

## Стимуляция аутологичных прогениторных и коммитированных клеток в ишемически поврежденном миокарде

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

Во всех тканях, включая миокард, присутствуют локальные клетки-предшественники. Стимуляция этих клеток может значительно повысить эффективность процесса регенерации. Продукты биodeградации, биоматериал Аллоплант (БМА), являются ингибитором фиброза и служат индуктором стволовых клеток в различных тканях организма включая гладкие и скелетные мышцы, соединительную ткань.

**Цель.** В условиях хронического эксперимента, определить клеточно-регенераторный потенциал прогениторных c-kit и коммитированных GATA-4 клеток в ишемизированном миокарде на фоне применения БМА.

**Материал и методы.** Использовали 100 крыс линии Вистар массой 180-200 г, которым было выполнено лигирование коронарной артерии. В опытной группе (n=50) одновременно с коронароокклюзией вводили 600 мкл физиологического раствора, содержащего 12 мг БМА. Проводили общегистологические (окраска гематоксилином и эозином, по Маллори), иммуногистохимические (c-kit, GATA-4) и морфометрические исследования (определение индекса площади рубца, подсчет окрашенных клеток). Статистическая обработка результатов проведена с применением ранговых методов — однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллесу и сравнения некоррелированных данных методом Манна-Уитни.

**Результаты.** При использовании БМА во время коронароокклюзии, миокард характеризовался статистически значимым ( $p < 0,0001$ ) преобладанием численности c-kit<sup>+</sup>/GATA-4<sup>+</sup> клеток на протяжении всего периода наблюдения (3-45 сут.). Эти клетки локализовались преимущественно в грануляционной ткани перирубцовой зоны, граничащей с сохранившейся сердечной мышечной тканью. В перирубцовой зоне кардиальные клетки имели различную степень зрелости — от малодифференцированных форм (без четких ультраструктурных признаков кардиомиогенной направленности), до юных кардиомиоцитов. В присутствии БМА коронароокклюзия характеризовалась статистически значимо меньшими значениями индекса площади рубца ( $p < 0,05 \div < 0,0001$ ).

**Заключение.** Продукты биodeградации БМА являются хемоаттрактантами для c-kit клеток и способствуют их дифференциации в кардиомиогенные GATA-4 клетки, что способствует более успешному восстановлению миокарда.

**Российский кардиологический журнал.** 2018;23(11):123–129  
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-11-123-129>

**Ключевые слова:** миокард, биоматериал Аллоплант, стволовые клетки, c-kit/GATA-4.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания: регистрационный номер НИОКР 115040870057 от 8.04.2015 г.

<sup>1</sup>ФГБУ Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава России, Уфа; <sup>2</sup>Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия.

Лебедева А. И.\* — д.б.н., с.н.с. отдела морфологии, ORCID: 0000-0002-9170-2600, Муслимов С. А. — д.м.н., в.н.с., зав. отделом морфологии, ORCID: 0000-0002-9076-0251, Гареев Е. М. — к.б.н., доцент, с.н.с. лаборатории нейрофизиологии, ORCID: 0000-0002-6561-0892, Попов С. В. — академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, директор, ORCID: 0000-0002-9050-4493, Афанасьев С. А. — д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, ORCID: 0000-0001-6066-3998.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
Jeol02@mail.ru

БМА — биоматериал Аллоплант, ИПР — индекс площади рубца.

Рукопись получена 02.02.2018

Рецензия получена 05.03.2018

Принята к публикации 12.03.2018

## Stimulation of autologous progenitor and committed cells in ischemically damaged myocardium

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

Local progenitor cells are present in all tissues, including the myocardium. Stimulation of these cells can significantly improve the efficiency of the regeneration process. Biodegradation products of Alloplant biomaterials (ABM) are an inhibitor of fibrosis and serve as an inducer of stem cells in various body tissues including smooth and skeletal muscles, as well as connective tissue.

**Aim.** To determine the cell regenerative potential of progenitor c-kit and committed GATA-4 cells in ischemic myocardium on the background of ABM application in chronic experiment.

**Material and methods.** 100 Wistar rats weighing 180-200 g were used, that underwent ligation of coronary artery. In the experimental group (n=50), 600 µl of a physiological solution containing 12 mg of ABM was administered simultaneously with coronary occlusion. General histological studies (hematoxylin and eosin staining, and staining as per Mallory), immunohistochemical (c-kit, GATA-4) and morphometric studies (determination of the index of the scar's area, counting of stained cells) were carried out. The statistical processing of the results was carried out using the rank methods — single factor dispersion analysis as per Kruskalou-Wallace and the comparison of uncorrelated data by the Mann-Whitney method.

