнами и соединительнотканью клетками различных популяций. Определялась макрофагально – фибробластическая и лимфоцитарная инфильтрация. В регенерате определялись тяжи эндотелиальных клеток – почки роста и сформированные гемокapилляры с свободными, расширенными просветами. Возле кровеносных сосудов определялись группы разрозненных кардиомиоцитов, вероятно сохранившихся. Цитоплазма клеток имела эозинофильную гомогенную окраску, ядра, с хорошо развитым ядрышковым аппаратом, имели округлую форму с четкой кариолеммой (рис. 2, а). В перинфарктной зоне на границе соединительнотканного регенерата и сердечной мышечной ткани наблюдались клетки с характерными для клеток Аничкова ядрами. Ядерный гетерохроматин этих клеток был конденсирован в виде «гусеницы» при продольном сечении и «глаза филина» при поперечном. В перинфарктной зоне при окраске по Маллори определялись тонкие хаотично расположенные коллагеновые волокна.

Через 7 сут после начала эксперимента волокнистая соединительная ткань, замещавшая некротизированные мышечные волокна в контроле и опыте имела различные морфологические характеристики: в контрольной группе она была плотной аваскулярной волокнистой оформленной соединительной тканью, а после применения аллогенного биоматериала – рыхлой, обильно васкуляризированной неоформленной волокнистой соединительной тканью.

Через 14 сут продолжали происходить гистопластические процессы. Некротическая масса разрушенных мышечных волокон значительно уменьшалась в объеме за счет фагоцитоза макрофагами. В контрольной группе вокруг детрита выявлялась инфильтрация различными макрофагальными клетками: фагоцитами, эпителиоидными клетками, гигантскими клетками инородных тел и клетками Пирогова – Лангханса в присутствии лимфоцитов. Происходили реакции гиперчувствительности замедленного типа, сопровождающиеся разрастанием плотной волокнистой соединительной тканью – рубцом. Макрофагальная реакция постепенно менялась на фибробластическую. Происходило накопление коллагеновых волокон, которые представляли собой плотный стромально-клеточный массив. Сердечные мышечные волокна со стороны интактного миокарда перинфарктной зоны ограничивались плотной волокнистой соединительной тканью. Культы сердечных мышечных волокон «запечатывались» коллагеновыми волокнами. В данном сроке происходило формирование грубоволокнистого руб-

ца и образование аневризмы за счет высокой гидродинамической нагрузки. После применения аллогенного биоматериала спустя 14 сут в центральной зоне инфарктированного участка сердечной мышцы – левого желудочка на месте утраченной мышцы развивалась рыхлая волокнистая соединительная ткань. Тонкие, коллагеновые волокна имели неупорядоченное разновекторное расположение с расширенными свободными межволоконными промежутками. Волокна были инфильтрированы макрофагами, фибробластами, лимфоцитами. Была развита обильная сеть кровеносных сосудов. Эндотелиоциты имели уплощенную форму, просветы сосудов расширенные, свободные, в некоторых из них определялись форменные элементы крови. Кровеносные сосуды были новообразованные, не дифференцированные, относились к капиллярному типу (рис. 2, б). В перинфарктной зоне возле сохранившихся зрелых кардиомиоцитов обнаруживалась инфильтрация малодифференцированными клетками. Также, наблюдались массивные скопления клеток Аничкова. Грубоволокнистых пучков коллагеновых волокон не было обнаружено, кровеносные сосуды присутствовали в большом количестве (рис. 2, в).

Спустя 30 сут после начала эксперимента в контрольной группе поврежденный миокард замещался рубцом, как в центральной, так и в перинфарктной зонах. В перинфарктной зоне происходило формирование плотных прослоек коллагеновых волокон в межмышечных пространствах и «запечатывание» сердечных мышечных волокон. Выявлялись преимущественно фибробласты и фиброциты. В центральном районе инфарктной зоны происходило формирование плотного аваскулярного рубца, состоящего из плотной оформленной волокнистой соединительной ткани с наличием фиброцитов, фибробластов и миофибробластов в большом количестве. Коронарных кровеносных сосудов было мало, что позволяло судить о продолжающейся гипоксии в тканях.

