

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-3-156-166

ЭФФЕКТ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АЛЛОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛА НА УРОВЕНЬ АНГИОГЕНЕЗА И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ПОСТИШЕМИЧЕСКОГО РУБЦА У КРЫС

А.И. Лебедева¹, С.А. Муслимов¹, Л.А. Мусина¹, Е.М. Гареев¹, Р.З. Кадыров¹,
Д.С. Кондратьева², С.А. Афанасьев², С.В. Попов²

¹ ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, Уфа, Российская Федерация

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра», Томск, Российская Федерация

Проблемы нивелирования рубца, стимуляция ангиогенеза и кардиомиогенеза при инфаркте миокарда не теряют своей актуальности, несмотря на многообразие существующих методов. Одним из способов их коррекции предлагается интрамиокардиальная имплантация суспензии децеллюляризованного биоматериала (ДЦБМ), изготовленного из волокнистых соединительно-тканых образований аллогенного происхождения. ДЦБМ служит ингибитором фибронеогенеза в различных тканях с хроническими воспалительными процессами. В отношении острого инфаркта миокарда исследования не проводились. **Цель.** Оценка динамики численности bFGF-1 позитивных клеток, макрофагов CD 68, степени ангиогенеза в условиях применения ДЦБМ при формировании постинфарктного рубца в эксперименте. **Материалы и методы.** Экспериментальные исследования были проведены на 100 крысах-самцах породы Вистар массой 0,18–0,25 кг. Всем животным проведено лигирование коронарной артерии. В опытной группе интрамиокардиально вводили суспензию ДЦБМ (12 мг). В работе использовали гистологические, электронно-микроскопические, иммуногистохимические (CD 68, bFGF-1), морфометрические и статистические методы исследования. Забор сердец проводили через 3, 7, 14, 30, 45 суток. **Результаты.** Использование аллогенного биоматериала сразу после стенозирования коронарной артерии позволяет более чем в 2 раза уменьшить площадь рубцового перерождения миокарда за счет ускорения течения воспалительного ответа и наступления ранней пролиферативной фазы. В реактивной зоне после имплантации ДЦБМ значительно снижалась инфильтрация миокарда макрофагами по сравнению с контрольной группой. Использование ДЦБМ обеспечивало значительное преобладание bFGF-1⁺-клеток в начальный период воспаления (3–14 суток). В последующем (14–45 суток) экспрессия фиброкина становилась в разы меньше, что соответствовало биодеградации и резорбции биоматериала. В контрольной же группе в период острой фазы воспаления (3–14 суток) уровень bFGF-1⁺-клеток был низким, а в последующем (14–45 суток) экспрессия цитокина значительно увеличивалась, что вызывало стремительное накопление коллагеновых волокон и рубцевание. В процессе формирования постинфарктного регенерата в эксперименте ДЦБМ стимулировал ангиогенез, уровень которого превышал показатели контрольной группы в три раза. Отмечено, что биоматериал служил регулятором баланса неофибриллогенеза-фиброклазии в ткани. **Заключение.** Одним из направлений стратегии терапевтической коррекции при ишемических повреждениях миокарда следует указать ингибирование миграции макрофагов и подавление их провоспалительной направленности. В качестве такой альтернативы может являться аллогенный децеллюляризованный биоматериал, изготовленный из экстраклеточного матрикса, примененный в острой фазе воспаления миокарда.

Ключевые слова: миокард, аллогенный биоматериал, регенерация, bFGF, макрофаги.

Для корреспонденции: Лебедева Анна Ивановна. Адрес: 450075, Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1.
Тел. (347) 293-42-35. E-mail: Jeol02@mail.ru

Corresponding author: Anna Lebedeva. Address: 67/1, R. Zorge str., Ufa, 450075, Russian Federation.
Phone: (347) 293-42-35. E-mail: Jeol02@mail.ru

EFFECT OF INTRAMYOCARDIAL ALLOGENIC BIOMATERIAL INJECTION ON ANGIOGENESIS AND POSTISCHEMIC SCAR REMODELING IN RATS

A.I. Lebedeva¹, S.A. Muslimov¹, L.A. Musina¹, E.M. Gareev¹, R.Z. Kadyrov¹,
D.S. Condratyeva², S.A. Afanasiev², S.V. Popov²

¹ All-Russian Center for Eye and Plastic Surgery, Ufa, Russian Federation

² Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

Scar smoothing out, angiogenesis stimulation and cardiomyogenesis in myocardial infarction still remain pressing issues despite the variety of existing methods. One of the ways to correct them is intramyocardial implantation of an alloplant biomaterial (ABM) suspension. ABM serves as an inhibitor of fibronogenesis in various tissues with chronic inflammatory processes. No studies have been carried out with regards to acute myocardial infarction. **Objective:** to assess the dynamics of the number of bFGF-1⁺ cells and CD68 macrophages, the degree of angiogenesis amidst the use of ABM in the formation of postinfarction scar in the experiment. **Materials and methods.** Experimental studies were performed on 100 male Wistar rats weighing 0.18–0.25 kg. Coronary artery ligation was performed on all animals. In the experimental group, the ABM suspension (12 mg) was injected intramyocardially. We used histological, electron microscopic, immunohistochemical (CD68, bFGF-1), morphometric and statistical research methods. Hearts were procured at day 3, 7, 14, 30, and 45. **Results.** The use of an allogeneic biomaterial immediately after coronary artery stenosis could reduce the area of cicatricial myocardial degeneration by two fold by accelerating inflammatory response and the onset of early proliferative phase. In the reactive zone after ABM implantation, macrophage myocardial infiltration significantly decreased in comparison to the control group. The use of ABM ensures significant predominance of bFGF-1⁺ cells in the initial period of inflammation (3–14 days). Subsequently (14–45 days), inflammatory cytokine expression became several times less, which corresponded to biodegradation and resorption of the biomaterial. In the control group, during the acute phase of inflammation (3–14 days), bFGF-1⁺ cells were low in number. Subsequently (14–45 days), cytokine expression increased significantly, causing rapid accumulation of collagen fibers and scarring. In myocardial regeneration after a heart attack in the experiment, ABM stimulated angiogenesis, whose level was three times higher than in the control group. It was noted that ABM serves as a regulator of the neofibrillogenesis-fibroclasia balance in tissue. **Conclusion.** Macrophage migration inhibition and suppression of pro-inflammatory orientation of macrophages should be indicated as one of the directions of therapeutic correction strategy for ischemic myocardial injuries. Alloplant biomaterial used in the acute phase of myocardial inflammation can serve as such alternative.

Keywords: myocardium, allogeneic biomaterial, regeneration, bFGF, macrophages.

Проблема нивелирования рубца, стимуляция ангиогенеза и кардиомиогенеза при инфаркте миокарда остается актуальной по сей день. Такие методы регенеративной медицины, как генные, клеточные технологии, наряду с неоспоримыми достоинствами имеют и определенные недостатки. Введение генных конструкций в миокард приводит к ангиогенезу и ограничению рубца. Однако внедрение плазмидного вектора не достигает адекватной степени трансфекции кардиомиоцитов (не более 10%). Частое развитие иммунных реакций на вирусные белки, недолговечность в тканях ограничивают их широкое применение [1].