**Results.** When using ABM during coronary occlusion, myocardium was characterized by a statistically significant ( $p < 0,0001$ ) prevalence of c-kit<sup>+</sup>/GATA-4<sup>+</sup> cells numbers throughout the follow-up period (3-45 days). These cells were localized mainly in the granulation tissue of the peri-cicatricial area, bordering

on the preserved cardiac muscle tissue. In the peri-cicatricial area, cardiac cells had a different degree of maturity — from poorly differentiated forms (without clear ultrastructural signs of cardiomyogenic orientation) to young cardiomyocytes. In the presence of ABM, coronary occlusion was characterized by statistically significantly smaller values of the index of the scar's area ( $p < 0,05 \div < 0,0001$ ).

**Conclusion.** ABM degradation products are chemoattractants for c-kit cells and promote their differentiation into cardiomyogenic GATA-4 cells, which contributes to more successful myocardium repair.

**Russian Journal of Cardiology.** 2018;23(11):123–129  
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-11-123-129>

**Key words:** myocardium, alloplant biomaterial, stem cells, c-kit/GATA-4.

**Conflicts of interest:** nothing to declare.

**Funding.** The study was conducted within the framework of the state assignment: NIOKR registration number 115040870057 from 08.04.2015.

<sup>1</sup>The Russian Eye and Plastic Surgery Center of RAS, Ufa; <sup>2</sup>Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre of RAS, Tomsk, Russia.

Lebedeva A. I. ORCID: 0000-0002-9170-2600, Muslimov S. A. ORCID: 0000-0002-9076-0251, Gareev E. M. ORCID: 0000-0002-6561-0892, Popov S. V. ORCID: 0000-0002-9050-4493, Afanasiev S. A. ORCID: 0000-0001-6066-3998.

Received: 02.02.2018 Revision Received: 05.03.2018 Accepted: 12.03.2018

Согласно современным представлениям, практически все известные тканевые системы содержат локальные клетки-предшественники. Однако информация о существовании и функционировании стволовых клеток в органах сердечно-сосудистой системе по-прежнему ограничена [1]. Данные последних лет свидетельствуют о наличии клеточного регенеративного пула в миокарде. Одними из таких клеток являются недифференцированные стволовые клетки *c-kit*<sup>+</sup>. Коммитированные *GATA 4*<sup>+</sup> клетки показывают раннюю кардиомиогенную направленность и относятся к кардиомиобластической клеточной форме [1]. Однако существует и противоположная точка зрения, где кардиомиогенная роль данных клеток ставится под сомнение, т.к. они обнаруживались в грануляционной ткани, которая в последствии трансформировалась в рубцовую [2].

Вопрос о стимуляции регенеративного потенциала миокарда до настоящего времени является открытым. Известно, что биоматериал Аллоплант (БМА) является индуктором стволовых клеток во многих тканях организма, включая соединительную ткань, а также гладкую и скелетную мускулатуру [3]. Доказано, что продукты биодеградации ингибируют процесс фиброобразования в тканях и тем самым способствуют росту и дифференциации клеток тканевого ложа [4].

Цель исследования: в условиях хронического эксперимента, определить клеточно-регенераторный потенциал прогениторных *c-kit* и коммитированных *GATA-4* клеток в ишемизированном миокарде на фоне применения БМА.

### Материал и методы

Исследования выполнены на самцах крыс линии Вистар массой 180-200 г. Всем животным, под внутримышечным наркозом (раствор золетила), было выполнено стенозирование *r. interventricularis paraconalis a. coronarii sin.* левого желудочка наложением шва “викрил” при левосторонней торакотомии. Рану засыпали антибиотиком и, удалив воздух из грудной полости, послойно зашивали. Части животным сразу после стенозирования коронарной артерии, в её бассейн интрамиокардиально делали инъекции 12 мг БМА, суспендированного в физиологическом растворе. Эти животные составили основную группу. Доза биоматериала была взята произвольно. Размер частиц БМА составлял 50-80 мк. Биоматериал Аллоплант<sup>®</sup> 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 при-

менению в клинической практике приказом МЗ СССР № 87901-87 от 22.07.1987 года. Для настоящего исследования аллогенный биоматериал был изготовлен из сухожилий крыс и диспергирован. Животные, которым не проводили инъекций БМА, составили контрольную группу. Животных выводили из опыта путем инсуффляции летальной дозы паров эфира на 3, 7, 14, 30, 45 сут. На каждую точку исследования использовали по 10 животных. При работе с животными руководствовались правилами лабораторной практики в Российской Федерации и Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, в соответствии с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [5]. Биоматериал Аллоплант<sup>®</sup> 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 приказом МЗ СССР № 87901-87 от 22.07.1987г. Для настоящего исследования аллогенный биоматериал был изготовлен из сухожилий крыс и диспергирован.

