

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 *

Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск

* Всероссийский центр глазной и пластической хирургии, г. Уфа

Резюме

Несмотря на достижения современной клеточной трансплантации, направленной на восстановление структуры миокарда после ишемического повреждения, остается актуальной проблема постинфарктного фиброза. Целью работы явилось изучение возможности стимуляции регенерации миокарда с помощью аллогенного диспергированного биоматериала (АДБМ) после экспериментальной ишемии. Исследование проведено на 48 кроликах. Первым этапом производилось моделирование острого инфаркта миокарда, путем перевязки передней нисходящей артерии сердца. Далее животных разделили на две группы — опытную и контрольную. В опытной группе через 5 суток после воспроизведения острой ишемии интрамиокардиально вводилась суспензия ДБМА в физиологическом растворе, а в контроле — физиологический раствор.

В различные сроки после операции проведено общегистологическое, электронномикроскопическое и иммуногистохимическое исследование с выявлением пролиферативного индекса (по экспрессии PCNA- ядерного антигена пролиферирующих клеток) и степени фиброза (по экспрессии TGF- β — трансформирующего фактора роста). В результате проведенного исследования в опытной группе животных на фоне постепенного лизиса материала отмечена выраженная мезенхимная клеточная реакция, приводящая к формированию большого количества новообразованных сосудов и клеточных элементов в зоне повреждения миокарда. В контрольной группе в те же сроки образовывался грубоволокнистый рубец.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, регенерация, биологический материал.

Введение

Одним из перспективных направлений в лечении ишемических повреждений миокарда являются клеточные трансплантационные технологии, направленные на восстановление популяции кардиомиоцитов (1). Однако допускается возможность регенерации миокарда и за счет пролиферации собственных кардиомиоцитов (2, 3).

Известно, что при инфаркте миокарда и ишемической кардиомиопатии наблюдается строгая корреляция между некрозом кардиомиоцитов и развивающимся фиброзом пораженного участка миокарда, а фиброз, в свою очередь, приводит к снижению трофики кардиомиоцитов, оставшихся неповрежденными (4, 5). Поэтому коррекция фиброзных изменений при ишемических повреждениях миокарда, возможно, является фактором, обеспечивающим минимизацию зоны поражения и создаю-

щим условия для репаративной регенерации миокарда.

Одним из эффективных способов нивелирования поствоспалительного фиброза является введение аллогенного диспергированного биоматериала в виде суспензии (6). Выявлено, что биоматериал после введения подвергается деградации за счет ферментативного лизиса макрофагами, а продукты его распада стимулируют регенерацию тканей и препятствуют развитию фиброза (16, 17).

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности коррекции фиброза и стимуляции регенерации миокарда с помощью диспергированного биоматериала после ишемического повреждения в эксперименте.

Материалы и методы исследования

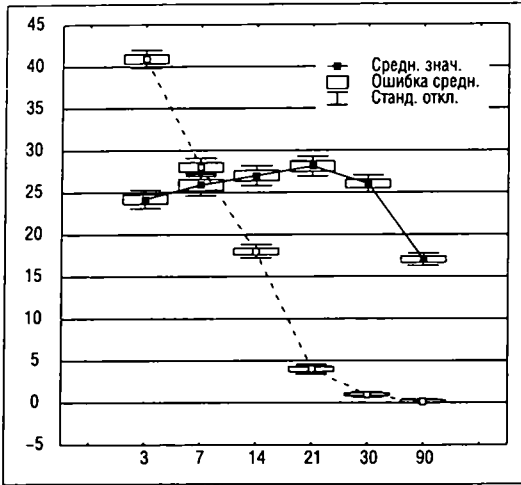
Исследование проведено на 48 серых кроликах массой 3–3,5 кг. На первом этапе у всех животных под кетаминным наркозом воспроизводилось острое ишемическое повреждение миокарда путем перевязки передней нисходя-

С. А. Муслимов — д. м. н., профессор;

А. В. Чукичев — д. м. н., профессор;

Л. А. Мусина — д. м. н., профессор.

