

УДК 57.089.61

Моделирование инфаркта миокарда на мышцах: методология, мониторинг, патоморфология

А. А. Овсебян⁴, Д. Н. Панченков^{1,3}, Е. Б. Прохорчук^{1*}, Г. Б. Телегин⁴, Н. А. Жигалова¹,
Е. П. Голубев², Т. Е. Свиридова⁵, С. Т. Мацкеплишвили², К. Г. Скрябин¹, Ю. И. Бузиашвили^{1,2}

¹Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

²Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, 121552, Москва, Рублевское шоссе, 135

³Московский государственный медико-стоматологический университет, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20/1

⁴Филиал Учреждения Российской академии наук Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ), 142290, Пушкино, Московская обл., просп. Науки, 6

⁵Дорожная клиническая больница им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД», 129128, Москва, ул. Будаيسкая, 2

*E-mail: prokhortchouk@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 12.11.2010 г.

РЕФЕРАТ Инфаркт миокарда – одно из тяжелых и распространенных заболеваний в мире. Впервые в России разработан минимально инвазивный метод моделирования инфаркта миокарда у мышей с помощью лигирования коронарной артерии сердца или контролируемой электрокоагуляции. Налажен комплекс анестезиологических, микрохирургических и реанимационных мероприятий, достигнуто снижение послеоперационной летальности животных с 94.6 до 13.6%. Регистрация электрокардиограммы позволила диагностировать развитие крупноочагового или поверхностного инфаркта миокарда. В результате гистологических исследований очаги некроза выявлены в сердечной мышце 87.5% мышей. Диагностические данные позволяют говорить о возможности создания адекватной модели инфаркта миокарда на лабораторных мышцах. Дальнейшая отработка и стандартизация экспериментального инфаркта миокарда позволит применять данную модель к геномодифицированным линиям мышей, что важно для поиска эффективных способов лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА инфаркт миокарда, коронарная артерия, лигирование, контролируемая электрокоагуляция.

ВВЕДЕНИЕ

Важность моделирования инфаркта миокарда на животных, в первую очередь, обусловлена необходимостью изыскания и отработки оптимальных схем лечения этого заболевания с использованием новых подходов, включая фармакологическую и клеточную терапию. В силу гетерогенности понятия «инфаркт миокарда» у человека, множественных его проявлений, которые, возможно, отмечаются на отягощенном другой патологией фоне, например на фоне сахарного диабета или повышенного уровня содержания холестерина в крови, возникает вопрос – каким же образом создавать животные модели, отражающие

всю сложность этиологии этого заболевания? Общая идеология, положенная в основу выбора объекта для биомоделирования, должна удовлетворять следующим условиям: 1) удобство проведения операций на открытом сердце животного; 2) возможность использования геномодифицированных или селекционно выведенных линий животных с заданными особенностями моделируемого инфаркта; 3) возможность последующей стандартизации и сертификации на соответствие международным требованиям как самой технологии, так и лаборатории, в которой получают биомодели. Первые два условия находятся между собой в определенном конфликте, поскольку

обычно пригодность организмов для генетических исследований связана с их большой численностью и соответственно с маленькими размерами (классические генетические объекты – *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*), и это является очевидным ограничением на проведение хирургического вмешательства. Последнее же условие диктует необходимость получения модельных животных в количествах, достаточных для статистически достоверного проведения первой фазы доклинических испытаний новых фармацевтических препаратов или проведения клеточной терапии. С одной стороны, это вопрос надежности протокола хирургического вмешательства и послеоперационных восстановительных процедур, позволяющих повысить выживаемость животных, что, в свою очередь, масштабирует процесс получения биомоделей, а с другой – вопрос наличия в Российской Федерации сертифицированных мощностей и аппаратной базы для соответствующего рода работ. Находясь в своеобразных «ножницах» между размером животного и доступностью его генетических линий, исследователь так или иначе идет на компромиссы, которые могут отразиться на качестве проведения доклинических испытаний.

