

М.В. ИЛЬИН, А.Г. ДРАГУНОВ, В.А. КОЗЛОВ, В.А. КИЧИГИН

**СТИМУЛЯЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА
ВВЕДЕНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ АУТОПЛАЗМЫ
В ЗОНУ ИШЕМИИ МИОКАРДА**

Ключевые слова: инфаркт миокарда, обогащенная тромбоцитами аутоплазма, ангиогенез, щелочная фосфатаза, сукцинатдегидрогеназа.

Через 1 месяц после поднаркозного моделирования у 10 беспородных кроликов инфаркта миокарда с помощью лигирования левой коронарной артерии 5 кроликам из подопытной группы в область сформировавшегося постинфарктного кардиосклероза интрамурально была введена обогащенная тромбоцитами аутоплазма в объеме 2 мл. Оставшиеся 5 животных служили контролем. Через 1,5 месяца после повторного оперативного вмешательства животные обеих групп были подвергнуты эвтаназии. В подопытной группе по сравнению с контрольной наблюдалось достоверное увеличение площади, занимаемой сосудами, на 50% ($p = 0,032$), активности щелочной фосфатазы на 14,8% ($p = 0,032$) и сукцинатдегидрогеназы на 7,0% ($p = 0,007$). Установлена сильная корреляционная связь площади, занимаемой сосудами, с активностью щелочной фосфатазы и сукцинатдегидрогеназы, что позволяет считать активность этих ферментов достаточно надежным морфологическим эквивалентом интенсивности микроциркуляции.

M. ILYIN, A. DRAGUNOV, V. KOZLOV, V. KICHIGIN

**ANGIOGENESIS STIMULATION BY INTRODUCING THROMBOCYTES-RICH AUTOPLASM
INTO ISCHAEMIC MYOCARDIAL ZONE**

Key words: myocardial infarction, platelet-rich autoplasm, angiogenesis, alkaline phosphatase, succinate dehydrogenase.

One month after myocardial infarction modeling under anesthesia by doping the left coronary artery in experimental group of 10 mongrel rabbits, platelet-rich autoplasm in the volume of 2 ml was injected intramurally into the region of post-infarction cardioclerosis of 5 rabbits. The remaining five animals served as controls. In 1.5 months after repeated surgical intervention, the animals of both groups were euthanized. In experimental group there was a significant increase in the area occupied by the vessels by 50% ($p = 0,032$), alkaline phosphatase activity by 14,8% ($p = 0,032$) and succinate dehydrogenase by 7,0% ($p = 0,007$) in comparison with control group. A strong correlation of the area occupied by vessels with the activity of alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase was established, which makes it possible to consider these enzymes' activity as a sufficiently reliable morphological equivalent of microcirculation intensity.

Значимость хронической ишемической болезни сердца (ХИБС) определяется ее распространенностью, инвалидизацией и смертностью. Число больных ХИБС в популяции составляет около 10%, и имеется тенденция к увеличению этой группы больных по мере увеличения средней продолжительности жизни [3]. Значительную часть больных ХИБС составляют пациенты с постинфарктным кардиосклерозом (ПИКС) [1], которым показаны хирургические вмешательства для коррекции нарушений системной и интракардиальной гемодинамики. Однако стентирование, аортокоронарное шунтирование не всегда достаточно эффективны и не влияют непосредственно на состояние ангиона миокарда.

Хирургические методы лечения, направленные на усиление ангиогенеза миокарда, могут оказаться хорошим дополнением «классических» хирургических методов лечения ХИБС [4]. Одним из таких вспомогательных методов ангиогене-

за является внутримышечное введение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы (ОбТП), которая используется для лечения хронической артериальной недостаточности нижних конечностей [7]. Есть все основания полагать, что данная методика, приводящая к усилению ангиогенеза [4, 6], может оказаться эффективной и для лечения другой сосудистой патологии, в частности ПИКС.

Цель работы – изучить в эксперименте на крупных лабораторных животных (кроликах) возможность применения и эффективность использования интрамиокардиального введения ОбТП для стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования стали 10 беспородных кроликов-самцов массой 2,5-4,5 кг. Животные содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также правил лабораторной практики при проведении доклинических испытаний в Российской Федерации (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

На первом этапе эксперимента всем животным воспроизводилась модель экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ) лигированием левой коронарной артерии у всех экспериментальных животных, в соответствии с рекомендациями [5]. Все оперативные вмешательства под общей анестезией золетилом осуществляли на базе ветеринарной клиники «Айболит» г. Чебоксары. Предоперационная подготовка животных включала в себя подкожное введение 0,1% раствора атропина из расчета 0,1 мл/кг/массы животного и дополнительного подкожного введения 2%-ного раствора ксилазина из расчета 0,75 мл/кг/массы животного. Анестезию осуществляли внутривенным введением 10%-ного раствора золетила из расчета 10 мг/кг массы. По мере необходимости для поддержания хирургической стадии наркоза золетил вводили в вышеуказанной дозе повторно. После достижения животным хирургической стадии наркоза производилась интубация трахеи с интубационной трубкой № 2,5.