Сердца животных, выведенных из эксперимента, фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезжовивали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори.

Для иммуногистохимического исследования парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond<sup>™</sup> (Германия). В качестве первых антител применяли *c-kit* (клон *c-19*) и *GATA-4* (клон *G-4*) в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотин-систему детекции Leica BOND (Novocastra<sup>™</sup>, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Подсчет позитивно окрашенных клеток против антител к *c-kit*, *GATA-4* производили в 20 полях зрения каждого образца ( $n=6$ ) при увеличении  $\times 400$  в перифокальных зонах. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения и микроскопа AxioImager Z1, оснащенного фотонасадкой ProgRes C3 и программой анализа изображений Axiovision (C. Zeiss, Германия).

Для электронно-микроскопического исследования из сердечной ткани вырезали кусочки размером 1-2 мм<sup>3</sup> и фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленного на какодилатном буфере (рН 7,2-7,4) с дофиксацией в 1% растворе OsO<sub>4</sub> на том же буфере. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 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 безвод-

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

Для определения размера постинфарктного рубца миокарда каждое сердце нарезали поперек на 5 секторов. Из них изготавливали гистологические препараты и подвергали морфологической обработке. 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%.

Для статистического анализа использовали метод двухфакторного дисперсионного анализа. Анализ данных осуществлялся с применением непарметрических (ранговых) методов — однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллесу и сравнения некоррелированных данных методом Манна-Уитни. Построение диаграммы осуществлялось в программе Statistica 6,0.

### Результаты

На рисунке 1 представлена динамика численности c-kit<sup>+</sup> клеток в миокарде исследуемых групп животных. При определении c-kit<sup>+</sup> клеток в перинфарктной зоне их численность в зависимости от сроков наблюдения оказалась статистически значимой как в основной ( $\chi^2=46$ ;  $p<0,0001$ ), так и в контрольной группах ( $\chi^2=74$ ;  $p<0,0001$ ). В основной группе она обусловлена разницей между уровнями численности клеток через 3 сут. ( $n=39/69$ , мода 50) и 45 сут. после начала эксперимента ( $n=5/14$ , мода 6). Снижение количества c-kit<sup>+</sup> клеток происходило через 7 дней

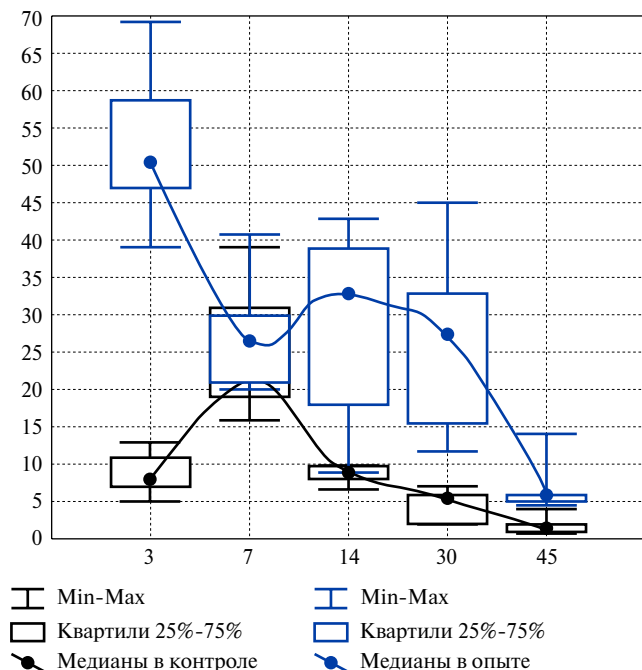


Рис. 1. Динамика численности c-kit<sup>+</sup> клеток в миокарде после применения БМА (синий цвет) и в контроле (черный цвет). По оси абсцисс — сроки наблюдения (сутки). По оси ординат — количество клеток в поле зрения.

