

В. О. МИРАКЯН, И. Д. ШПЕРЛИНГ, К. В. МХИТАРЯН

О РЕЗУЛЬТАТАХ СТИМУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ
ПОТЕНЦИИ МИОКАРДИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖЕЛУДОЧКА
СЕРДЦА ВЗРОСЛЫХ КРЫС В ХОДЕ
РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ

Направленное изменение хода регенерационного процесса в различных органах и тканях является одним из актуальных вопросов современной биологии и медицины. Особое место уделяется поиску путей повышения регенерационной способности желудочковой мускулатуры сердца взрослых млекопитающих. Основная задача при разработке данной проблемы сводится к искусственной стимуляции гиперпластических процессов в мышечной ткани сердца и создании благоприятных условий для выживания и дифференцировки новообразованных мышечных волокон.

О положительном действии различных препаратов на ход регенерационного процесса в сердечной мышце сообщают многие авторы [1, 3, 18, 21, 24, 26].

Несмотря на большое теоретическое и прикладное значение подобного рода работ, выводы многих из них вызвали ряд возражений. Это связано с тем, что большинство исследований основано лишь на данных рутинного гистологического анализа, с помощью которого не всегда удается получить точную и надежную информацию о характере и скорости регенерационного процесса и, следовательно, об эффективности изучаемых препаратов. Однако автораддиография и цитоспектрофотометрия позволяют четко регистрировать пролиферативные процессы в тканях и применение этих методов в столь спорных вопросах, как доказательство регенерации мышцы сердца, является необходимым. Отсутствие таких исследований ставилось в упрек работам, вышедшим из лаборатории Л. В. Полежаева [20].

Мы решили проверить стимулирующее действие ряда препаратов (4-метилурацила, этаноламина, антилимфоцитарной сыворотки—АЛС и пирогенала) при трипсиновых повреждениях миокарда, используя при этом методы гистологического анализа и H^3 -тимидиновую автораддиографию.

Кроме этого, нами дублированы опыты Л. В. Полежаева и соавторов по изучению стимулирующего влияния гидролизата миокарда и его комплекса с пирогеналом при диатермокоагуляционном повреждении мышцы сердца. При этом строго соблюдались все условия опытов указанных авторов.

Предложенная нами новая модель повреждения миокарда с помощью трипсина основана на протеолитических свойствах фермента, который широко применяется также для получения роста миокардиальных клеток *in vitro* [4, 8, 30, 33].

При подборе агентов для стимуляции регенерационного процесса учитывались некоторые известные свойства вышеуказанных препаратов, в частности способность 4-метилурацила усиливать синтез белков [29], а также ускорять замещение участков некроза в зоне инфаркта миокарда рубцовой тканью [2], стимулирующее действие этаноламина [6, 7].

Применение АЛС в качестве стимулирующего агента диктовалось ее разрушающим действием на лимфоциты [34, 36], продукты распада которых, в частности нуклеотиды, нуклеозиды, возможно и свободные аминокислоты, обладают свойством стимулировать регенерационный процесс [27, 28, 31, 32].

О действии гидролизата миокарда и пирогенала подробно сообщается в монографии Л. В. Полежаева и соавт. [14].

Материал и методика. Работа выполнена на 300 белых беспородных крысах, весом 120—180 г. Трипсиновые некрозы левого желудочка сердца получали путем введения 0,02 мл 5% раствора трипсина в толщу стенки желудочка. Для диатермокоагуляционного повреждения миокарда левого желудочка использовали диатермокоагулятор марки ДКС-2. Доступ к сердцу осуществляли по методике Селье и соавт. [35].

Все животные были разделены на 8 групп: I группе (контроль) вводили трипсин, II—трипсин+4-метилурацил; III—трипсин+этаноламин, IV—трипсин+АЛС, V—трипсин+пирогенал, VI—диатермокоагуляция (контроль), VII—диатермокоагуляция+гидролизат миокарда, VIII—диатермокоагуляция+гидролизат миокарда+пирогенал.