Технология получения ЭИМ включала в себя левостороннюю переднебоковую торакотомию в 4-5 межреберье. После вскрытия плевральной полости и перикарда на работающем сердце выделяли и лигировали переднюю нисходящую коронарную артерию на расстоянии 1,0 см от верхушки сердца (рис. 1). Операцию завершали послойным ушиванием торакотомной раны с эвакуацией остаточного воздуха по временному дренажу. Профилактику послеоперационных гнойных осложнений осуществляли введением 5% Байтрила 0,5 мл внутримышечно один раз в день в течение 7 дней.

Через 1 месяца после моделирования инфаркта миокарда у всех выживших животных сформировались постинфарктный кардиосклероз и хроническая ишемия миокарда.

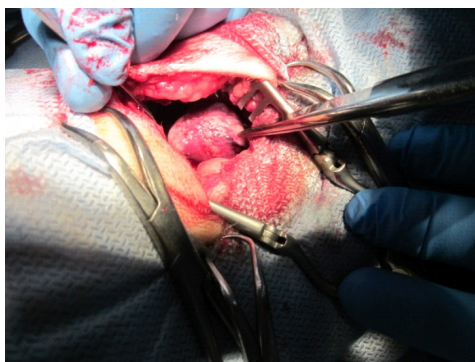


Рис. 1. Левосторонняя торакотомия с выделением верхушки сердца для наложения лигатуры на коронарную артерию

На втором этапе выполнялась собственно экспериментальная часть работы. Переживших 30 суток после моделирования ЭИМ кроликов разделили на две группы по пять животных в каждой: контрольная группа – повторное оперативное вмешательство без введения стимулятора ангиогенеза; подопытная группа – интраоперационное интрамиокардиальное введение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами.

В обеих группах за 30–40 мин перед проведением повторной торакотомии с целью стандартизации условий забирали кровь из периферического венозного катетера на передней лапе кролика в объеме 5,0 мл в силиконизированную пробирку с 0,6 мл 3,8%-ного раствора цитрата натрия. Из цитратной крови получали плазму с тромбоцитами методом однократного «мягкого» центрифугирования (лабораторная центрифуга «Армед 80-2S») в течение 10 мин с частотой вращения 1500 об./мин только у подопытных животных. Обогащенную тромбоцитами плазму в объеме около 2 мл забирали шприцем из среднего слоя разделенной крови в пробирки. Контроль содержания клеточных элементов в полученной плазме осуществлялся на гемоанализаторе Sismex KX-21N. Однократное центрифугирование увеличивало количество тромбоцитов в получаемом препарате по сравнению с аналогичным показателем в цельной крови в среднем в 1,8 раза.

При повторной левосторонней реторакотомии работающее сердце выделяли из спаек, визуально определяли область постинфарктного миокарда, который, как правило, располагался по передней стенке левого и правого желудочков и включал переднюю часть межжелудочковой перегородки. Затем в подопытной группе в зону ишемии вводили ОБТП в шесть точек в общем объеме около 2 мл (рис. 2). Повторная торакотомия завершалась послойным ушиванием торакотомной раны с эвакуацией остаточного воздуха по временному дренажу.

Через 1,5 месяца после повторного оперативного вмешательства проводили эвтаназию животных обеих групп с помощью воздушной эмболии. Сразу после эвтаназии у кроликов извлекали сердца, промывали их физиологическим раствором и проводили визуальную оценку полученного макропрепарата. В каждом случае оценивали линейные и гравиметрические параметры сердца, фотографировали рубцовые изменения стенки левого желудочка, в том числе наличие аневризмы левого желудочка. В области интрамиокардиального введения ОБТП осумкованных гематом, абсцессов и других послеоперационных осложнений ни в одном случае не обнаружено.