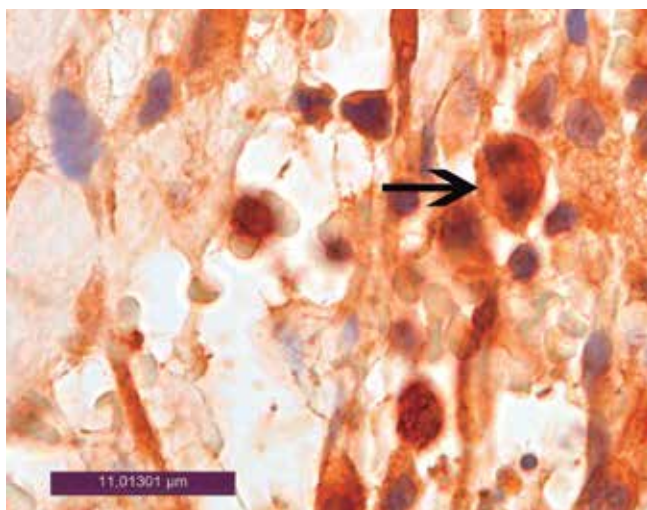
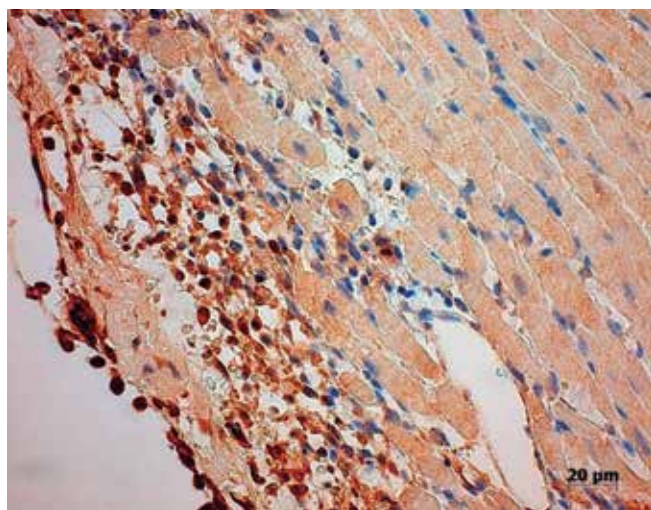
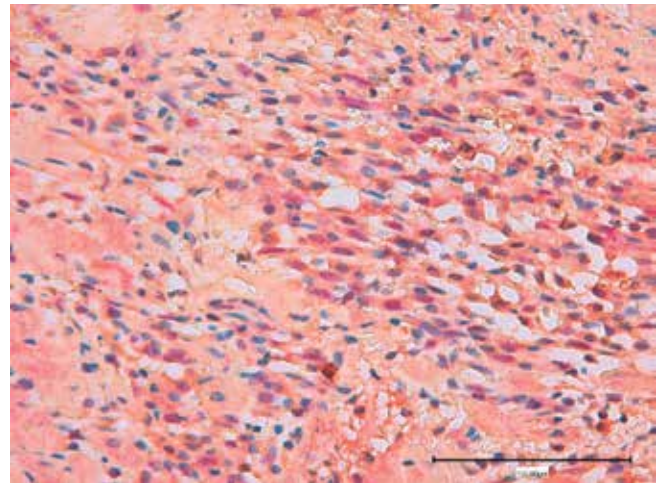
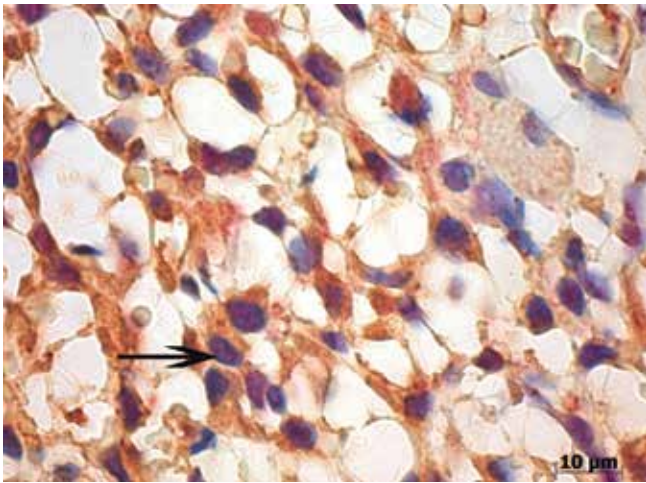