Для моделирования инфаркта нами были выбраны лабораторные мыши. Работа с этими животными налажена в Научно-производственном подразделении «Питомник лабораторных животных» ФИБХ, имеющем международную аккредитацию. Таким образом, в случае разработки и сертификации технологии согласно требованиям, предъявляемым Международной организацией по стандартизации (ISO), появится возможность не только использовать биомодели в фундаментальных научных исследованиях, но и поставлять их фармацевтическим компаниям в России и за ее пределами, поскольку проведение доклинических испытаний возможно только на стандартизованных модельных животных с особым статусом здоровья (обычно это SPF – Specified Pathogen Free животные), который как раз и поддерживается в питомнике ФИБХ. Основное преимущество мышей – развитая сеть их генетических ресурсов, острый недостаток которых наблюдается, к примеру, у родственных им крыс. При этом генетическое разнообразие инбредных линий мышей позволяет выделить животных, пригодных для исследования сердечно-сосудистых заболеваний. В частности, линии A/J и C3H/HeJ устойчивы к повреждению аорты при атеросклерозе, развивающемся при поддержании животных на атерогенной диете (1.25% холестерина, 0.5% холевая кислота и 15% жир), что отличает их от крайне чувствительных к атерогенной диете линий C57BL/6J и от частично устойчивых SWA/J [1–3]. У крыс также есть инбредные линии, которые

потенциально могут подойти для моделирования инфаркта (в этой связи стоит упомянуть популярную модель крыс SHR с повышенным артериальным давлением) [4]. Основное преимущество мышинных моделей состоит в возможности манипулирования с геномом мышинных эмбриональных стволовых клеток при очень слабой развитости такого рода технологий для крысиных клеток. Технологии трансгенеза, нокаута (knock-out) и нокина (knock-in) – как тканеспецифических, так и индуцибельных – дают возможность удалять, вставлять, а иногда и просто делать точечные замены в генах мышей.

Выбор генов всегда остается за исследователем, а многообразие такого выбора открывает удивительные перспективы для создания различных генетических аномалий, которые могут послужить фоном для самой модели инфаркта. Таким образом, технологию микрохирургического моделирования инфаркта можно применить к любой доступной генетической модели. Например, если нужно получить модель инфаркта на фоне повышенного уровня холестерина, то необходимо использовать мышшь с нарушенным геном аполиipoproteина 4E (*apoE4*), если же важно получить инфаркт на фоне кардиомиопатии, то необходимо использовать мышшь BALB/c или CD-1. В каталоге Джексоновской лаборатории (США) в разделе моделей для сердечно-сосудистых заболеваний числятся 373 линии, 20 из которых – селекционно выведенные инбредные линии, а остальные получены за счет генетических манипуляций более чем с 50 генами. Среди генетических моделей заболеваний, к которым потенциально возможно применить технологию микрохирургического моделирования инфаркта, можно упомянуть следующие: гипо- и гипертония, атеросклероз, кардиомиопатия, повреждение коронарных сосудов, различные метаболические синдромы, ишемия, гипо- и гиперхолестеринемия, гипо- и гипертриглицеридемия. Комбинация моделированного микрохирургическим путем инфаркта с генетическими моделями создает предпосылки для воспроизведения самых различных заболеваний сердца человека в мышях и последующего использования этих животных для клинических испытаний лекарственных препаратов и клеточной терапии. В последнем случае появляется возможность наблюдать за судьбой инъецированных в сердце (или сосуды) клеток, в которые введены различного рода флуоресцентные метки (например, зеленый флуоресцентный белок, GFP) или радиоактивные метки (мечение клеток изотопами). Вводимый клеточный материал не будет отторгаться у гомозиготных животных, места его интеграции можно будет без труда определять с помощью многосрезовой томографии, проводя тем самым прижизненный мониторинг эф-

фективности клеточной терапии. К очевидным недостаткам мышей относятся малый размер их внутренних органов и объем циркулирующей крови. Ныне существующие методики создания таких биомоделей на мышах сопровождаются высокой (до 90%) летальностью лабораторных животных [5–9], обусловленной высокой хирургической агрессией и большой кровопотерей [10–13]. Поэтому для успешного выполнения вмешательства необходимо наладить целый комплекс анестезиологических, микрохирургических и реанимационных мероприятий – интубацию трахеи мыши для вентиляции легких аппаратом ИВЛ, ингаляционный наркоз, бескровную торакотомию, лигирование левой нисходящей коронарной артерии, процедуры по восстановлению животных после хирургической модификации, снятие электрокардиограммы (ЭКГ), которые по методологии и техническому оснащению существенно отличаются от уже проводимых в России операций на крысах.