4-метилурацил вводили внутривентрикулярно сразу после операции (200 мг на 1 кг веса животного), а затем 2 раза в день в течение 20 дней. Раствор этаноламина из расчета 1 мг на 100 г веса животного инъецировали подкожно, ежедневно в течение первых пяти дней; после 7-дневного перерыва делалось еще 3 инъекции. Пирогенал, полученный в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея, вводили по 0,3 мл (1 МПД) в течение 14 дней, АЛС—по 2 мл внутривентрикулярно через каждые 2 дня с 1-го по 20-й день после операции.

Для автордиографического анализа контрольным и подопытным крысам за 2 часа до забивки вводили H^3 -тимидин с удельной активностью 111 мк/мл в дозе 0,7—0,8 мкк/г. Для большей возможности выявления синтезирующих ядер, а также для анализа участия миогенных клеток прануляционной ткани в построении «регенерирующих» мышечных волокон 24 крысам (по 4 в I—V и VIII группах) H^3 -тимидин вводился многократно с 3 по 6 сутки. Забивка животных производилась на 6 и 14-е сутки (по 2 животных).

Животные умерщвлялись путем декапитации в разные сроки—от нескольких часов до 90 суток. Сердца фиксировались в смеси Карнуа и 10% формалине. Автографы изготовлялись с применением жидкой

эмульсии типа «М» и «Р» по методике Л. Н. Жинкина с соавт. [5]. Срезы окрашивались гематоксилин-эозином и азу-эозином. Для выявления аргирофильных волокон и степени коллатенизации очага повреждения часть препаратов импрегнировалась серебром по Гомори и окрашивалась по ван Гизону.

О пролиферативной активности мышечных клеток и клеточных элементов грануляционной ткани судили путем подсчета индекса меченых ядер (СИ) и митотического индекса (МИ) на 1000 ядер каждой категории от одного животного. Данные статистически обработаны с помощью стандартных значений критерия Стюдента для 95% доверительного уровня.

Результаты исследования. Очаг повреждения, вызванный введением трипсина, характеризовался более быстрым рассасыванием некротизированных мышечных волокон. На 3-ьи сутки опыта в грануляционной ткани почти не оставалось некротических масс. При диатермокоагуляционном повреждении остатки некротизированных волокон в грануляционной ткани обнаруживались и через 14 суток.

Клеточный состав грануляционной ткани, особенно в периферической зоне на границе с сохранным миокардом, через 3 суток был сходным (основную массу клеток составляли фибробласты, эпителиоидные, лимфоидные клетки, пистиоциты и миоциты Аничкова). Через 7 суток среди вытянутых клеток грануляционной ткани обнаруживались тонкие коллагеновые волокна. В последующие сроки число клеточных элементов уменьшалось, а количество коллагеновых волокон увеличивалось, и через 21 сутки зона поражения, в основном, замещалась рубцовой тканью.

В опытной группе животных в отличие от контрольной при трипсиновом повреждении миокарда срок завершения рубцевания был несколько короче.

При диатермокоагуляционном повреждении существенных различий между контрольной и опытными группами животных в сроки до 30 суток не наблюдалось.

Мышечные волокна, окаймляющие очаг поражения, в ранние сроки опытов часто претерпевали характерные реактивные изменения, которые заключались в увеличении ядер, ядрышек, базофилии околоядерной саркоплазмы. В отдельных волокнах отмечались вакуолизация и лизис саркоплазмы и ядер.

Следует отметить, что в ранние сроки исследования наблюдалась также своеобразная реакция миокардиальных клеток, которая приводила к формированию так называемых миобластов. В отдельных культовых и близлежащих мышечных волокнах на 3-ьи и 7-е сутки отмечалось набухание и просветление ядер с укрупнением ядрышек. Саркоплазма возле полюсов ядер становилась базофильной, теряла поперечную исчерченность при исследовании в обычном и поляризованном свете. Контуры базофильной саркоплазмы приобретали веретенообразную форму. Постепенно весь измененный ядерно-цитоплазматический комплекс сме-

Таблица 1

Индексы меченых мышечных ядер левого желудочка сердца крыс на разных стадиях посттравматической регенерации (однократная инъекция НЗ-тимидина)