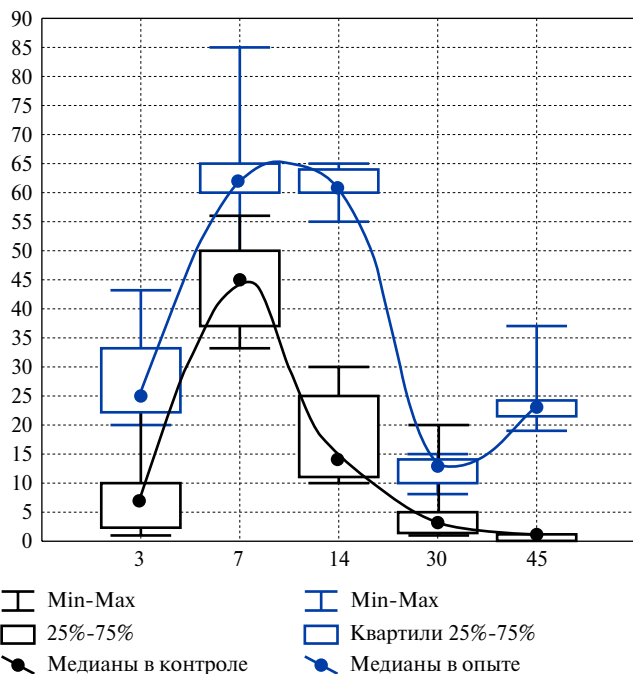
Рис. 2 (А, Б). С-kit<sup>+</sup> клетки в реактивной зоне ишемизированного миокарда через 3 суток после введения БМА. А — с-kit<sup>+</sup> клетки в эпикарде и в зоне введения биоматериала; Б — митоз клеток с-kit<sup>+</sup> (↑). Непрямой иммунопероксидазный метод выявления с-kit<sup>+</sup> клеток с докраской гематоксилином.



А

Б

**Рис. 3 (А, Б).** Скопления  $c\text{-kit}^+/GATA\text{-}4^+$  клеток в реактивной зоне миокарда через 14 суток после введения БМА. **А** — клетки ранней кардиомиогенной дифференцировки ( $\uparrow$ ), **Б** — скопления  $c\text{-kit}^+/GATA\text{-}4^+$  клеток в периинфарктной зоне миокарда. Непрямой иммунопероксидазный метод двойного иммуномечения клеток против  $c\text{-kit}$  (коричневое окрашивание цитоплазмы) и  $GATA\text{-}4$  (красное ядерное окрашивание) с докраской гематоксилином.



**Рис. 4.** Изменения численности  $GATA\text{-}4^+$  клеток в миокарде после применения БМА (синий цвет) и в контроле (черный цвет). По оси абсцисс — сроки наблюдения в днях. По оси ординат — количество клеток.

( $n=20/41$ , мода 27 ( $p<0,0001$ )). В сроки 14 и 30 дней статистически достоверных различий не наблюдалось ( $p>0,19 \div 0,57$  при попарном сравнении уровней на 7-й, 14-й и 30-й дни), т.е. их численность в интервале времени 7-30 сут. стабилизировалась. Через 45 сут. было значимое ( $p<0,0001$ ) снижение числа  $c\text{-kit}^+$  клеток.

К третьим суткам количество  $c\text{-kit}^+$  клеток в основной группе было в 6,25 раз выше ( $n=5/13$ , мода 8), чем в контрольной группе. К 7 суткам число  $c\text{-kit}^+$  клеток, в контрольной группе возросло ( $n=16/38$ , мода 21

( $p<0,0001$ )), однако уже в последующие сроки их содержание снижалось, достигая к 45 дню минимальных значений ( $n=1/4$ , мода 1,5).

На ранних сроках наблюдения  $c\text{-kit}^+$  клетки обнаруживались непосредственно возле частиц биоматериала, в эндомизии, перимизии, в эпикарде и в периваскулярном пространстве. Данные клетки часто выявлялись в состоянии митоза (рис. 2). Выявлялось двойное положительное иммуномечение клеток антителами против антигенов  $c\text{-kit}$  и  $GATA\text{-}4$  (рис. 3а). Причем,  $GATA\text{-}4^+$  клетки также обладали пролиферативной активностью и выявлялись в стадии митоза. Клетки  $c\text{-kit}^+/GATA\text{-}4^+$  локализовались преимущественно в грануляционной ткани перирубцовой зоны, граничащей с сохранившейся сердечной мышечной тканью (рис. 3б).

При определении  $GATA\text{-}4^+$  клеток оказалось, что их численность также значимо зависела от сроков наблюдения как в основной, так и в контрольной группах ( $\chi^2=75$ ;  $p<0,0001$  и  $\chi^2=63$ ;  $p<0,0001$ , соответственно) (рис. 4). При этом, уже к 3 суткам  $GATA\text{-}4^+$  клеток в основной группе было значимо больше ( $p<0,0001$ ), чем в контроле ( $n 20/43$  и  $n 1/31$ , соответственно, медианы 25 и 7, соответственно). К 7 суткам число  $GATA\text{-}4^+$  клеток в обеих группах статистически значимо возросло ( $n 49/85$  и  $33/56$ , медианы 62 и 45, соответственно,  $p<0,0001$ ). В последующие сроки эксперимента в контрольной группе численность  $GATA\text{-}4^+$  клеток, достоверно снижалась ( $n 0/1$ ). В основной группе количество  $GATA\text{-}4^+$  клеток практически не отличалось от такового на 14 день ( $p>0,63$ ). Значительное снижение их числа ( $n 8/15$ , медиана 13) отмечено только на 30 и 45 сутки ( $n 19/37$ , медиана 23,  $p>0,14$ ).