Через 30 сут после применения БМА гистопластические процессы активно протекали в данном сроке. Регенерат характеризовался клеточным гетероморфизмом, как в перинфарктной зоне, так и в центральном районе ишемизированного миокарда левого желудочка. В центральной зоне наблюдалась макрофагально – фибробластическая, лимфоидная инфильтрация и признаки формирования рыхлой волокнистой соединительной ткани с большим количеством новообразованных тонкостенных недифференцированных кровеносных сосудов. В перинфарктной зоне определялся соединительнотканно-мышечный регенерат, представленный мышечными волокнами, единичными мышеч-

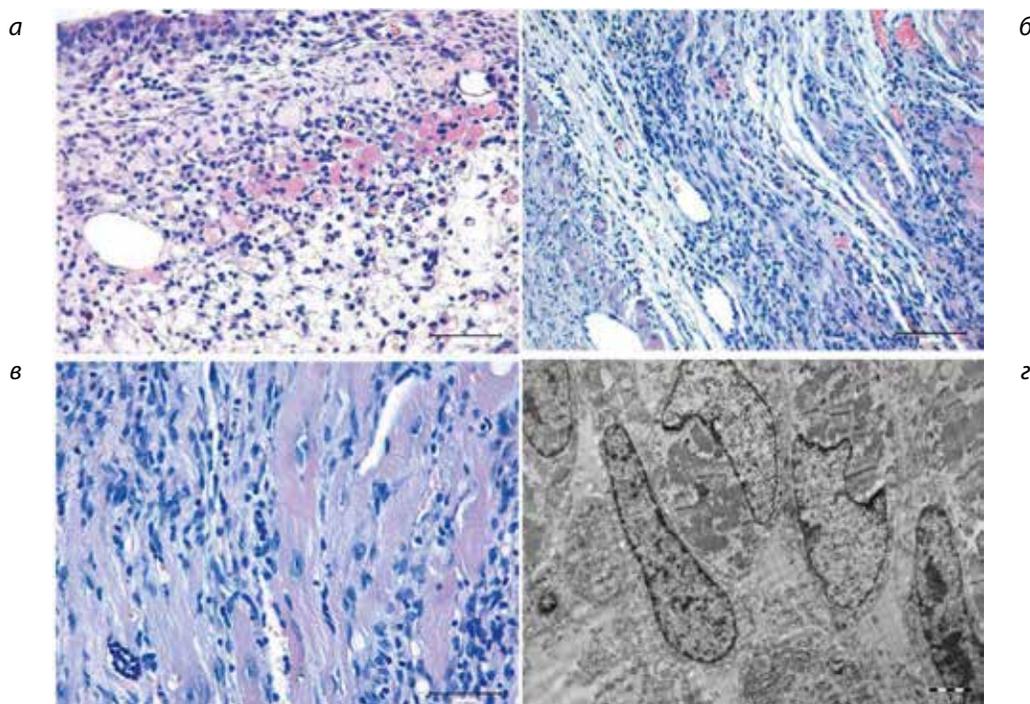
ными клетками с характерными ядрами Аничкова и невысокой долей соединительнотканых клеток – фибробластов. На электронномикроскопическом уровне данная зона была зафиксирована. Ультраструктурный анализ показал, что изучаемые клетки были кардиомиогенные и классифицировались как юные кардиомиоциты. Ядерно-цитоплазматическое отношение было  $\geq 1$  в сторону ядра. Крупные овальные ядра содержали эухроматин. В цитоплазме определялись рибосомы и гранулы гликогена в большом количестве, разрозненные единичные тонкие и толстые миофиламенты, собранные в саркомеры короткие миофибриллы в различной степени дифференциации. Между клетками вставочных дисков не наблюдалось (рис. 2, г).

При анализе степени васкуляризации периинфарктной зоны выявлено, что в контрольной группе изменения СППК на протяжении эксперимента в целом оказались статистически незначимы ( $\chi^2=6,6$ ;  $p>0,08$ ), однако сравнение по критерию Манна-Уитни показало, что значения СППК на 14-е сут значимо ( $p<0,01$ ) меньше, чем в прочие сроки наблюдения, различия между которыми, в свою очередь, статистически незначимы ( $p>0,35$  -  $p>0,87$ ). В опытной группе зависимость уровня СППК от сроков наблюдения оказалась статистиче-