Серия эксперимента	Сроки исследования (дни после операции)							
	3	7	10	14—15	20—21	30	45	60
Введение трипсина (контроль)	0 (3)	0(4);0,02(1)	0 (3)	0 (5)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
Введение трипсина и метилурацила	0 (3)	0(4);0,1(1)	0(2);0,2(2)	0 (4)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
Введение трипсина и этаноламина	0,1 (3)	0(3);0,1(1)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
Введение трипсина и АЛС	0(2);0,2(1)	0(5)	0(3);0,1(1)	0 (5)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
Введение трипсина и пирогенала	0 (3)	0(5)	0 (3)	0 (4)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
Диатермокоагуляция (контроль)	0,1 (2); 0(1); 0,3(1)	0(2);0,3(1)	—	0 (3)	0(2); 0,2(1)	0 (3)	—	—
Диатермокоагуляция и гидролизат миокарда	0,3(2);0,4(1)	0(2);0,4(1)	—	0(2);0,1(1)	0 (3)	0(2);0,1(1)	—	—
Диатермокоагуляция, гидролизат миокарда и пирогенал	0(2);0,3(2)	0,1(3)‡	—	0 (3)	0(2);0,1(1)	0 (3)	—	—

ПРИМЕЧАНИЕ: Цифры в скобках указывают число животных, для которых получен указанный индекс.

щался к боковой поверхности мышечного волокна и как бы сползал с него. Обособившиеся таким путем клетки имели все признаки так называемых миобластов. Они располагались изолированно или цепочками среди других элементов грануляционной ткани; ядра их включали радиоактивную метку и митотически делились. Однако вещество с анизотропными свойствами (миозин) в этих клетках не обнаруживалось. В дальнейшем по мере рубцевания грануляционной ткани они становились неотличимыми от фибробластов и терялись в рубцах.

Авторадиографический анализ показал, что, несмотря на реактивные изменения мышечных волокон, ядра последних практически не содержали метки радиоактивного тимидина. При подсчете более чем 200 000 ядер во все сроки эксперимента индекс меченых ядер у отдельных животных контрольных и опытных групп не превышал 0,06—0,1%, а у большинства животных равнялся нулю (табл. 1). В указанные значения СИ (табл. 1 и 2) вошли ядра, тканевая принадлежность которых к мышечному типу вызвала определенные сомнения. В то же время четкие картины, свидетельствующие о локализации меченого ядра внутри мышечного волокна, были единичны. Во всех сериях эксперимента число меченых мышечных ядер не возрастало также в опытах с многократным введением H^3 -тимидина (табл. 2).

На разных стадиях посттравматической регенерации миокарда в контрольных и опытных группах в очаге повреждения обнаруживались изолированно лежащие мышечные волокна, наличие которых нередко объясняют их новообразованием. Ядра таких мышечных волокон, как правило, не содержали метки радиоактивного предшественника в опытах с однократным и многократным введением H^3 -тимидина. Последнес

Таблица 2
Индексы меченых мышечных ядер левого желудочка сердца крыс при многократных инъекциях H^3 -тимидина

Серия эксперимента	Дни после операции	
	6	14
Введение трипсина (контроль)	0,3; 0,1	0; 0,1
Введение трипсина и метилурацила	0,1; 0,1	0; 0,2
Введение трипсина и этаноламина	0; 0;	0,1; 0
Введение трипсина и АЛС	0; 0,1	0; 0
Введение трипсина и пирогенала	0,2; 0	0; 0
Диатермокоагуляция, гидролизат миокарда и пирогенал	0,1; 0,3	0,4; 0,1

достаточно надежно свидетельствует об «остаточной» природе этих волокон, кажущаяся изолированность которых могла возникнуть в результате косой перерезки культевых мышц, а «молодой» вид—в результате вышеописанных реактивных изменений.