Рисунок 2. Динамика пролиферативного индекса мезенхимных клеток у животных опытной группы (сплошная линия) и контрольной группы (пунктирная линия)

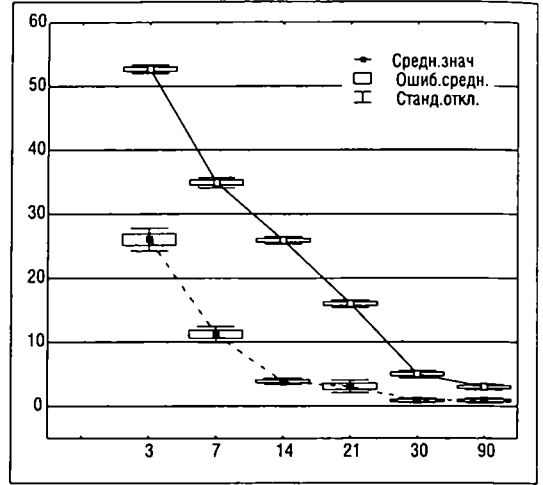


Примечание. Фактор группирования опыт-контроль. КВФ=91%; ККК=0,95; $F=1143$; $p<0,001$. Фактор сутки (изменения со временем). КВФ=97%; ККК=0,98; $F=697$; $p<0,001$. КВФ — коэффициент влияния фактора, ККК — коэффициент канонической корреляции, F — коэффициент Фишера, p — достоверность

щей ветви левой венечной артерии в средней трети. На втором этапе, на 5 сутки после воспроизведения острой ишемии животным экспериментальной группы ($n=30$) в перинфарктную зону миокарда вводили 1–2 мл суспензии (40 мг/мл) аллогенного диспергированного биоматериала (АДБМ), а животным контрольной группы вводили аналогичное количество физиологического раствора.

Животных выводили из опыта передозировкой тиопентала через 3, 7, 14, 21, 30 и 90 суток после введения биоматериала. Изучали динамику морфологических изменений в зоне введения АДБМ, а также в прилегающих участках миокарда. Для этого гистологические срезы миокарда окрашивали гематоксилином-эозином, по Ван Гизону и Маллори. Для изучения пролиферативной активности клеток, а также степени фиброза было проведено иммуногистохимическое исследование с использованием непрямого иммунопероксидазного метода. Применяли моноклональные антитела к PCNA — ядерному антигену пролиферирующих клеток и к TGF- β_1 — трансформирующему фактору роста (Santa Cruz Biotechnology, США). Митотический индекс подсчитывали по отношению количества клеток, экспрессирующих PCNA, к общему количеству клеток дан-

Рисунок 3. Динамика изменения пролиферативного индекса фибробластов у животных опытной группы (пунктирная линия) и контрольной группы (сплошная линия).



Примечание. Фактор группирования опыт-контроль. КВФ=97%; ККК=0,99; $F=3862$; $p<0,001$. Фактор сутки (изменения со временем). КВФ=99%; ККК=0,99; $F=2219,63$; $p<0,001$. КВФ — коэффициент влияния фактора, ККК — коэффициент канонической корреляции, F — коэффициент Фишера, p — достоверность

ной популяции. Микрофотосъемку выполняли с помощью цифровой камеры ProGres C₃ (Jenoptik, Германия) и микроскопа Axio Imager (C. Zeiss, Германия), Морфометрический анализ проводился с использованием программы анализа изображений Axiovision (C. Zeiss, Германия). Выявление статистически достоверного различия показателей в группах проводилось с использованием программы Statistica 7.0.

Результаты исследования

У животных контрольной группы динамика морфологических изменений в зоне постинфарктной ишемии миокарда характеризовалась некрозом кардиомиоцитов, воспалительным инфильтратом вокруг очагов некроза, развитием грануляционной ткани и формированием рубца на 30 сутки эксперимента. Необходимо отметить, что в структуре соединительнотканного рубца, кроме малососудистой волокнистой ткани обнаруживались участки жировой ткани.

В опытной группе животных через 3 суток после введения АДБМ в перинфарктную зону миокарда (на 8 сутки после наложения лигатуры) в частицах биоматериала определялись признаки гомогенизации коллагеновых волокон. Вокруг частиц наблюдались слабая клеточная инфильтрация. В клеточном инфильтрате обна-

руживались макрофаги, в основном зрелые формы, с выраженными признаками фагоцитоза, о чем свидетельствовало множество фагосом в цитоплазме. Часть макрофагов имела развитый комплекс Гольджи и лизосомальный аппарат, что свидетельствует об их секреторной активности. Обнаруживались также мезенхимные клетки: недифференцированные, округлой формы, со светлой цитоплазмой и светлым ядром. В меньшем количестве определялись фибробласты различной степени зрелости.