ски значимой ( $\chi^2=10,8$ ;  $p<0,02$ ) за счет того, что, начиная с 7-х сут уровень СППК значимо ( $p<0,001$ ) снижался. Межгрупповые сравнения показали, что в опытной группе уровень СППК на всех сроках наблюдения оказался значимо икратно выше, чем в контрольной. Через 3 сут в опытной группе медиана распределения составляла  $1074 \text{ мкм}^2$  ( $75\% >780 \text{ мкм}^2$ ) против  $306 \text{ мкм}^2$  ( $75\% <620 \text{ мкм}^2$ ) в контрольной, через 7 сут -  $506 \text{ мкм}^2$  ( $75\% <800 \text{ мкм}^2$ ) против  $201 \text{ мкм}^2$  ( $75\% <350 \text{ мкм}^2$ ), через 14 сут -  $453 \text{ мкм}^2$  ( $75\% <700 \text{ мкм}^2$ ) против  $120 \text{ мкм}^2$  ( $75\% <160 \text{ мкм}^2$ ), спустя 30 сут -  $471 \text{ мкм}^2$  ( $75\% <850 \text{ мкм}^2$ ) против  $212 \text{ мкм}^2$  ( $75\% <420 \text{ мкм}^2$ ) (рис. 3).

В результате исследования, спустя 45 сут в контрольной группе выявлялся сформированный аваскулярный рубец. Между грубыми коллагеновыми волокнами определялись деструктивно измененные сердечные мышечные волокна. В период 30–45 сут в контрольной группе наблюдались признаки вторичной волны некроза. Она вызывала увеличение зоны некроза за счет механического сдавливания сердечных мышечных волокон окружающей ткани грубыми, толстыми пучками коллагеновых волокон.

После применения БМА через 45 сут регенерат характеризовался высокой клеточной плотностью, как в



**Рис. 2.** Миокард после коронароокклюзии и введения БМА. а-сохранившиеся кардиомиоциты в периваскулярной зоне через 7 сут.  $\times 200$ . б – разрастание рыхлой, васкуляризированной волокнистой соединительной ткани через 14 сут.  $\times 200$ . в – скопление малодифференцированных клеток и клеток Аничкова в перифокальной зоне через 14 сут. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$ . з - кардиомиобласты и юные кардиомиоциты в периинфарктной зоне через 30 сут. Электронोगрамма.  $\times 5000$ .

центральной зоне поврежденного миокарда, так и в периферической. В центральной зоне преобладала волокнистая соединительная ткань, интенсивно инфильтрированная фибробластами, макрофагами, клетками Аничкова. Данная область была обильно васкуляризирована. Периинфарктная зона представляла собой соединительнотканно-мышечный регенерат, в котором продолжали происходить гистопластические процессы замещения. Это выражалось в наличии скоплений клеток Аничкова на фоне рыхлой волокнистой соединительной ткани, а также малодифференцированных кардиомиоцитарных клеток с разновекторным направлением, еще не образующих плотных клеточных контактов — десмосом.

На рис. 4 представлены поперечные срезы сердец контрольной и опытной групп в различные сроки исследования.

В контрольной группе ИПР статистически значимо не зависел от сроков наблюдения ( $\chi^2=6,3$ ,  $p>0,09$ ). Однако через 30 сут ИПР оказались значимо меньше, чем через 7-14 сут после начала эксперимента ( $p<0,02$  и  $p<0,005$  соответственно). Через 45 сут не было значимых отличий от всех предшествующих сроков наблюдения ( $p>0,45$ ). Медианы распределения ИПР в контрольной группе на всем протяжении наблюдений имели значения не ниже 20%. После применения БМА значения ИПР также незначимо зависели от сроков наблюдения ( $\chi^2=5,7$ ,  $p>0,12$ ).