Цель настоящей работы – разработка, впервые в России, минимально инвазивной методики моделирования инфаркта миокарда у лабораторных мышей с комплексом послеоперационных мероприятий, направленных на реабилитацию оперированных животных и мониторинг их состояния в послеоперационном периоде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Предоперационный период и наркотизация

В работе использовали 48 мышей стока CD-1, пол смешанный, старше 8 недель, вес 32 – 36 г. За 24 ч до операции животных пересаживали в клетки с чистой подстилкой и водой. Из кормушек полностью убрали корм. Непосредственно перед операцией животных взвешивали и рассчитывали объем анестезирующих средств. Для обезболивания применяли инъекционный, смешанный золетил/ксилазиновый наркоз (золетил (тайлетамин+золазепам) 40–50 мг/кг, ксилазин 15–20 мг/кг живого веса животного). После хирургического наркоза и перед интубацией легких для нервно-мышечной релаксации при необходимости использовали официальный препарат ветранквил 1% (Ceva Sante Animale, Франция), содержащий ацепромазин 1% и хлоробутанол 0.5%, в дозе 2–4 мг/кг ацепромазина и 1–2 мг/кг хлоробутанола. Также для предотвращения высыхания роговицы у наркотизированного животного до начала хирургического вмешательства на глаза наносили гель Normlgel – 0.9% (Mölnlycke Health Care). Подготовку операционного поля осуществляли в области грудной клетки с левой стороны: шерсть выбривали, кожу обрабатывали дезинфицирующим раствором Декосепт (BORER CHEMIE AG, Швейцария) и дра-

Вес мыши, г	Порционный объем, мкл	Кратность подаваемого воздуха в минуту
22–27	175	130
28–35	200	120
35 и более	225	110

пировали стерильной адгезивной самоклеющейся пленкой Op-Site (Smith&Nephew, Англия) (рис. 1а). У всех животных сразу после наркотизации проводили ЭКГ (методика описана ниже). Для интубации легких мышей фиксировали в спинном положении на подогреваемом операционном столике. Интубационной трубкой (размер трубки – наружный диаметр 1–1.2 мм, внутренний диаметр 0.6–0.8 мм, длина 25–30 мм) производилась интубация трахеи (рис. 1б). К интубационной трубке подключали аппарат искусственной вентиляции легких MiniVent Ventilator for Mice (HSE Harvard, Германия (рис. 1в) с параметрами вентиляции – 30% инспираторной концентрации кислорода (генерируют с помощью медицинского кислородного концентратора серии «NewLife» (AirSep, США)). Расчетные величины объема и кратности подаваемого воздуха приведены в таблице.

Оперативный прием

Под контролем операционного стереомикроскопа (Leica MZ7.5, увеличение 10–25-кратное, рабочее расстояние 25–30 см) был произведен разрез кожи в 4-м межреберье слева (рис. 1г). Далее ножницами раздвигали мышцы грудной стенки (широчайший мускул спины, зубчатый вентральный и косой брюшной наружный мускул). Эти группы мышц берутся на лигатуры (шелк хирургический 3-0), и с их помощью мышцы раздвигают в противоположные стороны. Используя глазной остроконечный пинцет Eye dressing forceps, serrated, angled (Fine Science Tools, США) и ножницы, рассекали межреберную мышцу и париетальную плевру, после чего в рану устанавливали ранорасширитель Mini-Goldstein 3x3 (Fine Science Tools). Затем осторожно тупым путем рассекали перикард и с его помощью отодвигали легкое к краю раны, высвобождая переднюю (нижнюю) поверхность сердца (рис. 1д). Манипулируя в операционной ране пинцетом и перикардом, приводили сердце в положение, удобное для нахождения левой коронарной артерии. Она имеет ярко красный цвет и пульсирует. В середине нисходящей ветви коронарной артерии с помощью атравматичной иглы и нерассасывающейся нити Prolene 6/0 (Ethicon, США) накладывали лигатуру (рис. 1е). На правильность лигирования