В последующие сроки (7-14 суток) динамика морфологических изменений в зоне введения частиц биоматериала характеризовалась продолжающимся лизисом коллагеновых волокон биоматериала, что выражалось в изменении их тинкториальных свойств. Клеточная инфильтрация вокруг частиц биоматериала значительно увеличивалась, а в составе инфильтрата наблюдалось преобладание макрофагов и мезенхимных клеток.

Через 30 суток с момента введения количество выявляемых частиц биоматериала значительно уменьшалось, а на 90 сутки они практически не обнаруживались.

В ишемизированной зоне миокарда у животных опытной группы через 3 суток с момента введения биоматериала в клеточном инфильтрате преобладали мезенхимные клетки и фибробласты, а также зрелые макрофаги. Иммуногистохимически в популяциях мезенхимных клеток и фибробластов выявлялись пролиферирующие клетки, о чем свидетельствовала положительная реакция на моноклональные антитела к PCNA (рис. 1, см. цветное фото). Результаты количественной оценки пролиферативной активности мезенхимных клеток и фибробластов в опытной и контрольной группах показали, что в опытной группе мезенхимные клетки проявляли более высокую пролиферативную активность, чем в контроле, а пролиферативный индекс фибробластов была значительно ниже.

При статистическом анализе полученных результатов мы так же отметили достоверно высокий пролиферативный индекс мезенхимно-клеточной активности в опытной группе на фоне низкого уровня фиброза (рис. 2, 3).

Кроме того, начиная с 7 суток, в миокарде животных опытной группы обнаруживалось большое количество эндотелиоцитов, экспрессирующих PCNA, что является показателем их митотической активности и свидетельствует о новообразовании капилляров.

Начиная с 21 суток эксперимента среди кардиомиоцитов обнаруживались PCNA-положительные, т.е. проявляющие митотическую активность клетки (рис. 4, см. цветное фото). Они имели ультраструктуру, типичную для ма-

лодифференцированных клеток, т.е. без специфических органелл, но образовывали между собой щелевые контакты и десмосомы. В последующие сроки число таких миобластоподобных клеток увеличивалось, составляя значительную часть регенерата, формирующегося в поврежденной зоне миокарда.

Иммуногистохимическое исследование выявило более низкий уровень экспрессии трансформирующего фактора роста (TGF- β_1) во все сроки эксперимента у животных опытной группы по сравнению с контролем (рис. 5).

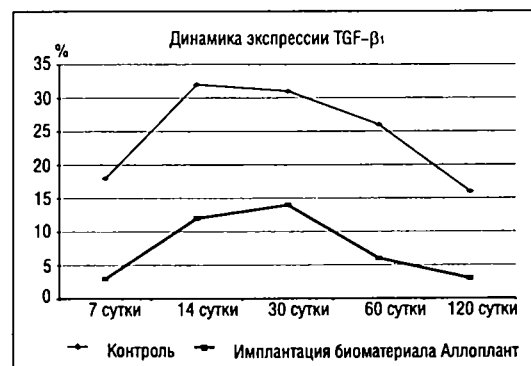
В целом динамика морфологических изменений в постинфарктной зоне миокарда у животных опытной группы характеризовалась развитием двух видов тканей: соединительной и мышечной. В конечные сроки эксперимента (90 суток) структура новообразованной соединительной ткани отличалась отсутствием грубых пучков коллагеновых волокон, а также относительно большей плотностью сосудистой сети. Значительную часть образовавшегося регенерата занимали тяжи мышечных волокон (рис. 6, см. цветное фото).

У животных контрольной группы в зоне инфаркта формировался плотный соединительнотканый слабоваскуляризованный рубец, вокруг которого определялась мышечная ткань с гипертрофированными кардиомиоцитами с признаками энергетического истощения.

Обсуждение

Полученные в данном исследовании результаты показали, что введение аллогенного диспергированного биоматериала оказывает положительное влияние на динамику морфологических изменений в зоне ишемического повреждения миокарда и структуру регенерата, замещающего некротизированную мышечную ткань в зоне инфаркта.

Рисунок 5. Динамика экспрессии трансформирующего фактора роста (TGF- β_1) в ишемизированной зоне миокарда у животных опытной и контрольной групп



Анализ полученных результатов позволяет заключить, что введение АДБМ инициирует создание ряда благоприятных условий, главным из которых, на наш взгляд, является значительное более низкая, по сравнению с контролем, экспрессия трансформирующего фактора роста (TGF- β_1), который, как известно, стимулирует пролиферацию фибробластов и синтез коллагена (7, 8). Об этом свидетельствует выявленный нами сравнительно низкий уровень пролиферативной активности фибробластов. Поэтому, можно полагать, что два этих взаимосвязанных фактора (низкий уровень TGF- β_1 и слабая пролиферативная активность фибробластов) обуславливают минимальное развитие фиброза в ишемизированной зоне миокарда у животных опытной группы.