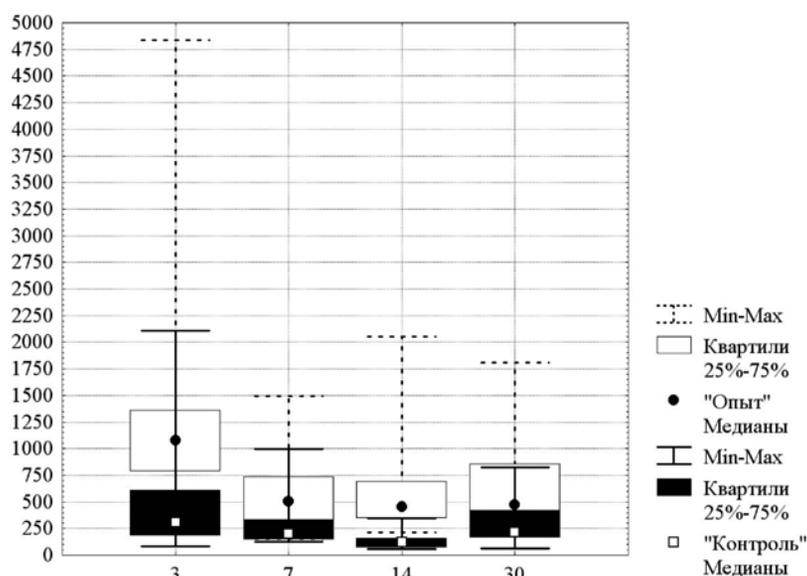


Рис. 3. Изменения СПК реактивной зоны в контрольной и опытной группах. По оси абсцисс – «сут». По оси ординат – СПК (мкм²). ГДИ – границы доверительных интервалов для средних значений площади,  $\pm$ СО – стандартная ошибка среднего значения.

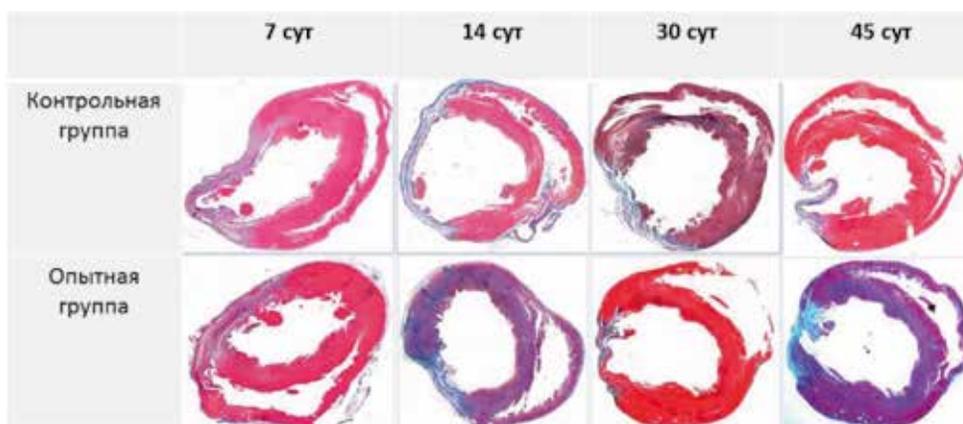


Рис. 4. Поперечные срезы миокарда. Окраска по Маллори.  $\times 40$ .

Однако, значения этого параметра постепенно снижались от начала к концу наблюдений. Медиана распределения через 7 сут составляли 22,7%, на 14-е сут значительно снижалась до 13,4% ( $p < 0,02$ ), а на 30-й и 45-й до 16% и 5,2%. ( $p > 0,14$  и  $p < 0,02$  соответственно). Выявлено, что нулевые значения ИПР имели место уже на 7-е сут после коронароокклюзии. Межгрупповые сравнения по срокам наблюдений показали также, что в опытной группе ИПР статистически значимо был меньше, чем в контроле ( $p = 0,01 - < 0,0001$ ). На 45-е сут медиана распределения значений ИПР в опытной группе оказалась в 2,74 ниже, чем в контрольной группе, причем в опытной группе 50% значений ИПР оказались не ниже 5,3%, а в контрольной 75% значений выше 18%, т.е. в опытной группе имело место перераспределение площади рубца в область более низких значений (рис. 5).