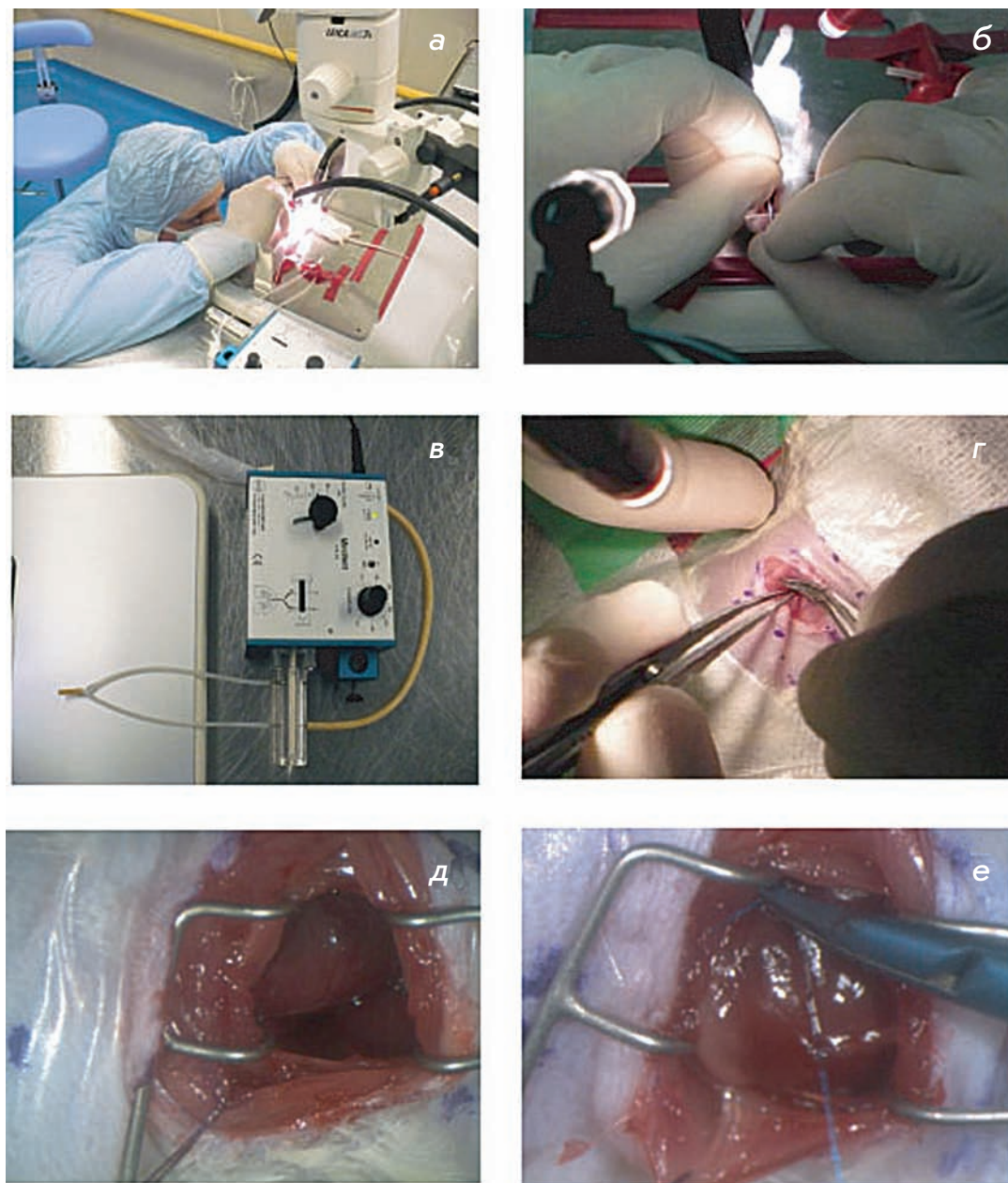


Рис. 1. Проведение предоперационных и операционных мероприятий при моделировании инфаркта миокарда у лабораторных мышей. а – Закрепление лабораторного животного на подогреваемом операционном столе; б – интубация трахеи; в – аппарат искусственной вентиляции легких MiniVent Ventilator for Mice; г – разрез кожи в 4-м межреберье слева; д – в операционной ране видна передняя (нижняя) поверхность сердца; е – лигирование нисходящей ветви коронарной артерии.

указывает быстро развивающаяся тахикардия, аритмия и анемия миокарда в области лигатуры. Затем возвращали на место перикард и легкое.

С учетом довольно значительной технической сложности идентификации коронарной артерии и ее лигирования, как вариант моделирования инфаркта миокарда, нами предложен способ создания зоны некроза при помощи электрокоагулятора. При этом способе моделирования инфаркта после выведения передней (нижней) поверхности сердца в операционную рану на миокард непосредственно воздействуют активным электродом электрокоагулятора,

что приводит к формированию зоны коагуляционного некроза.

После операционных мероприятий ребра вместе с плеврой ушивали двумя-тремя отдельными узловыми швами VICRYL 5-0 (Ethicon) и закрывали операционную рану в грудной стенке. Затем сдвигали отпрепарированные мышцы и плотно прижимали их друг к другу. Рану орошали стерильным физиологическим раствором. Далее на кожу накладывали непрерывный скорняжный шов, используя атравматичную иглу и рассасывающуюся нить VICRYL 4-0 (Ethicon), при этом пинцетом сдавливали



Рис. 2. Регистрация ЭКГ в послеоперационном периоде. К лабораторному животному, размещенному на подогреваемом операционном столике, подвели три электрода: по одному к левой (красный электрод) и правой (черный электрод) передним лапам, один (черный электрод) – к правой задней. На рисунке стрелочкой показана операционная рана, ушитая и покрытая алюминиевой суспензией Алюспрей.

грудную клетку в области раны так, чтобы удалить скопившийся воздух и создать отрицательное давление в грудной полости. Для защиты поверхности операционной раны кожу обрабатывали специальной суспензией микропористого алюминия Алюспрей (Vetoquinol, Франция), образующего тонкий слой алюминиевого покрытия на поверхности кожи (рис. 2).