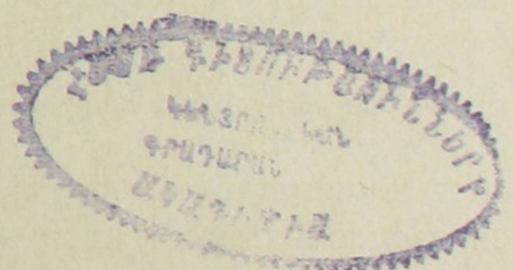
В противоположность мышечной ткани, ядра клеточных элементов грануляционной ткани и стромы миокарда интенсивно включали H^3 -тимидин и делились митозом. Максимальные величины СИ и МИ для

Индексы меченых ядер (СИ) и митозов (МИ) для клеточных элементов грануляционной ткани в процессе посттравматической регенерации миокарда левого желудочка сердца крыс (однократная инъекция H^3 -тимидина)

Таблица 3

Серия эксперимента	Срок исследования (сутки)															
	3		7		10		14–15		20–21		30		45		60	
	СИ M±m	МИ M±m	СИ M±m	МИ M±m	СИ M±m	МИ M±m	СИ M±m	МИ M±m	СИ M±m	МИ M±m	СИ M±m	МИ M±m	СИ M±m	МИ M±m	СИ M±m	МИ M±m
Введение трипсина (контроль)	2,16±0,03	1,86±0,26	2,26±0,04	1,16±0,03	2,73±0,09	0,90±0,05	0,84±0,18	0,26±0,04	0,33±0,01	—	0,62	—	0,1±0,001	—	0,03±0,01	—
Введение трипсина и этаноламина	*5,03±0,35	2,53±0,14	*6,98±0,01	*1,08±0,2	2,93±0,11	0,96±0,04	*0,18±0,03	0,24±0,02	*0,06±0,01	—	0,03±0,01	—	0,1±0,05	—	0,03±0,01	—
Введение трипсина и метилурацила	*3,06±0,07	2,50±0,05	*3,42±0,1	1,40±0,04	*6,63±0,12	0,70±0,05	*1,96±0,31	0,25±0,04	*0,70±0,05	—	0,23±0,03	—	0,1	—	0,03±0,01	—
Введение трипсина и пирогенала	*3,90±0,5	2,50±0,05	*6,54±0,17	1,21±0,03	*1,33±0,31	*0,64±0,04	*0,38±0,07	0,33±0,03	0,33±0,09	—	0,33±0,01	—	0	—	0,03±0,01	—
Введение трипсина и АЛС	*4,60±0,20	2,44±0,05	*4,50±0,3	*1,68±0,13	*0,5±0,1	0,70±0,07	*0,34±0,03	0,22±0,03	*0,06±0,03	—	0,03±0,01	—	0,06±0,02	—	0	—

ПРИМЕЧАНИЕ: Звездочкой указаны данные, при которых наблюдается статистически достоверная разница с контролем ($P < 0,05$).



клеточных элементов грануляционной ткани в контрольной группе обнаружены на 3—10-е сутки. В дальнейшем отмечалось резкое снижение указанных индексов, а к 60-му дню СИ не превышал 0,03% (см. табл. 3). В опытах с этаноламином, АЛС и пирогеалом значения СИ для клеток грануляционной ткани на 3 и 7-е сутки достоверно превышали контрольный уровень ($P < 0,001$). Стимулирующее действие 4-метилурацила на пролиферативную активность клеток грануляционной ткани проявлялось в течение более продолжительного периода (3—20-е сутки) с максимальной величиной СИ на 10-е сутки.

Заключение. Результаты проведенных экспериментов не выявили принципиальных различий в характере заживления трипсиновых и дна-термокоагуляционных повреждений миокарда. Как в контроле, так и при введении ряда препаратов зона повреждения во всех случаях замещалась грануляционной, а затем рубцовой тканью.

Данные автордиографического анализа показали, что независимо от способа повреждения миокарда не происходило дерепрессии синтеза ДНК в ядрах высокодифференцированных миоцитов желудочка сердца взрослых млекопитающих. Полученные значения СИ для мышечных клеток совпадали с таковыми и при других экспериментальных моделях [9, 19].

С помощью изученных препаратов нам не удалось деблокировать синтез ДНК и вызвать гиперплазию мышечных клеток.