### Обсуждение

Использованная модель воспроизведения острой ишемии миокарда путем перевязки передней нисходящей артерии соответствует практическим ситуациям и последующим структурным изменениям миокарда. Лигирование коронарного сосуда привело к выраженным ишемическим повреждениям в ткани необратимого характера. Патоморфологическая картина контрольной группы характеризовалась признаками развития выраженного коагуляционного некроза. В зоне ишемии происходили гистопластические процессы, заканчивающиеся развитием трансмурального инфаркта миокарда с формированием рубца и аневризмы. Аневризма

формировалась во всех экспериментальных группах, что позволяло использовать стандартизированные методы морфометрического исследования. А в опытной группе в стадии острой ишемии миокарда частицы трансплантата вызывали слабо выраженную реакцию окружающих тканей, выражающуюся в инфильтрации небольшим количеством макрофагов. Гигантских форм макрофагальных клеток не обнаруживалось. Частицы БМА полностью резорбировались и спустя 7 сут на светооптическом уровне не определялись. Тем не менее, исходя из морфологических данных выявлено, что БМА оказывает положительное влияние на заживление постишемического инфаркта миокарда и достоверно снижает объем рубца. Этому способствует ряд причин, направленных на оптимизацию процесса заживления и течение воспалительного ответа. В сроке 3 сут рубец в опытной и контрольной группе еще не сформировался и выявлялись признаки острого воспаления. Спустя 7 сут некротизированные мышечные волокна замещались волокнистой соединительной тканью и при окраске по Маллори хорошо визуализировались для измерения.

В контрольной группе площадь повреждения миокарда, зафиксированная в ранние сроки существенно не отличалась от конечных сроков наблюдения. Следовательно, вся некротически измененная сердечная мышца замещалась плотным аваскулярным рубцом с образованием аневризмы без признаков замещения органотипичным регенератом (рис. 4). В период 30–45 сут наблюдалось прогрессирование повреждения органа за счет вторичной волны некроза и расширения зоны рубца.

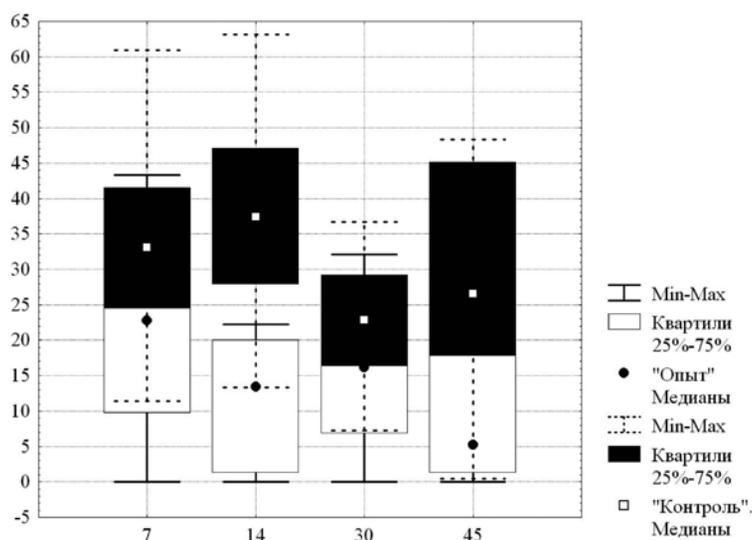


Рис. 5. Изменения ИПР в контрольной и в опытной группах.

По оси абсцисс – сроки наблюдения (сутки). По оси ординат ИПР (%).

После применения БМА процессы замещения некротизированной сердечной мышцы происходили более пролонгировано. Несмотря на раннюю манифестацию фибробластических клеток (7 сут) и начала пролиферативной фазы воспаления, по истечении 45 сут гистопластические процессы в тканях продолжались, что сопровождалось выраженной клеточной гетероморфией. Заживление происходило так же, как и в контрольной группе: ишемия кардиомиоцитов – некроз – острое воспаление – пролиферативное воспаление – замещение волокнистой соединительной тканью. Отличия опытной и контрольной групп состояло в различной площади и качестве рубца. В условиях применения БМА отмечалось формирование регенерата, состоящего из рыхлой соединительной ткани с высокой долей кровеносных сосудов. Исходя из полученных данных, представленных на **рис. 3** можно заключить, что уровень ангиогенеза в несколько раз превышал значения контрольной группы и удерживался на всем протяжении постишемического ремоделирования миокарда.