Использование клеточных продуктов также не имеет достаточно высокой эффективности, они сложны в изготовлении, несут опасность инфицирования, тератогенности и т. д. Даже при выполнении всех требований биологической безопасности клеточные продукты не интегрируются в ткани реципиента, а

оказывают только паракринный эффект [2]. Также уделяется большое внимание использованию различного рода биоматериалов для регенерации поврежденных тканей и органов. Все рассматриваемые методы сталкиваются с одной проблемой. В настоящее время не существует доступных и результативных методов борьбы с избыточным фиброзированием при ремоделировании постишемического миокарда. Известно, что биоматериалы серии Аллоплант® служат ингибитором фибронеза [3]. Они разработаны в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ г. Уфы и изготавливаются согласно ТУ 42-2-537-87. Продукты биodeградации биоматериала являются хемоаттрактантами М1 макрофагов в зоне имплантации. Тем самым макрофаги становятся непосредственными участниками фагоцитоза биоматериала, раневого детрита, иммунных комплексов и избыточного коллагена. Помимо этого, макрофаги оказывают паракринный эффект, высво-

бождая провоспалительные факторы: TNF α , IL1 и т. д. Монокины, в свою очередь, ингибируют экспрессию профиброгенных факторов (bFGF-1, TGF- β 1) и регулируют активацию фибробластических клеток [4]. Данные результаты исследования были получены при нанесении дефектов в скелетной мышце, стенке матки, при коррекции таких дегенеративно-воспалительных заболеваний хронического течения, как цирроз печени, пародонтит, язва желудка, ожоги кожи, дегенерация сетчатки и зрительного нерва. Установлено, что аллогенные биоматериалы в процессе замещения способствуют неангиогенезу формирующегося регенерата [5, 6]. Однако в отношении острого инфаркта миокарда исследования не проводились.

Известно, что основными ангиогенными факторами являются VEGF, TGF β , bFGF и т. д. [7]. Причем, по некоторым данным, bFGF стимулирует неоваскуляризацию в большей степени, чем VEGF [8].

Целью работы явилась оценка роли макрофагов и bFGF на постинфарктное ремоделирование и васкуляризацию миокарда в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для регенерации сердечной мышечной ткани применялся децеллюляризованный биоматериал (ДЦБМ), изготовленный из волокнистых соединительно-тканых образований и обработанный по технологии ТУ 42-2-537-87. Необходимым условием его применения является аллогенность, поэтому для настоящего исследования биоматериал был изготовлен из сухожилий крыс.

Экспериментальные исследования были проведены на 100 крысах-самцах породы Вистар массой 0,18–0,25 кг. Все животные были разделены на 2 группы. В контрольной группе (n = 50) моделирование инфаркта миокарда осуществляли следующим образом: под внутримышечным наркозом (раствор золетила) выполняли левостороннюю торакотомию с последующим наложением лигатуры на *r. interventricularis paraconalis a. coronarii sin.* левого желудочка. После вмешательства рану послойно ушивали.

В опытной группе (n = 50) лигирование артерии сопровождали введением суспензии ДЦБМ в бассейн стенозированной артерии в суммарном количестве 12 мг. Доза была выбрана произвольно. Перед применением в условиях стерильности готовили суспензию биоматериала в физиологическом растворе (100 мг биоматериала суспендировали в 5 мл физиологического раствора). По периметру левого желудочка делали 5–6 интрамиокардиальных инъекций суспензии, по 100 мкл каждая. Суммарный объем введенной суспензии составил 600 мкл. Размер частиц биоматериала составлял 50–80 мкм для свободного прохождения через инъекционную иглу. В контрольной группе спустя 5 суток вводили 0,9% физиологический рас-

твор в адекватном объеме. Животных содержали в стандартных условиях вивария.

Животных выводили из опыта путем инсуффляции летальной дозы паров эфира через 3, 7, 14, 30, 45 суток. 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 (Strasbourg, 1986), и согласно утвержденному письменному протоколу в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя и руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [9]. Для гистологического исследования сердца фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Маллори. Для определения размера постинфарктного рубца миокарда каждое сердце нарезали поперек на 5 секторов. Индекс площади рубца (ИПР) измеряли на препаратах поперечных срезов сердец крыс, окрашенных по Маллори, с использованием программы «ITEM» следующим образом: отношение площади рубца к площади стенки левого желудочка умножали на 100%.

Для иммуногистохимического исследования парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первых антител применяли: CD 68, bFGF-1 в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Подсчет позитивно окрашенных клеток производили в 20 полях зрения каждого образца (n = 6) при увеличении $\times 400$. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения.

Для электронно-микроскопического исследования использовали кусочки миокарда размером 1–2 мм³, которые фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, приготовленном на какодилатном буфере (pH 7,2–7,4) с дофиксацией в 1% растворе OsO₄ на том же буфере. Материал обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике. На ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия) готовили полутонкие срезы и окрашивали их раствором толуидинового синего на

2,5% растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронно-микроскопического исследования. Ультратонкие срезы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония).

Анализ данных ИПР и суммарной площади просветов капилляров (СППК) осуществлялся с применением непараметрических методов – однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису и сравнения некоррелированных данных методом Манна–Уитни [10]. Построение диаграммы осуществлялось в программе Statistica 6,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате эксперимента (через 45 суток) выявлено, что ИПР в контрольной группе составлял $26,65 \pm 16,10\%$, а в опытной после применения ДЦБМ – $9,72 \pm 1,08\%$. Кратность межгрупповых различий составила 2,74 раза (рис. 1).

Течение воспалительной реакции после ишемии сердечных мышечных волокон в экспериментальных группах происходило по-разному. В опытной группе в начальной стадии воспаления (3 суток) на месте ишемически поврежденных кардиомиоцитов выявлялись признаки раннего наступления пролиферативной фазы воспаления и формирования грануляционной ткани. В регенерате определялись тонкие коллагеновые волокна, макрофагально-фибробластическая инфильтрация, мезенхимные клетки. Наряду

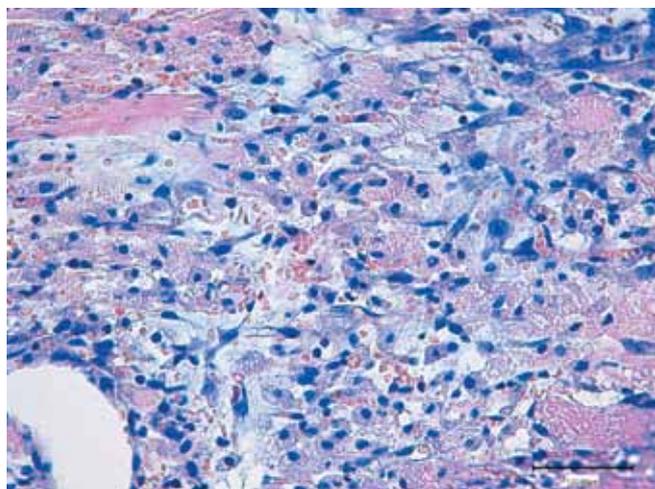


Рис. 2. Формирование грануляционной ткани и инфильтрация макрофагами, мезенхимными клетками, фибробластами в миокарде крысы через 3 суток после коронароокклюзии и введения биоматериала (опытная группа). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Fig. 2. Granulation tissue formation and infiltration by macrophages, mesenchymal cells, fibroblasts in rat myocardium 3 days after coronary occlusion and biomaterial insertion (experimental group). Stained with hematoxylin and eosin. $\times 400$