При таком положении естественно допустить и иной способ новообразования мышечных волокон, механизм которого сводится к глубокой дедифференцировке миоцитов, высвобождению и последующей миграции их в центр очага поражения, где они могут пролиферировать и при определенных условиях встать на путь вторичной дифференцировки. Именно такой механизм регенерации мышечной ткани сердца путем индукции при применении различных препаратов, в том числе и гидролизата миокарда, допускает Л. В. Полежаев.

Если с первой частью подобного допущения можно в определенной степени согласиться, так как образование «миобластов» наблюдалось многими исследователями, то вторая часть его вызывает серьезные возражения. Современные методы изучения, в частности опыты с многократными инъекциями H^3 -тимидина, свидетельствуют об отсутствии вторичной дифференцировки так называемых миобластов в мышечные волокна. Если бы это происходило или если бы «миобласты» участвовали в регенерационной надстройке культовых мышечных волокон, ядра последних должны были содержать метку H^3 -тимидина. Однако в действительности этого не происходило. Следует отметить, что метапластическое образование миокардиальных волокон из немускульных клеток, допускаемое Л. В. Полежаевым, также сопровождалось бы появлением меченых ядер в волокнах, так как все виды молодых клеток, встречающихся в грануляционной ткани, способны включать в ядра радиоактивную метку.

Таким образом, с помощью изученных препаратов на разных моделях повреждения миокарда нам не удалось вызвать и стимулировать реактивную гиперплазию миокардиальных клеток у взрослых млекопитающих. Вместе с тем принципиальная возможность подобной стимуляции не исключается, и поиски ее путей должны быть продолжены.

Институт кардиологии
МЗ Арм. ССР

Поступило 1/III 1972 г.

Վ. Օ. ՄԻՐԱԿՅԱՆ, Ի. Դ. ՇՊԵՐԼԻՆԳ, Կ. Վ. ՄԵԽԻՏԻԱՆ

**ՄՐՏԻ ՓՈՐՈՔԻ ՄԿԱՆԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՊՐՈԼԻՖԵՐԱՏԻՎ
ԸՆԴՈՒՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԽԹԱՆՄԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ
ԱՌՆՅՆՆԵՐԻ ՄՈՏ, ՌԵՊԱՐԱՏԻՎ ՌԵԳԵՆԵՐԱՑԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ**

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Առնետների սրտի փորոքի տրիպոհային և դիաֆրմոկոագուլացիոն վնասվածքների ջնթացքում 4-մեթիլուրացիլը, էթանոլամինը, հակալիմֆոցիտար շինուկը, միոկարդի հիդրոլիզատը և պիրոգենայը չեն նպաստել մկանային հյուսվածքի նորագոյակցությանը:

Ռեգեներացիայի սկզբնական էտապում իթանվել է գրանուլացիոն հյուսվածքի էլեմենտների պրոլիֆերատիկ ակտիվությունը:

V. O. MIRAKIAN, I. D. SHPERLING, K. V. MEKHITARIAN

**THE STIMULATION RESULTS OF THE PROLIFERATIVE POTENTIAL
OF THE MYOCARDIAC TISSUES OF THE VENTRICLE OF THE
HEART IN GROWN-UP RATS DURING REPARATIVE
REGENERATION**

S u m m a r y

During the healing process of tripsin and diathermo-coagulation injuries of the ventricular muscles of the hearts of rats, 4-methyluracil, etanolamine, antisireptolycine serum, hydrolysate of the myocardium and pirogenal failed to promote the re-formation of muscular tissue. In the initial stages of regeneration they stimulated the proliferative activity of cellular elements of the granulation tissue.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Андреев С. В. Витаминные ресурсы и их использование. М., Изд-во АМН СССР, 1966, сб. 5, 168.
2. Бельский Е. Е., Рунин Ю. А., Туницкая Т. А. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1966, 10, 5, 62—64.
3. Виткус А. и Прашкевичюс А. Материалы конф., посвящ. 100-летию кафедры гистологии ВМА им. С. М. Кирова, 11—14 июля, 1968.
4. Геворкян Р. А. Автореф. канд. дисс. 1971.
5. Жинкин Л. Н., Завирзин А. А., Лебедева Г. С. и Андреева Л. Ф. Цитология, 1961, 3, 479.
6. Кадилов Е. В., Межлумян А. А. Материалы совещ. по проблеме «Условия регенерации органов и тканей у животных». М., 1966, 99.
7. Камалян Г. В. Коламин и его биологическое значение. Изд-во Мин-ва с.-х. Ереван, 1960.
8. Кочетов Н. Н. Докл. АН СССР, 1964, 3, 705—706.
9. Миракян В. О., Румянцев П. П. Цитология, 1968, 10, 964.
10. Полежаев Л. В., Ахабадзе Л. В., Захарова Н. А., Мантеева В. А. Изв. АН СССР, серия биол., 1959, 1, 16—32.
11. Полежаев Л. В., Ахабадзе Л. В., Захарова-Музаева Н. А., Явич М. П. Докл. АН СССР, 1961, 138, 714—717.
12. Полежаев Л. В., Ахабадзе Л. В., Захарова-Музаева Н. А., Явич М. П. Докл. АН СССР, 1962, 145, 1180—1183.
13. Полежаев Л. В., Ахабадзе