Ключевым фактором в механизме подобного течения постинфарктных морфологических изменений, по-видимому, является высокая активность и фенотипическая зрелость макрофагов. Установлено, что продукты распада коллагеновых волокон биоматериала (коллаген, протеогликаны, структурные гликопротеины) во-первых, являются хемоаттрактантами для моноцитов, мигрирующих из кровеносного русла, что создает определенную их концентрацию (6, 9, 10), во-вторых, способствуют полноценному созреванию моноцитов в тканевые макрофаги (11). Также было выявлено, что зрелые макрофаги, лизирующие частицы биоматериала, экспрессируют фактор некроза опухоли (17), который конкурентно ингибирует активность трансформирующего фактора роста (7). На положительную роль макрофагов, как фактора регуляции межклеточных взаимодействий при формировании постинфарктного рубца, указывают также N. G. Frangogiannis и соавт. (12).

Авторы считают, что оптимизация межклеточных взаимодействий с помощью цитокинов, секретируемых фенотипически зрелыми макрофагами, способствует также пролиферации эндотелиальных клеток, что улучшает васкуляризацию новообразованной ткани в зоне повреждения миокарда. Результаты нашего исследования подтверждают этот тезис, так как у животных опытной группы нами было отмечено усиление пролиферативной активности эндотелиоцитов.

Можно полагать, что введение аллогенного биоматериала и клеточная реакция на продукты его распада, также создают условия для проявления мезенхимными клетками относительно высокой пролиферативной активности, о чем свидетельствуют результаты иммуногистохимического исследования. Ранее с помощью проточной цитофотометрии было установлено, что в очаге имплантации аллогенного биоматериала происходит концентрация

не только моноцитов-макрофагов, но и мезенхимных клеток, несущих маркеры, указывающие на их костномозговое происхождение (13). Они могут определяться как полипотентные мезенхимные стволовые клетки, которые, в дальнейшем могут дифференцироваться как в фибробласты, так и в кардиомиоциты (14). Не исключена и регенерация мышечной ткани за счет пролиферации миокардиальных стволовых клеток, которые в небольшом количестве обнаруживаются в миокарде (15). Отсюда следует, что мезенхимные клетки, мигрирующие в поврежденный участок миокарда могут дифференцироваться преимущественно в фибробласты (в контроле) или в кардиомиобласты (в опытной группе). Направление дифференцировки, по-видимому, зависит от регуляции межклеточных взаимодействий макрофагами и уровня экспрессии трансформирующего фактора роста.

Таким образом, на основании проведенного исследования можно заключить, что аллогенный диспергированный биоматериал, введенный в миокард в постинфарктном периоде, стимулирует репаративную регенерацию с адекватным развитием микрососудистого русла и препятствует образованию грубоволокнистой рубцовой ткани, что позволяет в определенной степени восстановить трофику и архитектонику поврежденного участка миокарда.

Результаты проведенного исследования также дают основание для разработки методов коррекции ишемического повреждения миокарда в клинике с применением аллогенного диспергированного биоматериала.

Литература

1. Menasche Philippe. Cell transplantation in myocardium. Ann. Thorac. Surg., 2003; 75: 20-28.
2. Kofidis T., A. Lenz, J. Boublik, P. Akhyari, B. Wachsmann, K. M. Stahl, A. Haverich, R.G. Leyh. Bioartificial grafts for transmural myocardial restoration: a new cardiovascular tissue culture concept. Eur. J. Cardiothorac. Surg., 2003; 24: 906-911.
3. Papadaki M., N. Bursac, R. Langer, J. Merok, G. Vunjak-Novakovic and L. E. Freed. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001; 280: 1: 168-178.
4. Непомнящих Л. М., Лушникова Е. Л., Семенов Д. Е. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца: морфологические основы и молекулярные механизмы. М.: Издательство РАМН, 2003; 255 с.
5. Beltrami A. P., Urbaneck K., Kajstura J., et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. N. Engl. J. Med., 2001; 344: 1750-1757.
6. Муслимов С. А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. — Уфа: Башкортостан. 2000; 168 с.
7. Abraham D. J., Shiwen Xu, Black C. M. et al. Tumor Necrosis Factor α Suppresses the Induction of Connective Tissue Growth Factor by Transforming Growth Factor- β in Normal and Scleroderma. Fibroblasts J. Biol. Chem., 2000; 275: 15220-15225.