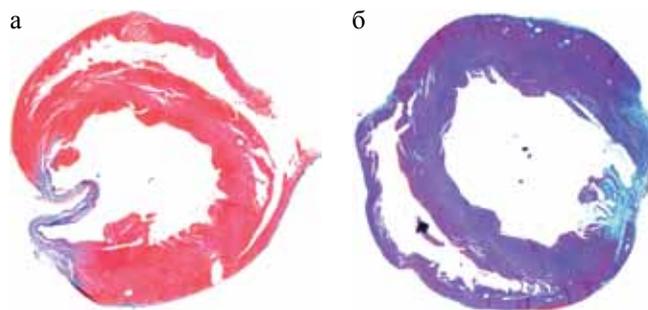


Рис. 1. Поперечный срез миокарда через 45 суток: а – контрольная группа; б – опытная группа. Окраска по Маллори. $\times 40$

Fig. 1. Myocardial cross-section in 45 days: a – control group; б – experimental group. Mallory stain. $\times 40$

с геморрагическим пропитыванием определялись тонкостенные гемокapилляры с разновекторной ориентацией. Определялись частицы биоматериала, инфильтрированные малодифференцированными клетками и макрофагами (рис. 2).

В контрольной группе на месте разрушающихся кардиомиоцитов формировался широкий клеточный вал, состоящий из макрофагов, лимфоцитов, нейтрофилов, отмечались признаки разрыва кровеносных сосудов и диапедез эритроцитов в интерстиций миокарда (рис. 3).

Также в контрольной группе в ишемически измененной сердечной мышечной ткани в реактивной зоне численность макрофагов CD 68 превышала зна-

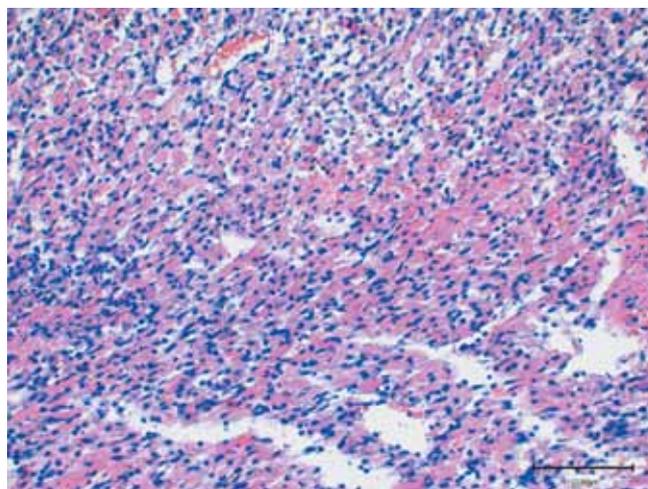


Рис. 3. Макрофагально-лимфоцитарный клеточный вал в зоне некротически измененных кардиомиоцитов через 3 суток после коронароокклюзии (контрольная группа). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 3. Macrophage-lymphocytic cell wall in the zone of necrotically altered cardiomyocytes 3 days after coronary occlusion (control group). Stained with hematoxylin and eosin. $\times 200$

чения опытной группы практически на всем протяжении эксперимента. В контрольной и опытной группах тенденция к подъему и последующему спаду в целом была высоко значима (Chi-Square = 76,3, $p < 0,0001$ и Chi-Square = 45,2, $p < 0,0001$ соответственно). Количество клеток CD 68⁺ в контрольной группе статистически значимо превышало их численность в опытной группе в период наблюдения 3–14 суток ($p < 0,003$ и менее). В период 30–45 суток в контрольной группе происходило затухание процессов ремоделирования миокарда и формирование рубца, что обуславливало снижение численности макрофагов в обеих группах ($p > 0,12$) и инициацию стадии заживления (рис. 4).

При исследовании bFGF-1⁺-клеток в опытной и в контрольной группах численность данных клеток статистически значимо зависела от начала эксперимента ($\chi^2 = 49,8$, $p < 0,0001$ и $\chi^2 = 60,0$, $p < 0,0001$ соответственно) и имела определенные различия. Через 3 суток в опытной группе границы варьирования bFGF-1⁺-клеток составляли 38–55 (медиана 44). Через 7 дней их численность повышалась до 54–68 (медиана 61) ($p < 0,0001$). Однако на 14-й день резко возрастала межиндивидуальная вариация численности bFGF-1⁺-клеток (22–72, медиана 60) и оказалась статистически не значимой ($p > 0,46$). Через 30 суток количество bFGF-1⁺-клеток в основной группе резко снижалось (9–16, медиана 11), а на 45-й день незначи-

тельно, статистически значимо ($p < 0,03$) снижалось до границ варьирования 4–16 клеток (медиана 9).

В контрольной группе экспрессия bFGF-1⁺-клетками происходила совершенно иначе. Число bFGF-1⁺-клеток было минимально в первую неделю от начала эксперимента (5–15, медиана 10), на 3-й день 10–19 клеток (медиана 14). Через 14–30 дней количество bFGF-1⁺-клеток в контрольной группе резко возрастало – до 80–109 клеток (медиана 84) и 67–104 клеток (медиана 101) соответственно, но различие было не значимо ($p > 0,66$). Статистически значимое ($p < 0,0001$) снижение числа bFGF-1⁺-клеток до 54–96 (медиана 64) в данной группе происходило только к 45-м суткам. В контрольной группе через 14, 30 и 45 суток внутригрупповой случайный разброс числа таких клеток резко возрастал до 29, 37 и 41 клетки соответственно. В опытной группе в период 30–45 суток по отношению к 14 дням вариация числа таких клеток, напротив, резко снижалась (рис. 5).

Результаты анализа показали, что статистически значимым является влияние на СППК реактивной зоны регенерата как фактора групповой принадлежности объектов («контроль», «опыт»), так и фактора времени (дни) ($\eta^2 = 15\%$, $F = 31$, $p < 0,0001$ и $\eta^2 = 14\%$, $F = 9$, $p < 0,0001$ соответственно).