Температурный режим

Для предотвращения возможного переохлаждения, связанного с наркотизацией в течение операции, животное находилось на подогреваемом операционном столике с температурой подогрева 32–34°C. Сразу после завершения операции животное переводили в камеру выздоровления Warm Air System (Vet Tech Solutions, Англия) с принудительной подачей подогреваемого (30–32°C) воздуха, обогащенного кислородом.

Послеоперационный период

Для послеоперационной анальгезии животному назначали ксилазин из расчета 10 мг/кг веса животного. После выхода из наркоза животное переводили в индивидуальную клетку. В клетку подавали увлажненный корм. При использовании рассасывающейся нити швы не снимают.

Регистрация параметров ЭКГ

Особая роль в диагностике инфаркта миокарда принадлежит ЭКГ. По изменениям ЭКГ можно определить локализацию инфаркта, его обширность и глубину – крупноочаговый, мелкоочаговый, интрамуральный, иногда также давность (в первые недели) и ряд других особенностей. Поэтому в нашей работе животным до и после лигирования коронарной артерии сердца и коагуляции для получения экспериментального инфаркта миокарда выполняли ЭКГ. Перед снятием ЭКГ мышь подвергали инъекционному наркозу с использованием золетил/ксилазинового раствора (золетил (тайлетамин+золазепам) 40–50 мг/кг, ксилазин 15–20 мг/кг живого веса животного). Затем мышь помещали в спинном положении на подогреваемый операционный столик и подвели три электрода: по одному к левой и правой передним лапам, один к правой задней лапе (рис. 2). Для измерения ЭКГ использовали аппарат – PowerLabSupport (ECG Analysis Module) (ADINSTRUMENTS, Австралия). Величину и продолжительность зубцов и интервалов устанавливали согласно предложенным параметрам программы ECG Analysis. Ширина процесса возбуждения и реполяризации составляла – 100 мс (Pre-P – 10 мс, PR – 50 мс, RT – 40 мс). ЭКГ измеряли до операции, через 5–10 мин после операции, на 3-й, 10-й и 30-й день после операции.