В перирубцовой зоне кардиальные клетки проявляли признаки различной стадии зрелости — от мало-

дифференцированных форм без четких ультраструктурных признаков кардиомиогенной направленности, до юных кардиомиоцитов. Малодифференцированные клетки были крупных размеров, овальной или округлой формы без признаков определенной функциональной специализации. Ядерно-цитоплазматическое отношение было  $\geq 1$ . Ядра были округлых размеров с равномерно распределенным эухроматином. Гетерохроматин в виде тонкой полоски локализовался пристеночно возле внутренней ядерной мембраны. В цитоплазме обнаруживались округлые митохондрии, многочисленные рибосомы и полисомы, короткие расширенные каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума.

В цитоплазме юных кардиомиогенных клеток определялись как разрозненные миофиламенты, так и короткие миофибриллы, собранные в саркомеры.



Рис. 5. Кардиомиогенные клетки различной степени дифференцирования в после введения БМА через 14 суток. 1 — юный кардиомиоцит, 2 — малодифференцированные клетки, экзоцитоз везикул ( $\uparrow$ ). Электронограмма.

На концах сократительных элементов располагались осмиофильные плотные округлые гранулы гликогена. В эктоплазме обнаруживались как одиночные везикулы мелкого размера, так и их скопления в виде кластеров, выходящие за пределы клетки. Клетки еще не формировали плотные клеточные контакты, межклеточные промежутки были расширены (рис. 5).

При сравнительном исследовании миокарда крыс основной и контрольной групп через 45 сут. после коронароокклюзии было установлено, что ИПР в основной группе оказался статистически значимо в 2,75 раз меньше, чем в контрольной группе (рис. 6). По нашим данным, ИПР в контрольной группе составлял  $26,65 \pm 16,1\%$ , а в основной только  $9,72 \pm 10,8\%$  ( $p < 0,05 \div < 0,0001$ ).

### Обсуждение

В настоящее время  $c\text{-kit}^+$  клетки, рассматриваются как региональные кардиальные стволовые клетки [6]. При этом отмечается, что их содержание в миокарде незначительно и не может покрыть дефицита утраченных кардиомиоцитов после повреждения.

В нашем исследовании стволовые  $c\text{-kit}^+$  клетки были идентифицированы в миокарде крыс обеих групп. Однако после применения БМА численность  $c\text{-kit}^+$  клеток в контрольных точках превышала количество клеток в контрольной группе. В основной группе стволовые  $c\text{-kit}^+$  клетки обнаруживались в непосредственной близости от зоны интрамиокардиального введения биоматериала Аллоплант, в эпикарде, между поврежденными кардиомиоцитами и в периваскулярном пространстве. При использовании БМА, уже к 3-м суткам было получено наивысшее значение численности  $c\text{-kit}^+$  клеток. Количество клеток в очаге поражения превосходило значения



Рис. 6 (А, Б). Поперечный срез миокарда через 45 суток после начала эксперимента. А — контрольная группа, Б — опытная группа. Окраска по Маллори.

контрольной группы почти в шесть раз, чему способствовала их миграция к частицам биоматериала.

Проведённые исследования показали, что динамика рассматриваемых клеток имела волновое течение. Второй подъем популяции  $c\text{-kit}^+$  клеток в период 7-14 сут., вероятно, связан с волнами митозов в регенерате, т.к. длительность G1/S периода составляет от 14 сут. до 2 лет [7]. По мере резорбции и замещения биоматериала тканеспецифичными элементами, миграция стволовых  $c\text{-kit}^+$  клеток приостанавливалась. В обеих группах крыс, этот период соответствовал окончанию гистопластических процессов в миокарде.

В контрольной группе максимальное присутствие  $c\text{-kit}^+$  клеток происходило только к 7 суткам и коррелировало с выраженностью коллагеногенеза. Вероятно, прогениторные клетки, несмотря на миграцию в зону поражения, не проявляли кардиомиогенной дифференцировки в достаточной мере и в дальнейшем под воздействием факторов микроокружения утрачивали свойства стволовости и приобретали фенотип клеток фибробластического дифферона.