- Л. В., Захарова-Музлаева Н. А., Явич М. П. Грудная хирургия, 1963, 2, 47—54. 14. Полежаев Л. В., Ахабадзе Л. В., Музлаева Н. А., Явич М. П. Стимуляция регенерации мышцы сердца. Изд-во «Наука», М., 1965. 15. Полежаев Л. В., Колчин С. П., Ахабадзе Л. В., Солнцева Г. Н. Докл. АН СССР, 1966, 170, 4, 978—981. 16. Полежаев Л. В., Колчин С. П., Садокова И. Е., Латышева Н. И. Докл. АН СССР, 1967, 177, 6, 1489—1492. 17. Полежаев Л. В., Колчин С. П., Садокова И. Е., Латышева Н. И. Докл. АН СССР, 1969, 185, 2, 468—471. 18. Полежаев Л. В., Колчин С. П., Садокова И. Е., Малицова С. Д. и Латышева Н. И. В кн.: «Симпозиум по регенерации миокарда» Ереван, 1970, 14—16. 19. Румянцев П. П. *Folia histoch. et cytoch.* 1966, 4, 397. 20. Румянцев П. П. и Жинкин Л. Н. Журн. общ. биол. 1967, 28, 122. 21. Саидрасулов С. С. Изв. АН СССР, серия биол. 1963, 1, 99. 22. Синицын Н. П. Эксперимент. хирургия 1959, 1, 30. 23. Синицын Н. П. Материалы 3-й конф. по вопр. регенерации и клеточного размножения. М., Изд-во АМН СССР. 1962. 151. 24. Скуба Н. Д. Цитотоксины в современной медицине. 1966, 3, 77—84. 25. Скуба Н. Д. Арх патологии, 34, 1969, 39—43. 26. Скуба Н. Д. В кн.: Симпозиум по регенерации миокарда Ереван, 1970. 102—105. 27. Хрущов Г. К. Роль лейкоцитов крови в восстановительных процессах в тканях. М., 1945. 28. Хрущов Г. К. и Скурская М. Г. В сб. «Лимфоидная ткань в восстановительных и защитных процессах». М., 1966. 25—47. 29. Яковлев Н. Н. и Орещенко Н. И. В кн. «Применение пиримидиновых и пуриновых производных в хирургии и смежных областях медицины» (материалы конф). Ростов на Дону, 1970. 31—41. 30. Holtzer H., Abbott and Cavanaugh M. *Exp. Cell Res.* 1959, 16, 613—615. 31. Maruyama J. *Nature.* 1964, 201, 4914, 93—94. 32. Mitchell J., McDonald W., Nossal G. J. *Exd. Biol and Med. Sci.* 1963, 41, 411—422. 33. Pollinger J. *Exp. Cell Res.* 1970, 63, 1, 78—82. 34. Potworowski E., Nairn R. *Immunology.* 1968, 14, 4, 591—597. 35. Selye H., Bajus Z., Grasso S. and Mendell P. *Angiology.* 1960, 11, 396. 36. Wolksman B., Arboujs S., Arnason B. *J. exp. Med.* 1961, 114, 997.