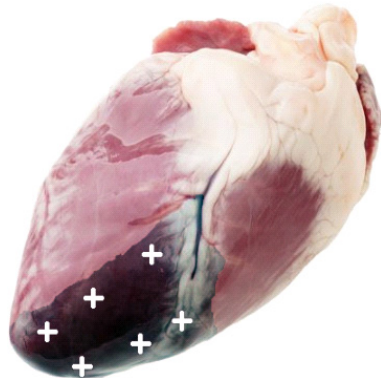


Рис. 2. Точки интрамиокардиального введения аутоплазмы с тромбоцитами

Сердце резалось в горизонтальной проекции от верхушки до основания в виде бубликов толщиной 0,4 см. На срезах оценивали цвет миокарда на всех уровнях, наличие рубцовых изменений, толщину стенки, наличие аневризм. Затем часть указанных фрагментов замораживали в криостате-микротоме МК-25 (Россия), из которых на разных уровнях изготавливали замороженные срезы толщиной 10 мкм, которые инкубировали с целью выявления активности щелочной фосфатазы (ЩФ) по Burston и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по Lojda [3, 8].

По каждому животному просмотрено по 5 срезов, окрашенных на ЩФ и СДГ, по 10 полей зрения в каждом срезе. В каждом поле зрения была измерена интенсивность светопропускаемости в красном проходящем свете. Показатель оптической плотности высчитывался по формуле: $D = \lg (J_0 : J_1)$, где D – оптическая плотность, J_0 – светопропускаемость на неокрашенной части стекла, J_1 – светопропускаемость на окрашенных участках среза ткани. После чего в каждом срезе была вычислена средняя D , которая служила статистической величиной. Кроме того, был подсчитан коэффициент: $D_{\text{сосуды}} / D_{\text{клетки}}$.

Другую часть фрагментов фиксировали в нейтральном формалине и заливали парафином. После чего изготавливали парафиновые срезы толщиной 5 мкм на микротоме МПС-2 (Россия), которые окрашивали гематоксилин-эозином.

Цифровые снимки микропрепаратов получены с применением системы архивирования на базе микроскопа Микромед-3 ЛЮМ с использованием цифровой фотокамеры и персонального компьютера с набором цифровых программ. Снимки сделаны при увеличении 400×.

Количественные морфометрические измерения выполнены с применением лицензионной программы «Микро-Анализ». Полученный цифровой материал обработан методами дескриптивной и вариационной статистики. Данные представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – средняя, σ – стандартное отклонение. Различия групп выявляли по методу Манна – Уитни (p_{m-u}). Корреляционный анализ между изучаемыми показателями проводили по Спирману (r_s). Методы непараметрического анализа использованы в связи с малым числом наблюдений. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Визуально на срезах, окрашенных на ЩФ, цитоплазма кардиомиоцитов была жёлтого цвета, строма бесцветная, стенки капилляров (эндотелиоциты) окрашены в различные по интенсивности и размерам участки синего цвета. На замороженных гистологических срезах активность ЩФ выявляется в местах, характеризующихся активным переносом биомолекул через биологические мембраны, происходящие с затратой АТФ, в данном случае – в эндотелиоцитах капилляров. Размеры и форма капилляров зависели от плоскости их прохождения в толще миокарда.

Площадь выявленной активности ЩФ была оценена методом автоматического выделения и подсчета площади интересующего цветового спектра по отношению к площади снимка. Затем числовые значения площади позитивной реакции переводились в процентное отношение к общей площади снимка. Для каждого снимка выполнены измерения не менее чем в 10 интересующих полях зрения.

На срезах, инкубированных с целью выявления активности СДГ, активность фермента выявлялась в цитоплазме кардиомиоцитов в виде гранул различных оттенков синего и фиолетового цветов.

Доля, занимаемая клеточными элементами (кардиомиоцитами), была сопоставима в обеих группах ($p > 0,05$). При этом доля препарата, занимаемая сосудами микроциркуляторного русла, в подопытной группе была в 1,5 раза выше (табл. 1). Соотношение площади, занимаемой сосудами, к площади, занимаемой кардиомиоцитами, в группах достоверно не отличалось. Возможно, это было связано с тем, что в подопытной группе была увеличена площадь, занимаемая кардиомиоцитами. Это могло быть следствием улучше-

ния микроциркуляции в миокарде и увеличением размеров кардиомиоцитов. Последнее просматривалось и на фотографиях образцов, где кардиомиоциты животных подопытной группы были крупнее, чем у животных контрольной группы.