Известно, что продукты биодеградации БМА являются хемоаттрактантами негематопоэтических предшественников мезенхимных клеток  $CD45^-/CD90^+$ , что было установлено с помощью проточной цитофлюориметрии [8]. В контрольной группе зона обнаружения  $c\text{-kit}^+$  клеток ограничивалась только эпикардом. Исходя из этого, можно говорить, что продукты биодеградации БМА являются хемоаттрактантом стволовых клеток из клеточных ниш и костного мозга. Это согласуется с данными о том, что прогениторные клетки обладают хемотаксисом к очагу повреждения и экспрессируют клеточный рецептор CXCR4 к фактору хоуминга SDF-1 [9].

$C\text{-kit}$  не является специфическим поверхностным маркером кардиальных стволовых клеток, на сегодняшний день таких специфических маркеров не обнаружено. Примитивные стволовые клетки обладают плюрипотентностью и могут трансформироваться в различные клеточные клоны [10]. Доказательством кардиомиогенной дифференцировки  $c\text{-kit}$  клеток после воздействия продуктов биодеградации БМА служит положительное иммунофенотипирование против антител стволовых клеток  $c\text{-kit}$  и GATA-4. В нашем исследовании, данные клетки активно пролиферировали — находились в стадии митоза. Этот результат даёт основание говорить, что использованный нами биоматериал Аллоплант является не только хемоаттрактантом стволовых клеток, но и индуктором дифференцировки клеток в органоспецифичном направлении — кардиомиоцитов.

Для того чтобы идентифицировать именно кардиомиогенные прогениторные клетки, в данной работе был применен иммуногистохимический метод выявления GATA-4 в клетках, ген которого является кардиальным маркерным геном, а сам белок — специфическим

фактором транскрипции кардиомиоцитов. Известно, что в клетках, GATA-4 выполняет функцию ключевого регулятора кардиальных генов, участвует в контроле сборки саркомеров в кардиомиоцитах и в их дифференцировке [11]. Полученные нами данные показали, что коммитированные стволовые клетки GATA-4 обнаруживались в реактивной зоне ишемически поврежденного миокарда преимущественно в перирубцовой зоне, граничащей с сердечной мышечной тканью. Анализируя динамику численности GATA-4<sup>+</sup> клеток в рассматриваемых группах животных, можно отметить, что в основной группе количество коммитированных малодифференцированных клеток превосходило число клеток в контрольной группе на всем протяжении исследования. Так, через 3 суток межгрупповой паттерн расхождений достигал трехкратных значений и практически сохранялся на этом уровне на всех сроках наблюдения. Увеличение количества клеток спустя 7 сут. являлось, по всей видимости, периодом дифференциации кардиомиобластов из стволовых клеток и их пролиферативной активности. Наивысшая численность GATA-4<sup>+</sup> клеток в основной группе пришлась на период 7-14 сут., затем она снижалась в связи с затуханием пластических процессов в миокарде. Однако определенный уровень этих клеток выявлялся и спустя 30-45 сут. В контрольной группе количество GATA-4<sup>+</sup> клеток уже к 7 суткам снижалось, а к 30-45 сут. достигало единичных значений.

Анализ ультраструктуры клеток показал гетерогенность кардиальных клеточных популяций в перирубцовой зоне. Нами отмечено, что скопления клеток GATA-4 после применения БМА присутствовали в большом количестве только в перирубцовой зоне. В центральной зоне ишемически поврежденного миокарда GATA-4<sup>+</sup> клетки не отмечались. А наличие развитого везикулярного аппарата и явление экзоцитоза наблюдалось у кардиомиоцитов. Вероятно, этим объясняется регуляция кардиомиогенеза в направлении от дифференцированных кардиомиоцитов к стволовым клеткам осуществляемая через паракринную систему и/или микро-РНК [12].

Известно, что в составе биоматериала Аллоплант преобладают коллаген, протеогликаны, гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота, кератан- и дермансульфат) [13]. Коллаген, являясь средством заместительной терапии в поврежденной ткани, ингибирует фибробластическую деятельность по типу обратной связи и участвует в торможении пролиферативной и коллагенсинтетической функции фибробластов [14]. Доказано, что биоматериал Аллоплант является ингибитором фиброза в скелетной мышечной ткани [4]. Продукты его резорбции становятся хемоаттрактантами для макрофагов M1 системы активации. Доминирующее влияние M1 фенотипа макрофагов способствует эффективному очищению раны от раневого детрита. А подавление численности

M2 макрофагов вызывает смещение и пролонгирование ростовой фазы, что содействует индукции элементов мышечной ткани [15].