В опытной группе СППК снижалась с $1432,2 \pm 1179$ мкм² на 3-й день до 577 ± 348 мкм² на 7-й день

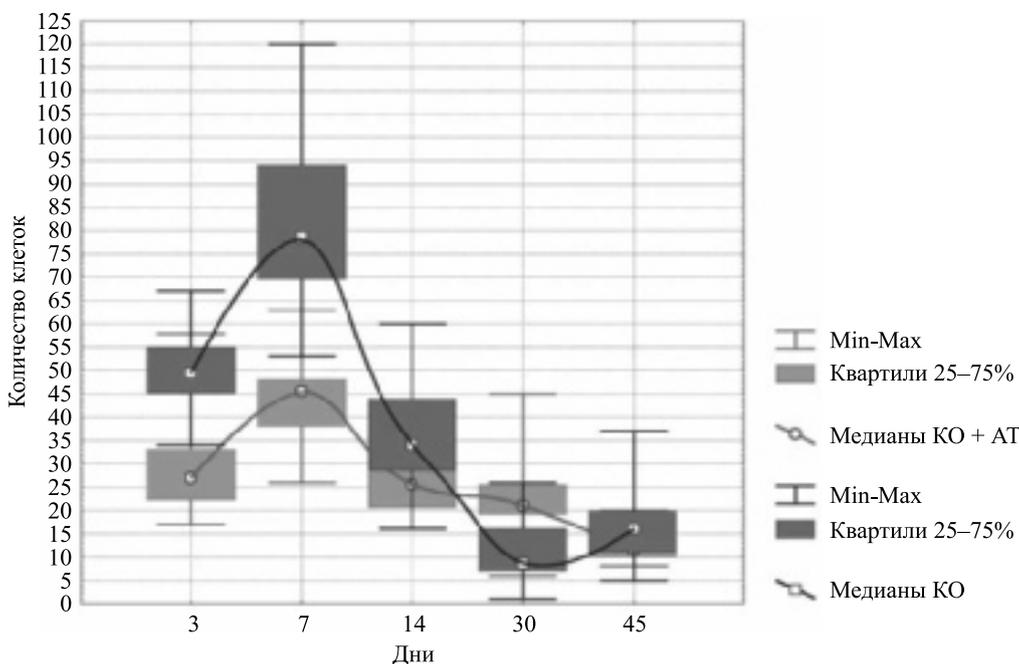


Рис. 4. Количество макрофагов CD 68⁺ в миокарде крысы в контрольной группе (КО) и после введения биоматериала (КО + АТ). ГДИ – границы доверительных интервалов для средних значений площади, ±СО – стандартная ошибка среднего значения

Fig. 4. The number of CD 68⁺ in the myocardium of rats in the control group (blue graph) and after the insertion of the biomaterial (red graph). GDI – limits of confidence intervals for the average area values, ±CO – standard error of the average value

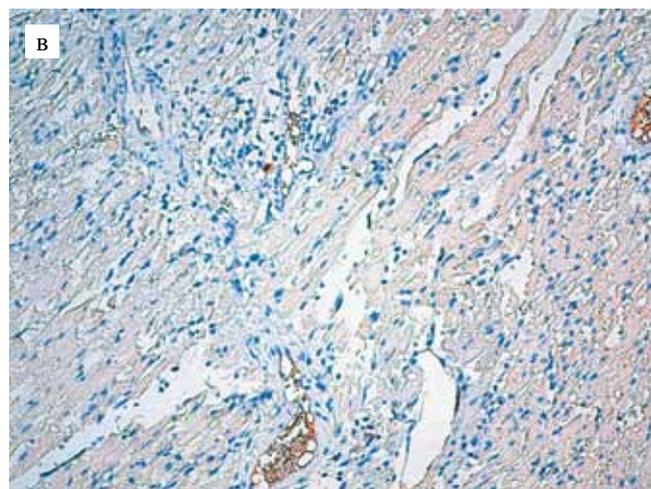
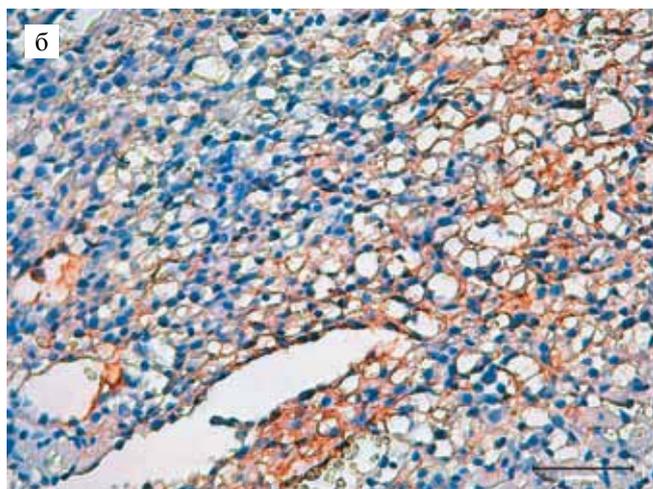
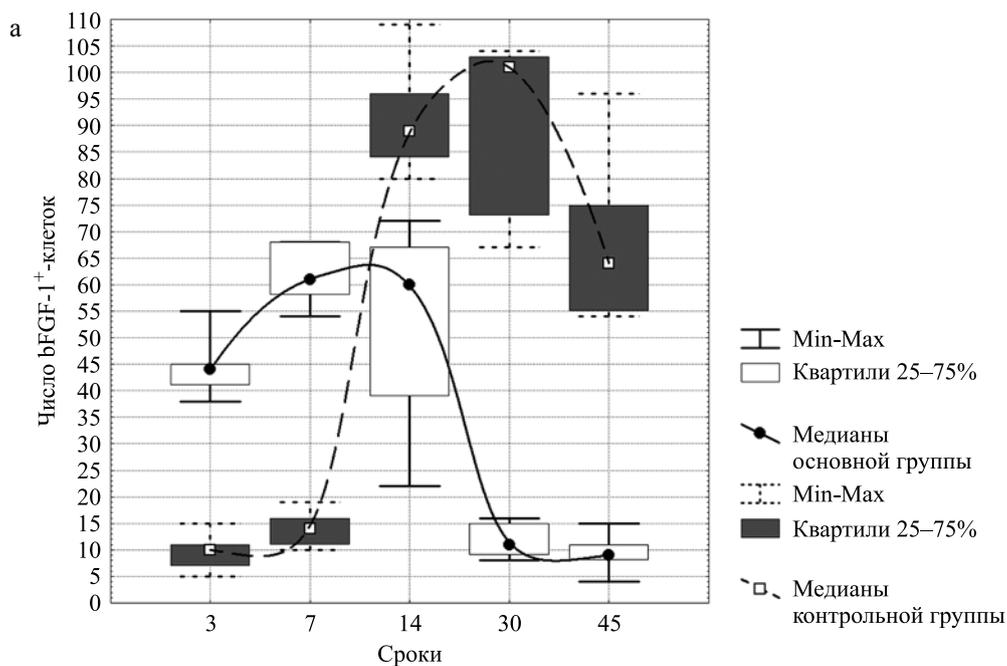


Рис. 5. Реакция FGF-1⁺-клеток в миокарде крысы: а – динамика численности bFGF-1⁺-клеток в опытной группе (основная) и в контрольной; б – экспрессия bFGF-1⁺ в опытной группе через 7 суток. $\times 400$; в – экспрессия bFGF-1⁺ в контрольной группе через 7 суток. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления bFGF-1 с докраской гематоксилином. $\times 200$