Морфологическое исследование

Морфологическому исследованию были подвергнуты 32 сердца мыши: в 21 случае инфаркт миокарда моделировали путем наложения лигатуры на левую коронарную артерию, в 11 случаях – контролируемой электрокоагуляцией участка миокарда. Все органы после их удаления помещали в 10% нейтральный формалин для фиксации на 1 сут. При макроскопическом исследовании сердца имели достаточно сходные размеры и вес: средний вес сердца мыши – 4 г, средний размер – 1.6 × 0.9 × 0.7 см. В 11 случаях, в которых некроз индуцировался контролируемой электрокоагуляцией, при макроскопическом исследовании на эпикарде левого желудочка определялся точечный след от электрода.

Для гистологического исследования каждое сердце разрезали на два кусочка вдоль межжелудочковой и межпредсердной перегородок и помещали в формалин комнатной температуры на 24 ч для дальнейшей фиксации. Далее кусочки промывали в проточной воде в течение 1–2 ч. Промытые кусочки подвергали обезвоживанию, используя несколько порций этилового спирта восходящей концентрации при комнатной температуре: в 70, 96 и дважды в 100% спирте (по 2 ч). Далее кусочки подготавливали к заливке в парафин: помещали в смесь спирта и ксилола (1 : 1)

на 2 ч при комнатной температуре и выдерживали в термостате при 60°C в смеси жидкого горячего парафина с ксилолом (1 : 1) в течение 2 ч. Обезвоженные и пропитанные парафином кусочки помещали в металлические формочки размером 2 × 2 × 2 см и вновь заливали растопленной парафиновой средой HISTOMIX (Biovitrum, Россия), получая при их остывании парафиновые блоки с кусочками органов в толще. Таким образом, из каждого сердца получались два парафиновых блока – с правыми или левыми отделами сердца и участками межжелудочковой и межпредсердной перегородок.

Цель гистологического исследования состояла в обнаружении очагов некроза миокарда, что потребовало изготовления серийных (последовательных) трансмуральных гистологических срезов толщиной 5 мкм из каждого блока через всю толщу сердечных стенок. Срезы изготавливали на ротационном микротоме марки ACCU-CUT SRM 200 (ACCU-CUT, Япония) и помещали на предметные стекла. Из каждого кусочка изготавливали в среднем 30 гистологических срезов. Далее срезы депарафинировали в растворе ксилотола в течение 15 мин и пропускали через порции этилового спирта с нисходящей концентрацией (дважды в 100% спирте по 3 мин и дважды ополаскивали в 96% спирте), после депарафинирования срезы промывали в дистиллированной воде и окрашивали гематоксилином Майера и эозином, окрашенные срезы покрывали полистиролом и заключали под покровное стекло.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты хирургического этапа

На первом этапе освоения метода моделирования инфаркта миокарда у лабораторных мышей было прооперировано 16 животных, 12 из которых выполнено лигирование коронарной артерии и четырем – контролируемая электрокоагуляция. ЭКГ в данной группе снимали у четырех животных. Летальность в этой группе составила 94.6%. В последующем животных этой группы в исследование не включали, приняв ее за группу отработки метода.