### Заключение

Таким образом, результаты морфологических и морфометрических исследований показали, что биоматериал Аллоплант является хемоаттрактантом аутологичных стволовых клеток c-kit, а продукты его биодеградации способствуют дифференциации этих клеток в кардиомиогенном направлении — GATA-4. После использования аллогенного биоматериала площадь постинфарктного рубца была в 2,74 раз

меньше, по сравнению с контролем. Можно заключить, что интрамиокардиальное введение диспергированного биоматериала Аллоплант может значительно улучшить структуру формирующегося регенерата и снизить площадь постинфарктного рубца у экспериментальных животных.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания: регистрационный номер НИОКР 115040870057 от 08.04.2015г.

**Конфликт интересов:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Литература/References

- Anversa P, Kajstura J, Rota M, et al. Regenerating new heart with stem cells. *J Clin Invest.* 2013;123(1):62-70. doi:10.1172/JCI63068.
- Bergmann O. *Stadies of myocardial regeneration.* Stockholm. Published by Karolinska Institutet 2010. p 35. ISBN 978-91-7457-114-1.
- Lebedeva AI. Spongiform biomaterial — inductor misallocation in damaged skeletal muscle. *Uspechi sovremennoi biologii.* 2016;3:276-84. (In Russ.) Лебедева А.И. Аллогенный губчатый биоматериал — индуктор миосателлитозитов в поврежденной скелетной мышце. *Успехи современной биологии.* 2016;3:276-84.
- Lebedeva AI. Spongiform biomaterial — inhibitor of fibrosis of damaged skeletal muscle. *Russyskiy biotherapeuticheskiy journal.* 2014;4(13):37-44. (In Russ.) Лебедева А.И. Аллогенный губчатый биоматериал — ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани. *Российский биотерапевтический журнал.* 2014;4(13):37-44.
- Guidance on laboratory animals and alternative models in biomedical research. Ed. NN Karkishchenko, SV Grachev. M.: Profile-2c. 2010. p.358. (In Russ.) Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2с. 2010. с. 358.
- van Berlo JH, Kanisicak O, Maillat M, et al. C-kit<sup>+</sup> cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature.* 2014;509:337-41. doi:10.1038/nature13309.
- Lu L, Li F, Lu J. Identification of functional tissue-resident cardiac stem/progenitor cells in adult mouse. *Cell Biology International Reports.* 2012;1, Is.1:15-22. doi:10.1042/CBR20120001.
- Kurchatova NN, Siberyac SV, Khasanov RA, et al. Migration of mesenchymal stem cells in biomaterials ALLOPLANT: preliminary data. *Immunologiya Urala.* 2005;14:17-8. (In Russ.) Курчатова Н.Н., Сибирак С.В., Хасанов Р.А. и др. Миграция мезенхимальных стволовых клеток в биоматериалы ALLOPLANT: предварительные данные. *Иммунология Урала* 2005;14:17-8.
- Li L, Wu Sh, Liu Zh, et al. Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction Improves the Migration and Homing of Mesenchymal Stem Cells after Myocardial Infarction by Upregulating SDF-1/CXCR4: A Pilot Study. *Stem Cells Int.* 2015;14p. 691310. doi:10.1155/2015/691310 PMID: PMC4436519.
- Shahov VP, Popov SV. Stem cells and cardiomyogenesis in norm and pathology. *Tomsk 2004:4-38.* (In Russ.) Шахов В.П., Попов С.В. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии. *Томск* 2004:4-38.
- Oka T, Maillat M, Watt A, et al. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res.* 2006;98:837-45. doi:10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4.
- TianY, Liu Y, Wang T et al. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Science Translational Medicine.* 2015;7:279:279-338. doi:10.1126/scitranslmed.3010841.
- Lebedeva AI. Regulation of parenchymal-stromal relationship for the correction of defects of skeletal muscle allogenic biomaterial. *Experimental and clinical dermatocosmetology.* 2014;1:51-6. (In Russ.) Лебедева А.И. Регуляция паренхиматозно-стромальных взаимоотношений при коррекции дефектов скелетной мышцы аллогенным биоматериалом. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология.* 2014;1:51-6.
- Serov VV, Shehter AB. *Connective tissue.* M.: Medicina 1981:p 312. (In Russ.) Серов В.В., Шехтер А.Б. *Соединительная ткань.* М.: Медицина 1981:с. 312.
- 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 and inflammation.* 2015;14(1):27-33. (In Russ.) Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М. 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.