Fig. 5. The reaction of FGF-1⁺ cells in the myocardium of rats: а – dynamics of the number of bFGF-1⁺ cells in the experimental group (light graph) and in the control group (dark graph); б – expression of bFGF-1 in the experimental group after 7 days. $\times 400$; в – expression of bFGF-1 in the control group after 7 days. Indirect immunoperoxidase method for detection of bFGF-1 stained by hematoxylin. $\times 200$

($p < 0,0003$). В дальнейшем СППК оставалась стабильной ($611 \pm 445,8$ и $632,3 \pm 406,6$ μm^2 на 14-й и 30-й дни соответственно). В контрольной группе на 3-й день после коронароокклюзии СППК оказалась достоверно в 3 раза ниже, чем в опытной группе ($510,6 \pm 537$ μm^2). В последующие сроки наблюдения СППК снижалась, однако статистически значимым ($p < 0,003$) данное снижение оказалось лишь через 14 дней (146 ± 97 μm^2), т. е. почти в 3 раза ниже, чем на третий день. Во все сроки наблюдения СППК реактивной зоны регенерата в контрольной

группе оказалась существенно и статистически значимо меньше, чем в опытной. Наиболее высокая разница отмечалась в сроке 3 суток (рис. 6).

Спустя 14 суток в перифокальной зоне опытной группы были выявлены признаки резорбции коллагеновых волокон (рис. 7). В миокарде в перифокальной зоне определялись разрозненные короткие фрагменты коллагеновых волокон в окружении клеток округлой и крупной формы с овальным ядром (рис. 7, а). Фиброкласты выявлялись в виде крупных клеток овальной формы с длинными выростами ци-

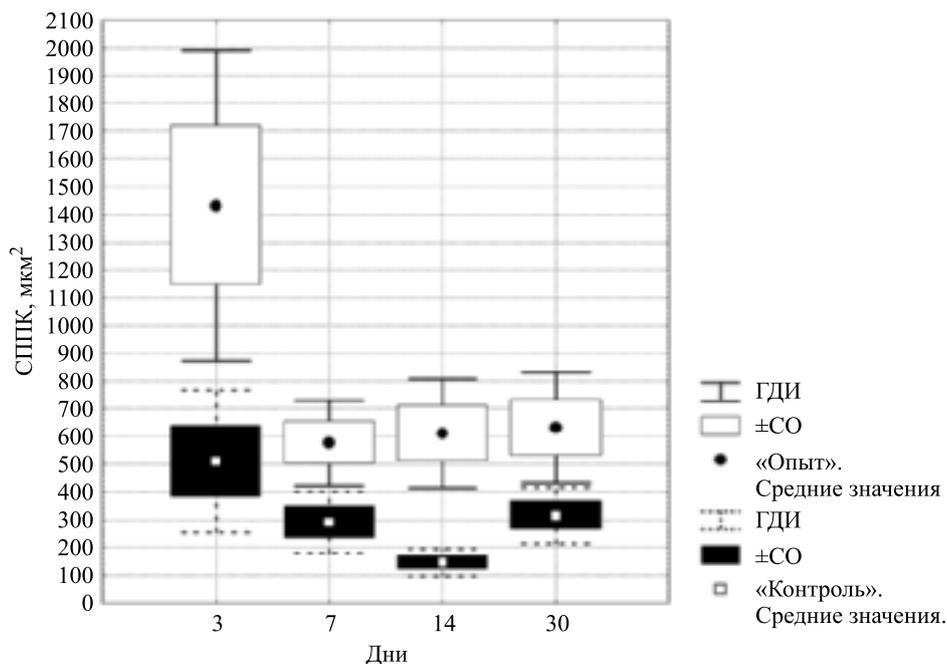


Рис. 6. Изменения СППК реактивной зоны регенерата в «контроле» и «опыте» в различные сроки наблюдений после коронароокклюзии. ГДИ – границы доверительных интервалов для средних значений площади, ±СО – стандартная ошибка среднего значения

Fig. 6. Changes CSCC reactive zone of the regenerate in the «control» and «experience» in different periods of observation after coronary occlusion. GDI – limits of confidence intervals for the average area values, ±CO – standard error of the average value

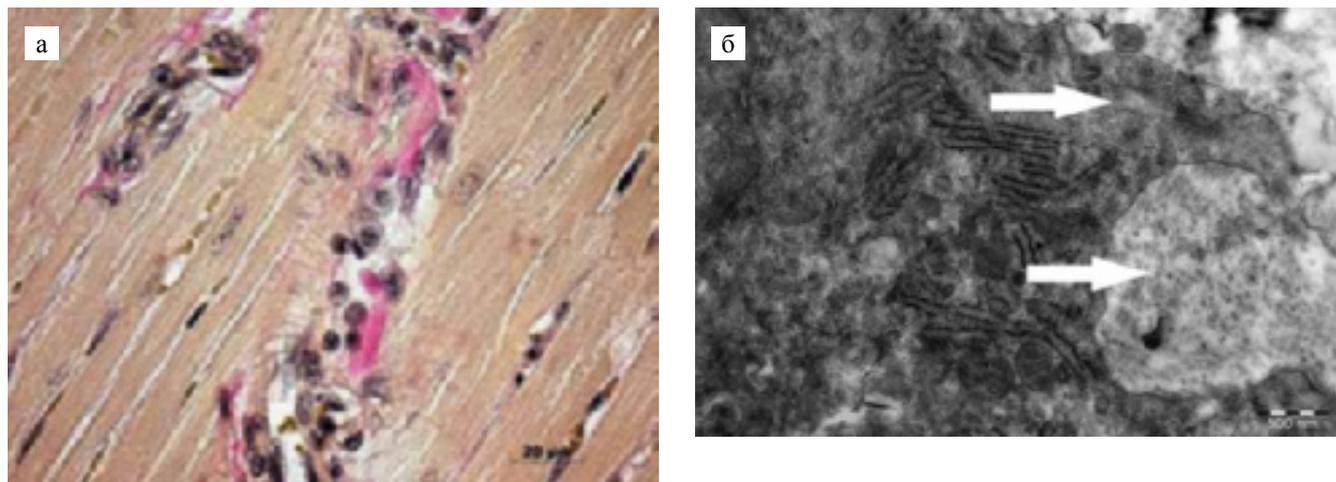


Рис. 7. Резорбция коллагена через 14 суток после введения биоматериала (опытная группа): а – окраска по Ван-Гизону. ×400; б – фиброкласт в миокарде с фагоцитарными вакуолями с фрагментами коллагена (↑). Электронограмма. ×12 000

Fig. 7. Resorption of collagen 14 days after insertion of biomaterial (experimental group). a – Van-Gison stain. ×400; б – fibroblast in the myocardium with phagocytic vacuoles with fragments of collagen (↑). Electronograms. ×12 000

толеммы, формирующими фагоцитарные вакуоли. В цитоплазме обнаруживались каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума, вторичные вакуоли с фрагментами исчерченных коллагеновых волокон, заключенные в цитоплазму. Ядра были округлой

формы с признаками функциональной активности, содержащие эухроматин (рис. 7, б).