После отработки метода операции были проведены 32 животным (21 – лигирование коронарной артерии, 11 – контролируемая электрокоагуляция). При выполнении лигирования необходимо упомянуть следующие немаловажные детали и особенности. На всех описанных выше этапах операции крайне важно точное следование топографо-анатомическим ориентирам. В противном случае возможны возникновение неконтролируемого кровотечения и повреждение ткани легкого, что недопустимо, так как приводит к гибели лабораторного животного. После вскрытия перикарда следует визуализировать переднебоковую

стенку миокарда с проходящей там левой коронарной артерией. Вследствие малого диаметра последней, этап идентификации артерии представляет значительные трудности. Левая нисходящая ветвь коронарной артерии представлена опалесцирующим белесоватым тяжом, идущим в косопоперечном направлении относительно основного вектора операционного действия. После идентификации артерии под нее подводили синтетическую нить Prolene 6/0 на атравматичной игле. Артерию лигировали, формировали микрохирургический узел, концы нитей отсекали при помощи микрохирургических ножниц. На этапе лигирования артерии крайне важно точно контролировать толщину забираемой ткани, так как при слишком глубоком проведении иглы высока вероятность перфорации миокарда, что приводит к немедленному летальному исходу. Также важно правильное определение уровня наложения лигатуры, так как при наложении ее не на нисходящую ветвь, а на основной ствол левой коронарной артерии развивается обширный инфаркт миокарда, несовместимый с жизнью. Нами проведено сравнительное исследование различных типов шовного материала, используемого для лигирования артерии. В результате были выработаны критерии идеального для данной операции шовного материала. Это синтетический монофиламентный нерассасывающийся материал с отсутствием пилящего эффекта, примером которого может служить нить Prolene 6/0.

Среднее время операции в этой группе составило 57 мин (39–75 мин). Послеоперационная летальность, с начала экспериментов составлявшая 94.6% (в группе отработки методики), снизилась до 13.6%. Эти результаты соответствуют поставленным задачам и аналогичны представленным в литературе.

Показатели ЭКГ

У большинства мышей с экспериментальным инфарктом миокарда, вызванным лигированием коронарной артерии, после операции наблюдалось нарушение ритма – фибрилляция предсердий, и на 10-й день – ЭКГ-картина крупноочагового инфаркта миокарда, для которого характерно исчезновение зубца R, появление глубокого и широкого комплекса QS, подъем сегмента ST над изоэлектрической линией (рис. 3а–в). Формирование крупноочагового инфаркта наблюдалось и у некоторых мышей после коагуляции на 3-и и 9-е сут. В некоторых случаях коагуляция приводила к формированию поверхностного инфаркта миокарда (рис. 3г,д). В случае лигирования коронарной артерии сердца отмечено и возникновение тахикардии (патологический Q и снижение вольтажа R), переходящей в брадикардию на фоне инфаркта миокарда (рис. 3е,ж).