Известно, что продукты биодеградации БМА ингибируют миграцию фибробластических клеток и их активность в зоне замещения на клеточном и цитокиновом уровнях, которое осуществляется опосредованно через макрофагальное звено [7, 8]. Выявлено, что значения ИПР постепенно снижались в процессе наблюдения. ИПР в опытной группе был в 2,74 раза ниже по сравнению с контрольной, следовательно, происходило замещение зоны повреждения сердечной мышечной тканью. А также, продукты биодеградации БМА, вероятно, способствовали кардиопротекторному эффекту. Через 14 сут в опытной группе было зафиксировано появление большого количества клеток Аничкова в периваскулярном пространстве, а также в составе эндотелиальной выстилки кровеносных сосудов – интрамурально. Идентичная локализация была и у перипитов. Сам Аничков Н.Н. причислял выявленные им клетки к миогенным, однако независимые исследования не смогли это подтвердить [9, 10]. Известно, конфигурацию хроматина, характерную для клеток Аничкова, могут приобретать ядра различных типов клеток, независимо от их тканевой принадлежности и участия в процессах репарации [11]. Через 30, 45 сут в опытной группе наблюдалось наличие массивных инфильтратов клетками Аничкова в перипитной зоне. Не отрицается их влияние на кардиомиогенез в качестве клеточных источников в регенерации миокарда, что подтверждает данное исследование. Эти результаты согласуются с мнением Банина В.В. (2017) о причислении перипитов к мезенхимальным стволовым клеткам [12]. Строение ядра отражает, по-видимому, функциональное состоя-

ние клетки, поэтому многие исследователи советуют, что более правильно было бы употреблять термин «ядра Аничкова» [13, 14]. Признано, что подобное строение ядра является свидетельством недифференцированного состояния клетки [14]. В данном исследовании в зоне регенерации электронномикроскопически показано, что наряду с юными кардиомиоцитами присутствуют и клетки с «ядрами Аничкова». По мере накопления миофибрилл в цитоплазме, в ядре гетерохроматин трансформировался в эухроматин. То-есть, ядерный гетерохроматин терял черты изрезанности (гусеницы/глаза филина) и становился равномерно распределенным в кариоплазме, что могло способствовать активации биосинтетических процессов в клетке, направленных на производство сократительных элементов. Выявленные на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях кардиомиогенные клетки находились в различной степени дифференциации. Вероятность их участия в миогенезе высокая. Несмотря на то, что БМА был имплантирован по всей площади левого желудочка и интрамиокардиально, регенерация миокарда происходила только в перипитной зоне, а не в центральном районе ишемизированной мышцы. Малодифференцированные кардиомиоциты также присутствовали в районах, граничащих с сохранившимся миокардом. В центральной зоне ишемически поврежденной мышечной стенки левого желудочка явлений кардиомиогенеза зафиксировано не было. Следовательно, прогениторные миогенные клетки только в присутствии предсуществующих мышечных волокон становились на путь миогенеза. Поэтому основным стимулирующим агентом явилось миогенное окружение – морфогенетическое поле (экзосомы, микро-РНК и т.д.).

### Выводы

После интрамиокардиального введения БМА в количестве 12 мг/крыса в ишемизированный миокард площадь рубца была ниже в 2,74 раза по сравнению с контрольной группой, где биоматериал не применялся. В опытной группе формировался регенерат, представленный рыхлой соединительной тканью с высокой степенью васкуляризации. Продукты биодеградации БМА снижали скорость рубцевания, оказывали кардиопротективный эффект и индуцировали клеточную регенерацию ишемически поврежденного миокарда.

### Литература

(п.п. 4; 9; 10; 13-15 см. References)

1. Деев Р.В. Отечественный опыт изучения эффективности метода «клеточной кардиомиопластики» в эксперименте. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2005; 1(1): 17–8.