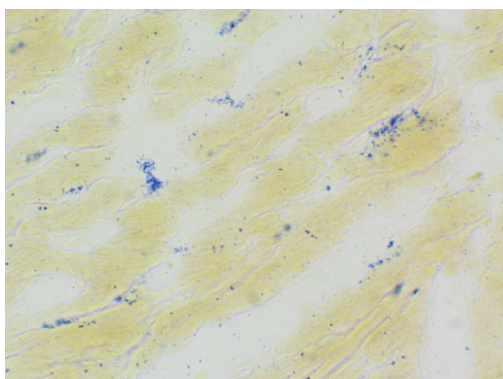


Рис. 3. Щелочная фосфатаза.
Ув. 400×. Контроль 03

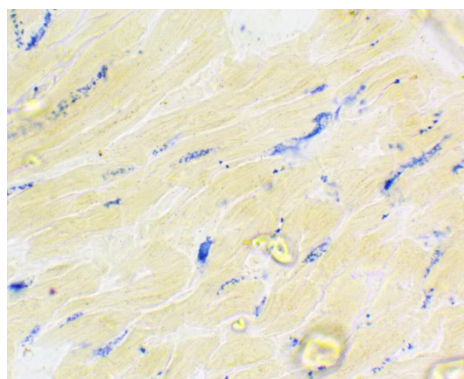


Рис. 4. Щелочная фосфатаза.
Ув. 400×. Опыт 03

Таблица 1

Морфометрические показатели и значения активности СДГ и ЩФ в изучаемых группах

Показатель	Группа		$P_{т-и}$
	подопытная ($n = 5$)	контрольная ($n = 5$)	
Кардиомиоциты, доля	0,462±0,048	0,443±0,134	0,841
Сосуды, доля	0,036±0,009	0,024±0,006	0,032
Коэффициент сосуды / кардиомиоциты, $\times 10^2$	7,756±2,092	5,61±1,758	0,095
СДГ, D	0,552±0,008	0,516±0,013	0,007
ЩФ, D	0,210±0,017	0,183±0,01	0,032

Примечание. Здесь и далее жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

Корреляционный анализ выявил сильную положительную связь площади, занимаемой сосудами, с активностью ЩФ и СДГ (табл. 2). Кроме того, активность СДГ коррелировала с коэффициентом сосуды/кардиомиоциты, отражающим кровоснабжение кардиомиоцитов.

Таблица 2

Корреляционные связи морфометрических показателей с активностью СДГ и ЩФ

Показатель	Кардиомиоциты	Сосуды	Коэффициент сосуды/кардиомиоциты	СДГ	ЩФ
Кардиомиоциты	–	0,20	–0,26	–0,06	–0,21
Сосуды	0,20	–	0,73*	0,78*	0,50*
Коэффициент сосуды/кардиомиоциты	–0,26	0,73*	–	0,67	0,21
СДГ	–0,06	0,78*	0,67	–	0,45
ЩФ	–0,21	0,50*	0,21	0,45	–

Таким образом, введение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы в область постинфарктного рубца улучшает состояние ангиона в поврежденной области.

Выводы. Разработана оригинальная модель улучшения микроциркуляции в зоне ишемизированного миокарда при экспериментальном инфаркте миокарда у кроликов путем введения аутоплазмы объемом 2 мл, обогащенной тромбоцитами по периферии зоны постинфарктного рубца в 6 точках.

По результатам применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в подопытной группе по сравнению с контрольной наблюдается достоверное увеличение площади, занимаемой сосудами, на 50%, $p = 0,032$, активности щелочной фосфатазы на 14,8 % ($p = 0,032$) и сукцинатдегидрогеназы на 7,0% ($p = 0,007$).

Установлена сильная корреляционная связь площади, занимаемой сосудами, с активностью щелочной фосфатазы и сукцинатдегидрогеназы, что позволяет считать активность этих ферментов достаточно надежным морфологическим эквивалентом интенсивности микроциркуляции.

Литература

1. Бокерия Л.А., Еремеева Н.В. Современное состояние и перспективы использования ангиогенеза в лечении ишемической болезни сердца // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2000. № 2. С. 57–61.
2. Лойда Э., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы / пер. с англ. И.Б. Бухвалова, О.В. Копьева. М.: Мир, 1982. 272 с.
3. Оганов Р.Г., Хальфин Р.А. Руководство по медицинской профилактике. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 464 с.
4. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы // Кардиологический вестник. 2007. № 2. С. 2–11.
5. Плечев В.В., Рисберг Р.Ю., Мустафин Т.И., Олейник Б.А., Двинских А.В., Плечева Д.В. Модель острого инфаркта миокарда // Медицинский вестник Башкортостана. 2012. № 1. С. 112–115.
6. Сопельняков В.В. Клинико-экспериментальное обоснование применения культуры эндотелиоцитов и ангиогенных факторов роста в ангиохирургии: автореф. дис. ...канд. мед. наук. СПб., 2004.
7. Эффективность стимуляции ангиогенеза после перенесенных реконструктивных операций с неполной реваскуляризацией или окклюзией протезов в отдаленном периоде / Ю.В. Александров, С.В. Поляков, А.Г. Драгунов и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. 2010. № 2. Прил. Материалы 22-й (XXII) Междунар. конф. Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов «Нерешенные вопросы сосудистой хирургии». С. 56–58.
8. Burstone M.S. Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. New York, London, Academic Press, 1962, 621 p.