Таким образом, в условиях применения ДЦБМ в реактивной зоне миокарда обнаруживались признаки фиброклазии, что также могло оказывать влияние на объем рубца в миокарде.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании мы использовали целевой подход и продемонстрировали патоморфологические процессы спонтанного заживления миокарда после лигирования коронарной артерии и под влиянием аллогенного биоматериала. Имплантация ДЦБМ показала новые стратегически важные механизмы регенерационного потенциала для миокарда, связанные с кардиопротекцией: ангиогенез, ингибирование макрофагов, фиброклазия. Выявлено, что в условиях применения ДЦБМ в дозе 12 мг площадь рубца была снижена более чем в 2 раза.

После лигирования коронарной артерии в миокарде происходили патоморфологические изменения, связанные с массивным колликвационным некрозом кардиомиоцитов. Прослеживалась вся хронология смены фаз воспалительного ответа. В сроки 3–14 суток происходило экссудативное воспаление. В период 14–30 суток наступала фаза пролиферации, а через 30–45 суток – заживление с формированием рубца.

Через трое суток после коронароокклюзии и интрамиокардиального введения ДЦБМ выявлялась макрофагально-фибробластическая и мезенхимная инфильтрация в перифокальной зоне на границе интактного миокарда и некротизированной сердечной мышечной ткани. Регенерат был хорошо васкуляризован. Отмечалась густая разнонаправленная сеть гемокapилляров, которая сопровождала формирование незрелой грануляционной ткани. Данные признаки свидетельствовали о наступлении ранней пролиферативной воспалительной стадии.

Ранее установлено, что в условиях применения ДЦБМ для заживления соединительной ткани с хроническим течением воспалительно-деструктивного процесса, а также после нанесения дефектов продукты биodeградации биоматериала становились хемоаттрактантами моноцитов и макрофагов. Макрофагальные клетки обуславливали эффективность регенерации за счет полноценного фагоцитоза и регулирования пролиферативной фазы воспаления. Они ингибировали фибробластическую активность за счет M1 макрофагов и пролонгирования цитотоксической фазы [11]. Известно, что фактор некроза опухолей (TNF α) помимо инициирования воспалительных реакций может также ингибировать фиброз через регуляцию активности фибробластов, подавляя синтез трансформирующего фактора роста TGF β -индуцированной экспрессии белка фактора роста соединительной ткани (CTGF) [12].

В результате наших исследований выявлено, что при острой стадии воспаления ишемизированного миокарда происходила противоположная реакция. Продукты биodeградации ДЦБМ стимулировали миграцию макрофагов в меньшей степени в период 3–14 суток и являлись их ингибитором. Присутствие частиц ДЦБМ отмечалось только в ранних сроках на-

блюдения, в дальнейшем через 14 суток биоматериал резорбировался и не визуализировался.

В контрольной группе в период 3–14 суток определялась выраженная инфильтрация миокарда макрофагами и формирование широкого клеточного вала, что соответствует фазе альтерации и экссудации. В последующем (14–45 суток) на этапе пролиферации и рубцевания численность макрофагов практически пропорционально уменьшалась и выравнивалась в обеих экспериментальных группах. Следовательно, согласно данным на рисунке 1, макрофаги способствовали манифестации воспаления в миокарде, усилению коллагеногенеза, и как следствие, увеличению зоны рубца. Это согласуется с данными других исследователей [13].

Природой ДЦБМ является децеллюляризованный аллогенный межклеточный матрикс – волокнистая соединительная ткань, состоящая преимущественно из зрелых коллагеновых волокон I типа и связанных с ним протеогликанов и гликозаминогликанов: гиалуроновой кислоты, гепаран-, дерматан- и кератансульфата. При лизисе и резорбции биоматериала происходит их дозированная экстракция, которая в начальные сроки высвобождается при биodeградации трансплантата, в последующем начинает секретироваться окружающими клетками: макрофагами, фибробластами [11]. Можно предположить, что экзогенный коллаген способствует подавлению острой воспалительной реакции и миграции таких эффекторных клеток, как макрофаги. Данный механизм действия, вероятно, развивается по типу «обратной связи», характерному при инволюции рубца. И был вызван избыточным коллагеногенезом, «основанном на межклеточном и коллаген-клеточном взаимодействии», описанным В.В. Серовым и А.Б. Шехтером (1981) [14].

Избыточный коллаген, непосредственно контактируя с фибробластами, приводит к усилению фиброклазии, снижению синтетической активности фибробластов и их деструкции, что и наблюдалось нами через 14 суток в опытной группе, вызвавшей резкий спад bFGF-1⁺-клеток и появление фиброкластов. Фиброклазия также могла оказать влияние на снижение площади рубца в опытной группе.

С другой стороны, при трансплантации децеллюляризованного экстраклеточного матрикса высвобождаются такие цитокины, как bFGF, VEGF, HGF, в том числе в начальные сроки после имплантации (1–3 суток), оказывают биоиндуктивные воздействия на миокардиальные фибробласты и способствуют росту кровеносных сосудов [15]. Нами отмечено, что степень васкуляризации реактивной зоны в опытной группе превышает значения контрольной на всем протяжении эксперимента, особенно в период 3 суток. Известно, что bFGF обладает не только выраженным ангиогенным потенциалом в условиях ишеми-

ческого повреждения миокарда, но и способствует выживаемости эндотелиоцитов, снижает степень апоптоза кардиомиоцитов [16–18]. Широко известна роль гепарансульфата (перлекана) в качестве «молекулярного клея», играющего ключевое значение при эмбриональном и постнатальном морфогенезе миокарда. Он является основным компонентом базальной мембраны кровеносных сосудов, коллагена IV типа и ламинина [19]. Следовательно, эндогенный гепарансульфат, как один из продуктов биодеградации ДЦБМ, также может участвовать в неоваскулогенезе, морфогенезе и кардиопротекции.

В контрольной же группе воспаление развивалось по «классическому типу» [20]. В период 3–14 суток фаза острого воспаления сопровождалась наличием воспалительных эффекторных клеток, формированием широкого клеточного вала, возникшего на месте некротических масс ишемизированных волокон миокарда. Соответственно, количество bFGF-1-продуцирующих клеток было низким. Спустя 14 суток и далее пролиферативная стадия заживления характеризовалась накоплением большого количества фибробластических клеток и более увеличенной продукцией ими фиброкина bFGF-1.

Продукты биодеградации ДЦБМ способны нормализовать баланс между процессами нефиброгенеза и фиброклазии, при этом замедляется синтез избыточных коллагена и гликозаминогликанов, что возвращает процесс регенерации миокарда в физиологичное русло и приводит к физиологическому рубцеванию. В процессе патологического рубцевания при переходе из фазы позднего воспаления в фазу пролиферации в условиях гипоксии и нарушенной микроциркуляции происходит накопление в ране детрита и аномальная продукция цитокинов избыточным количеством макрофагов, что приводит к удлинению стадии воспаления и препятствует активации процессов заживления [21]. Продукты тканевого распада, выступая в роли биологических стимуляторов фиброгенеза, вызывают дисбаланс системы «фибронез – фиброклазия» с образованием большого количества клеток фибробластического ряда, отличающихся высоким обменом веществ [22].