2. Непомнящих Л.М. *Патологическая анатомия и ультраструктура сердца: Комплексное морфологическое исследование общепатологического процесса в миокарде*. Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение; 1981.
3. Лебедева А.И. Аллогенный губчатый биоматериал – ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани. *Российский биотерапевтический журнал*. 2014; 13(4): 37-44.
5. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева М. Профиль-2с. 2010.
6. Реброва О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*. М: МедиаСфера. 2002.
7. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Гареев Е.М. Роль макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной биоматериалом Аллоплант. *Биомедицина*. 2014; 2: 43-50.
8. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Шербаков Д.А. Морфологические особенности макрофагов и их цитокинового профиля в регенерации скелетной мышечной ткани при пластике аллогенным губчатым биоматериалом. *Цитокины и воспаление*. 2015; 14(1): 27-33.
11. Большакова Г.Б. Особенности появления клеток Аничкова в миокарде. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1984; 97(3): 358-60.
12. Банин В.В. Перicyты – это стволовые клетки мезенхимально происхождения. *Морфология*. 2017; 3: 58.
3. Lebedeva A.I. Allogeneic spongiform biomaterial – fibrosis inhibitor of the damaged skeletal muscular tissue. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal*. 2014; 13(4): 37-44. (in Russian)
4. Muldashev E.R., Muslimov S.A., Musina L.A. et al. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell Tissue Bank*. 2005; 6(2): 99-107.
5. *Guidance on laboratory animals and alternative models in biomedical research Rukovodstvo po laboratornym zhitotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh* / Ed. N.N. Karkishchenko, S.V. Gracheva. Moscow: Profil'-2s. 2010. (in Russian)
6. Rebrova O.Y. *Statistical analysis of medical data. Application software package STATISTICA*. Moscow: [MediaSfera. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA. Moscow: MediaSfera. 2002. (in Russian)
7. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Musina L.A., Gareev E.M. The role of macrophages in the regeneration of skeletal muscle tissue laboratory animals, induced by the Alloplant biomaterial. *Biomeditsina*. 2014; 2: 43-50. (in Russian)
8. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Shcherbakov D.A. Morphological characteristics of macrophages and their cytokine profile in the regeneration of skeletal muscle plastic surgery allogenic spongy biomaterial. *Tsitokiny i Vospaleniye*. 2015; 14(1): 27-33. (in Russian)
9. Anitschkow N. Experimentelle Untersuchungen iuber die Neubildung des Granulationsgewebes im Herzmuskel. *Beiträge zur Pathologie*. 1912; 13(55): 373-415.
10. Anitschkow N. Über die Rückbildungsvorgänge bei der experimentellen Atherosklerose. *Verb. Dtsch. path. Ges.* 1928; 23: 473-8.
11. Bolshakova G.B. Features of the appearance of the Anichkov cells in the myocardium. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 1984; 97(3): 358-60. (in Russian)
12. Banin V.V. Pericytes – these are stem cells of mesenchymal origin. *Morfologiya*. 2017; 3: 58. (in Russian)
13. Pienaar J.G., Price H.M. Ultrastructure and origin of the Anitschkow cell. *Am J Pathol*. 1967; 51(6): 1063-91.
14. Molina C.P., Schnadig V.J. Anitschkow nuclear changes in postmortem pericardial scrapings. *Acta Cytol*. 2001; 45(2): 197-200.
15. Stehbens W.E., Zuccollo J.M. Anitschkow myocytes or cardiac histiocytes in human hearts. *Pathology*. 1999; 31(2): 98-101.

## References

1. Deev R.V. Domestic experience of studying the effectiveness of the method of “cellular cardiomyoplasty” in the experiment. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2005; 1(1): 17-8. (in Russian)
2. Nepomnyashchikh L.M. *Pathological anatomy and ultrastructure of the heart: a Comprehensive morphological study of General pathological process in the myocardium. [Patologicheskaya anatomiya i ultrastruktura serdtsa: Kompleksnoye morfologicheskoye issledovanie obshchepatologicheskogo protsessa v miokarde*. Novosibirsk: Nauka. Sibirskoe otdelenie. 1981. (in Russian)

## Сведения об авторах:

**Лебедева Анна Ивановна**, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. отдела морфологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России; доцент каф. анатомии, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: Jeol02@mail.ru;

**Муслимов Сагит Асхатович**, доктор мед. наук, вед. науч. сотр., зав. отделом морфологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России; доцент каф. анатомии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: msagit@mail.ru;

**Гареев Евгений Мусинович**, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр. лаб. нейрофизиологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России; Уфа, e-mail: gem46@list.ru;

**Попов Сергей Валентинович**, акад. РАН, заслуженный деятель науки РФ, директор ФГБНУ НИИ кардиологии «Томский НИМЦ», e-mail: psv@cardio-tomsk.ru;

**Афанасьев Сергей Александрович**, доктор мед. наук, зав. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики ФГБНУ НИИ кардиологии «Томский НИМЦ», e-mail: cardio@cardio-tomsk.ru;

**Кондратова Дина Степановна**, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики ФГБНУ НИИ кардиологии «Томский НИМЦ», e-mail: dina@cardio-tomsk.ru