Полный список литературы см. на сайте www.urtj.ru

Рисунки к статье
С. И. Андриевских, С. А. Муслимова, А. В. Чукичева и Л. А. Мусиной
«Применение аллогенного диспергированного биоматериала
для стимуляции регенерации миокарда после ишемического
повреждения в эксперименте», стр. 91.

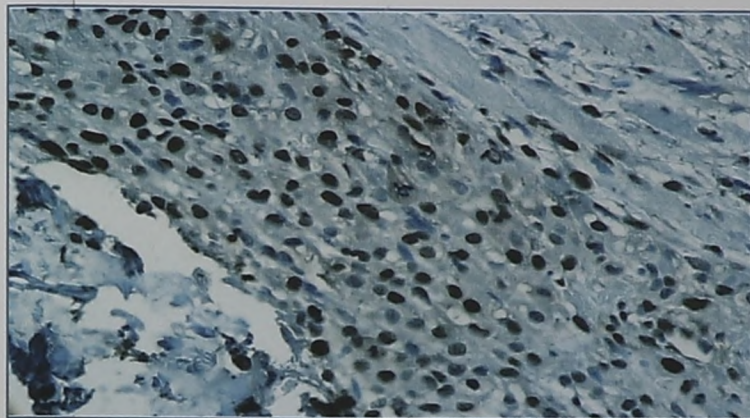


Рисунок 1.
Экспрессия PCNA
фибробластами
и мезенхимными
клетками через
3 суток после введения
биоматериала. Непрямой
иммунопероксидазный
метод выявления PCNA.
Докраска гематоксилином.
Увел. x280

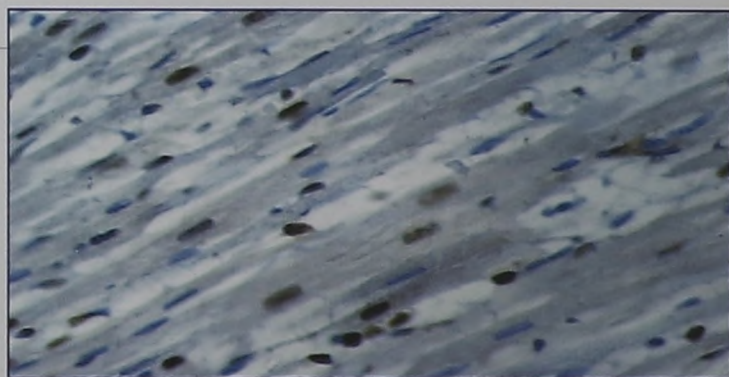


Рисунок 4.
Экспрессия PCNA
кардиомиоцитами через
21 сутки после введения
биоматериала. Непрямой
иммунопероксидазный метод
выявления PCNA. Докраска
гематоксилином. Увел. x280

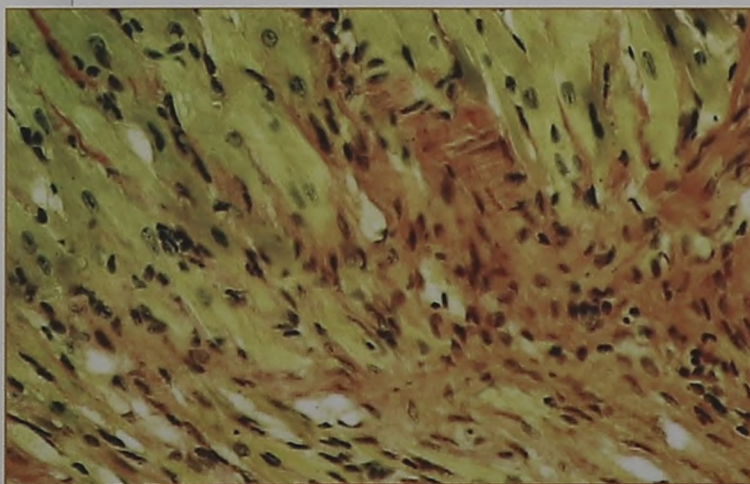


Рисунок 6.
Новообразованная ткань,
заместившая зону инфаркта
на 90 сутки после введения
биоматериала. Между
прослойками оформленной
соединительной ткани
определяются тяжи
мышечных волокон