References

1. Bokeriya L.A., Eremeeva N.V. *Sovremennoe sostoyanie i perspektivy ispol'zovaniya angiogeneza v lechenii ishemicheskoi bolezni serdtsa* [Current status and prospects for the use of angiogenesis in the treatment of ischemic heart disease]. *Grudnaya i serdechno-sosudistaya khirurgiya* [Thoracic and cardiovascular surgery], 2000, no. 2, pp. 57–61.
2. Loyda Z., Gossrau R., Schiebler T.H. *Enzyme Histochemistry. A laboratory manual*. New York, Springer-Verlag, 1979 (Russ. ed.: *Gistokhimiya fermentov. Laboratornye metody*. Moscow, Mir Publ., 1982, 272 p.).
3. Oganov R.G., Khal'fin R.A. *Rukovodstvo po meditsinskoj profilaktike* [A guide for health prevention]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2007, 464 p.
4. Parfenova E.V., Tkachuk V.A. *Terapevticheskii angiogenez: dostizheniya, problemy, perspektivy* [Therapeutic angiogenesis: achievements, problems, prospects]. *Kardiologicheskii vestnik* [Cardiology journal], 2007, no. 2, pp. 2–11.
5. Plechev V.V., Risberg R.Yu., Mustafin T.I., Oleinik B.A., Dvinskikh A.V., Plecheva D.V. *Model' ostrogo infarkta miokarda* [Model of acute myocardial infarction]. *Meditsinskii vestnik Bashkortostana* [Medical Bulletin of Bashkortostan], 2012, no. 1, pp. 112–115.
6. Sopol'nyakov V.V. *Kliniko-eksperimental'noe obosnovanie primeneniya kul'tury endotelioцитов i angiogennykh faktorov rosta v angiokhirurgii: avtoref. dis. ...kand. med. nauk* [Clinico-experimental substantiation of application of a culture of endothelial cells and angiogenic growth factors in angiosurgery. Abstract of PhD thesis]. St. Peterburg, 2004.

7. Aleksandrov Yu.V., Polyakov S.V., Dragunov A.G. et al. *Effektivnost' stimulyatsii angiogeneza posle perenesennykh rekonstruktivnykh operatsii s nepolnoi revaskulyarizatsiei ili okklyuziei protezov v otdalennom periode* [The effectiveness of the stimulation of angiogenesis after undergoing reconstructive surgery with incomplete revascularization or occlusion of the prosthesis in the remote period]. *Angiologiya i sosudistaya khirurgiya* [Angiology and vascular surgery], 2010, no. 2, pp. 57–58.

8. Burstone M.S. *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*. New York-London, Academic Press. 1962. 621p.

ИЛЬИН МИХАИЛ ВЛАДИМИРОВИЧ – старший преподаватель кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (ilyin-mv@mail.ru).

ILYIN MIKHAIL – Senior Lecturer, Department of Topographic Anatomy and Normal Operational Surgery, Chuvash State University, Russia, Cheboksary.

ДРАГУНОВ АНДРЕЙ ГЕННАДЬЕВИЧ – кандидат медицинских наук, заведующий кардиохирургическим отделением № 2, Республиканский кардиологический диспансер, Россия, Чебоксары (adragunov@yandex.ru).

DRAGUNOV ANDREY – Candidate of Medical Sciences, Head of the Cardiovascular Surgical Department № 2, Republican Cardiology Hospital, Russia, Cheboksary.

КОЗЛОВ ВАДИМ АВЕНИРОВИЧ – доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (pooh12@yandex.ru).

KOZLOV VADIM – Doctor of Biological Sciences, Candidate of Medical Sciences, Professor, Department of Medical Biology with Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary.

КИЧИГИН ВАДИМ АЛЕКСАНДРОВИЧ – кандидат медицинских наук, доцент кафедры факультетской и госпитальной терапии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (vadim-kichigin@mail.ru).

KICHIGIN VADIM – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Faculty and Hospital therapy, Chuvash State University, Russia, Cheboksary.