Анализ результатов экспрессии bFGF-1 в опытной группе подтверждает данное предположение. Механизм действия свидетельствует об обратной ответной реакции ткани в ответ на имплантацию ДЦБМ, нежели описанную в предыдущих работах [23]. В настоящем исследовании обнаружено, что в опытной группе в периинфарктной зоне в период 3–14 суток bFGF-1⁺-клетки значительно превышали значения контрольной. В контрольной же группе в период острой фазы воспаления (3–14 суток) уровень bFGF-1⁺-клеток был низким по сравнению с опытной, а в последующем (14–30 суток) экспрессия цитокина значительно увеличивалась, что соответствовало

фазе заживления и рубцевания – стремительному накоплению коллагеновых волокон.

В опытной группе выявленная хронология смены клеточной инфильтрации не соответствует классическому пониманию течения воспалительного процесса. Вероятно, выраженная экспрессия bFGF-1 является антагонистом провоспалительного спектра цитокинов и подавляет цепь цитотоксических реакций. Известно, что bFGF, сдерживая апоптоз кардиомиоцитов, оказывает защитное действие на сердце после перенесенного инфаркта миокарда, благодаря чему уменьшается размер некротизированной зоны [24]. Следовательно, ранняя пролиферативная фаза и формирование грануляционной ткани могут способствовать кардиопротекции.

В последнее время появляются сведения об использовании различных видов гидрогелей, созданных на основе внеклеточного матрикса, альгината, желатиназы, коллагена, гиалуроновой кислоты, фибрина, агарозы, хитозана, кератина. Они вызывают некоторое улучшение в ремоделировании ишемически поврежденного миокарда, ограничивая распространение фиброобразования [25, 26]. Отдельные материалы могут обеспечивать поддержание или улучшение функциональных параметров у экспериментальных животных либо являться носителями клеток или факторов роста [27]. Биоматериалы на основе экстрацеллюлярного матрикса, как правило, состоят из структурных белков, таких как коллаген, ламинин, фибронектин и витронектин, и множества гликозаминогликанов. Скорость деградации этих материалов определяется клеточной средой и такими факторами, как концентрация и степень сшивки. Но часто они имеют скорость биорезорбции, значительно превышающую скорость гистогенеза, без существенных функциональных и структурных положительных сдвигов, в том числе и в отдаленном периоде [28].

Использованный в данном исследовании биоматериал, созданный на основе децеллюляризованного аллогенного межклеточного матрикса, взаимодействует с тканью хозяина, изменяя цитокиновый профиль миокарда, способствует ангиогенезу и уменьшает фиброз и гибель клеток, служит хемоаттрактантом прогениторных кардиомиогенных клеток. При использовании ДЦБМ не требуется витализация, он способен поддерживать баланс между деградацией и репаративным гистогенезом, служит биомиметиком, биосовместим, не иммуногенный, противостоит долгосрочным осложнениям, таким как инфекция, кальцификация и расширение аневризмы. Вязкость полученной суспензии зависит от его концентрации и может регулироваться и зависит от типа ткани и потребностей исследователя.

В данной модели острого инфаркта миокарда не освещаются вопросы хронической миокардиальной ишемии, которая является наиболее распространен-

ной в клинической практике. Поэтому эта модель освещает аспекты влияния продуктов биодеградации ДЦБМ в качестве bFGF-индуцированных ангиогенных факторов роста на проангиогенное состояние в период заживления после инфаркта миокарда. Одним из направлений стратегии терапевтической коррекции при ишемических повреждениях миокарда следует указать на ингибирование миграции макрофагов и подавление их провоспалительной направленности M1. В качестве такой альтернативы может являться децеллюляризованный аллогенный биоматериал, примененный в острой фазе воспаления миокарда.

ВЫВОДЫ

1. Использование аллогенного биоматериала сразу после стенозирования коронарной артерии позволяет более чем в 2 раза уменьшить площадь рубцового перерождения миокарда.
2. ДЦБМ ускоряет течение воспалительного ответа и наступление ранней пролиферативной фазы воспаления.
3. Аллогенный биоматериал снижает инфильтрацию миокарда макрофагами CD68 по сравнению с контролем при спонтанном заживлении.
4. Использование ДЦБМ обеспечивает значительное преобладание bFGF-1⁺-клеток в начальный период воспаления (3–14 суток). В последующем (14–45 суток) экспрессия фиброкина становилась в разы меньше. В контрольной же группе в период острой фазы воспаления (3–14 суток) уровень bFGF-1⁺-клеток был низким, а в последующем (14–45 суток) экспрессия цитокина значительно увеличивалась, что вызывало стремительное накопление коллагеновых волокон и рубцевание.
5. В процессе формирования постинфарктного регенерата в эксперименте ДЦБМ стимулировал ангиогенез.
6. В зоне регенерации миокарда аллогенный биоматериал является регулятором баланса неофибриллогенеза-фиброклазии.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 056-00110-18-00, утвержденного 26.12.2017 г.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Pislaru SV, Simari RD. Gene transfer for ischemic cardiovascular disease: is this the end of the beginning or the beginning of the end? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005; 2: 138–144.
2. Давыденко ВВ, Матюков АЛ, Цупкина НВ, Власов ТД, Гриценко ВВ, Кузнецов АЛ и др. Влияние ауто-трансплантации различных клеток костного мозга на морфофункциональное состояние миокарда кролика после инфаркта. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2007; 2: 52–61. Davydenko VV, Matyukov AL, Tsupkina NV, Vlasov TD, Gritsenko VV, Kuznetsov AL et al. Influence of autotransplantation of various bone marrow cells on the morphofunctional state of the rabbit myocardium after infarction. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2007; 2: 52–61. [In Russ.].
3. Лебедева АИ. Аллогенный губчатый биоматериал – ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани. *Российский биотерапевтический журнал*. 2014; 4 (13): 37–44. Lebedeva AI. Spongiform biomaterial – inhibitor of fibrosis of damaged skeletal muscle. *Russyskiyi biotherapevicheskiyi journal*. 2014; 4 (13): 37–44. [In Russ.].
4. Лебедева АИ, Муслимов СА, Гареев ЕМ и др. 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. Lebedeva AI, Muslimov SA, Gareev EM et al. Morphological features of macrophages and their cytokine profile in the regeneration of skeletal muscle plastic surgery allogenic spongy biomaterial. *Cytokines & inflammation*. 2015; 14 (1): 27–33. [In Russ.].
5. Лебедева АИ, Муслимов СА, Мусина ЛА. Регенерация гладкой мышечной ткани рога матки кролика после разреза лучом лазера и применения аллогенного биоматериала. *Вестник Башкирского государственного аграрного университета*. 2013; 4 (28): 41–45. Lebedeva AI, Muslimov SA, Musina LA. Regeneration of smooth muscle tissue uterine horns of the rabbit after cut by the laser beam and the use of allogenic biomaterial. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2013; 4 (28): 41–45. [In Russ.].
6. Лебедева АИ, Муслимов СА, Мусина ЛА, Щербakov ДА. Регенерация скелетной мышечной ткани экспериментальных животных, индуцированная биоматериалом аллоплант. *Международный журнал экспериментального образования*. 2014; 3-2: 68–71. Lebedeva AI, Muslimov SA, Musina LA, Sherbakov DA. Regeneration of skeletal muscle tissue of experimental animals induced by Alloplant biomaterial. *Mezhdunarodnyj zhurnal ehksperimental'nogo obrazovaniya*. 2014; 3-2: 68–71. [In Russ.].
7. Арсентьева НИ, Макарова МА, Арсентьева МЛ. Пластические процессы при ишемическом повреждении миокарда и роль локальных митогенов в его регенерации (По результатам исследований в ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2014; 3: 116–121. Arsent'eva NI, Makarova MA, Arsent'eva ML. Plastic processes in ischemic myocardial damage and the role of local mitogens in its regeneration (according to the results of research in the fgbu «scientific center for reconstructive and reconstructive surgery» SB RAMS. *Byulleten' VSNC SO RAMN*. 2014; 3: 116–121. [In Russ.].
8. Михайличенко ВЮ, Самарин СА. Ангиогенез при инфаркте миокарда и его коррекция трансплантацией

- мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2015; 2 (151): 98–105. *Mihajlichenko VYu, Samarin SA*. Angiogenesis in myocardial infarction and its correction by transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in the experiment. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2015; 2 (151): 98–105. [In Russ.].
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2с, 2010: 358. Guidance on laboratory animals and alternative models in biomedical research / Pod. red. N.N. Karkishchenko, S.V. Grachev. M.: Profile-2c, 2010: 358. ББК 45.318:28.6я81.
 10. *Реброва ОЮ*. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002: 312. *Rebrova OYu*. Statistical analysis of medical data. Application of STATISTICA application software package. M.: MediaSfera, 2002: 312.
 11. *Лебедева АИ*. Регуляция паренхиматозно-стромальных взаимоотношений при коррекции дефектов скелетной мышцы аллогенным биоматериалом. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология*. 2014; 1: 51–56. *Lebedeva AI*. Regulation of parenchymal-stromal relationship for the correction of defects of skeletal muscle allogenic biomaterial. *Experimental and clinical dermatocosmetology*. 2014; 1: 51–56. [In Russ.].
 12. *Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A*. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000; 275 (20): 15220–15225. doi: 10.1074/jbc.275.20.15220.
 13. *Гомбожарова АЭ, Роговская ЮВ, Ребенкова МС, Кжышкковская ЮГ, Рябов ВВ*. CD 68 и Стабилин-1 позитивные макрофаги в постинфарктной регенерации миокарда. *Российский кардиологический журнал*. 2017; 11 (151): 56–61. *Gombozhapova AE, Rogovskaya YuV, Rebenkova MS, Kzhyshkovskaya YuG, Ryabov VV*. CD 68 and stabilin-1 positive macrophages in postinfarction myocardial regeneration. *Russian Journal of Cardiology*. 2017; 11 (151): 56–61. [In Russ.]. <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-11-56-61>.
 14. *Серов ВВ, Шехтер АБ*. Соединительная ткань. М.: Медицина, 1981: 312. *Serov VV, Shekhter AB*. Connective tissue. M.: Medicina, 1981: 312.
 15. *Mewhort HEM, Svystonyuk DA, Turnbull JD, Teng G, Belke DD, Guzzardi DG et al*. Bioactive Extracellular Matrix Scaffold Promotes Adaptive Cardiac Remodeling and Repair. *Jacc: Basic to Translational Science*. 2017; 2 (4): 450–464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.05.005>.
 16. *Шурыгин МГ, Шурыгина ИА*. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2010; 30 (6): 89–92. *Shurygin MG, Shurygina IA*. The fibroblast growth factor as angiogenesis stimulator at myocardial infarction. *Vyulleten' VSNC SO RAMN*. 2010; 30 (6): 89–92. [In Russ.].
 17. *Tamura K, Nakajima H, Rakue H et al*. Elevated Circulating Levels of Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Jap Circ J*. 1999; 63 (5): 357–361. <https://doi.org/10.1253/jcj.63.357>.
 18. *Shao ZQ, Takaji K, Katayama Y, Kunitomo R, Sakaguchi H, Lai ZF, Kawasuji M*. Effects of Intramyocardial Administration of Slow-Release Basic Fibroblast Growth Factor on Angiogenesis and Ventricular Remodeling in a Rat Infarct Model. *Circ J*. 2006; 70: 471–477. <https://doi.org/10.1253/circj.70.471>.
 19. *Sasse Ph, Malan D, Fleischmann M, Roe W, Gustafsson E, Bostani T et al*. Perlecan is critical for heart stability. *Cardiovascular Research*. 2008; 80: 435–444. doi: 10.1093/cvr/cvn225.
 20. *Пальцев МА, Аничков НМ*. Патологическая анатомия. М.: Медицина, 2000; 2 (1), 512. *Pal'cev MA, Anichkov NM*. Pathological anatomy. M.: Medicina, 2000; 2 (1), 512.
 21. *Huang C, Murphy GF, Akaiishi S, Ogawa R*. Keloids and hypertrophic scar s: update and future directions. *Plastic and reconstructive surgery Global open*. 2013; 1 (4): e25. doi: 10.1097/GOX.0b013e31829c4597.
 22. *Serra MB, Barroso WA, Da Silva NN, Silva SDN, Borges ACR, Abreu IC et al*. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *Int J Inflam*. 2017; 17. doi: 10.1155/2017/3406215.
 23. *Muldashev ER, Muslimov SA, Musina LA, Nigmatullin RT, Lebedeva AI, Shangina OR et al*. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell Tissue Bank*. 2005; 6 (2): 99–107. doi: 10.1007/S10561-004-5805-2.
 24. *Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Ito M, Matsuo K et al*. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 459: 124–130. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.081.
 25. *Landa N, Miller L, Feinberg MS, Holbova R, Shachar M, Freeman I et al*. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulation*. 2008; 117: 1388–1396.
 26. *Lv K, Li Q, Zhang L, Wang Y, Zhong Zh, Zhao J et al*. Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction. *Theranostics*. 2019; 9 (24): 7403–7416. doi: 10.7150/thno.32637.
 27. *Plotkin M, Vaibavi SR, Rufaihah AJ, Nithya V, Wang J, Shachaf Y et al*. The effect of matrix stiffness of injectable hydrogels on the preservation of cardiac function after a heart attack. *Biomaterials*. 2014; 35 (5): 1429–1438. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.058.
 28. *Shao ZQ, Takaji K, Katayama Y, Kunitomo R, Sakaguchi H, Lai ZF, Kawasuji M*. Effects of intramyocardial administration of slow-release basic fibroblast growth factor on angiogenesis and ventricular remodeling in a rat infarct model. *Circ J*. 2006; 70: 471–477.

Статья поступила в редакцию 23.07.2018 г.
The article was submitted to the journal on 23.07.2018