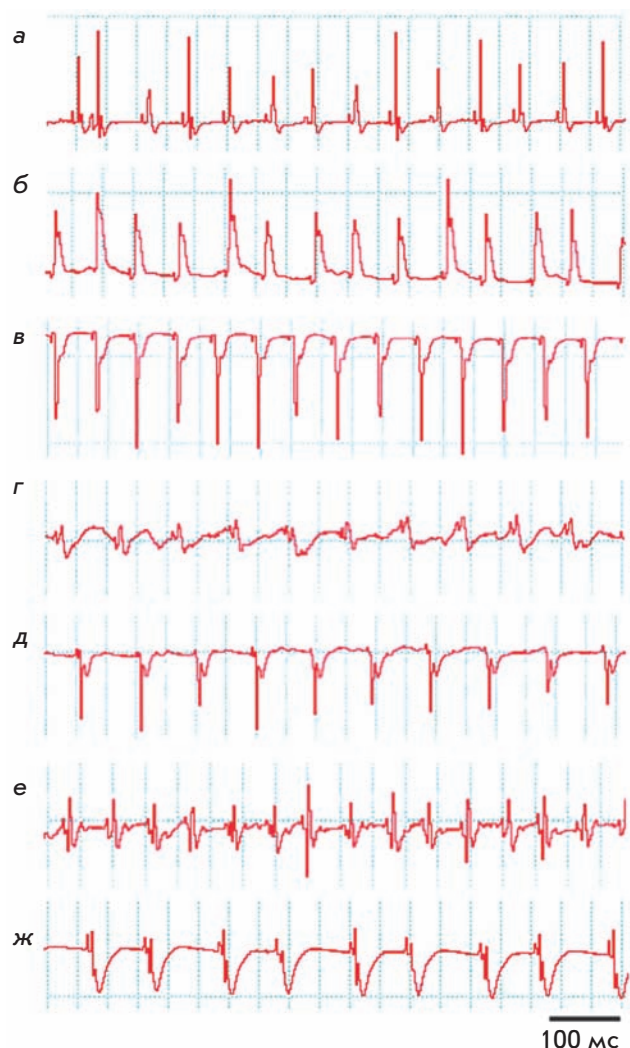


Рис. 3. ЭКГ-исследование лабораторных мышей. а – ЭКГ лабораторных мышей в норме до оперативного вмешательства; б – нарушение сердечного ритма через 5–10 мин после лигирования коронарной артерии; в – формирование крупноочагового инфаркта через 10 дней после лигирования коронарной артерии; г – результаты ЭКГ через 5–10 мин после коагуляции коронарной артерии; д – развитие поверхностного инфаркта через 10 дней после коагуляции коронарной артерии; е – развитие тахикардии через 5–10 мин после лигирования коронарной артерии; ж – развитие брадикардии на 3-й день после лигирования коронарной артерии. Ширина процесса возбуждения и реполяризации – 100 мс.

Результаты гистологического исследования

При гистологическом исследовании у 28 мышей (87,5%) выявлены очаги некроза, у 4 (12,5%) признаков некроза не обнаружено. Мыши, у которых некроз отсутствовал, относились к группе моделирования инфаркта путем наложения лигатуры на коронар-

ную артерию. Вероятно, это можно объяснить индивидуальными особенностями кровоснабжения сердца с хорошо развитой коллатеральной системой либо погрешностью метода. Известно большое количество анатомических типов кровоснабжения сердца человека, поскольку коронарные артерии широко варьируют в своем развитии, и, следовательно, удельный вес каждой из них в кровоснабжении левых и правых желудочков и предсердий в каждом случае также существенно колеблется. Помимо крайних форм – левовенечной и правовенечной, которые составляют 15% по данным Смольяникова и Наддачиной [14] – существует множество промежуточных форм кровоснабжения сердца. Можно предположить существование подобных особенностей кровоснабжения и в сердце мыши. Таким образом, в четырех случаях лигирование одной из коронарных артерий могло не повлиять на развитие инфаркта миокарда.

При моделировании инфаркта путем наложения лигатуры на коронарную артерию изменения обнаруживались в левом желудочке в виде мелких рассеянных очагов коагуляционного некроза групп кардиомиоцитов и их дезорганизации, отека стромы и кровоизлияний без воспалительной реакции (рис. 4а), в виде некроза отдельных клеток, что выражалось в исчезновении поперечной исчерченности саркоплазмы кардиомиоцитов и появлений апоптоза. Эти изменения обнаруживались в разных участках левого желудочка (рис. 4б).

В случае контролируемой электрокоагуляции участка миокарда выявлялась полоса прямого коагуляционного некроза эпикарда и подлежащего поверхностного слоя кардиомиоцитов в зоне воздействия электрода (рис. 4в). В более глубоких слоях миокард характеризовался фрагментацией мышечных волокон, что является гистологическим признаком прижизненной фибрилляции левого желудочка и отеком интерстиция (рис. 4в, г). Фибрилляция желудочков, по-видимому, связана как с прямым воздействием электрода на сердечную мышцу, так и с вторичной ишемией, вызванной повреждением местного коронарного кровотока. Со временем эти участки могут также подвергнуться некротическим изменениям, и зона некроза расширится.

Следует учитывать, что с патоморфологической точки зрения инфаркт – это разновидность некроза, обусловленного абсолютной или относительной недостаточностью артериального кровоснабжения в органах, лишенных доступа к кислороду. Поскольку в случае электрокоагуляции участка миокарда некротические изменения в сердце вызваны, прежде всего, прямым воздействием электрода, подобные изменения расценивать как истинный инфаркт миокарда нецелесообразно. В основе инфаркта миокарда

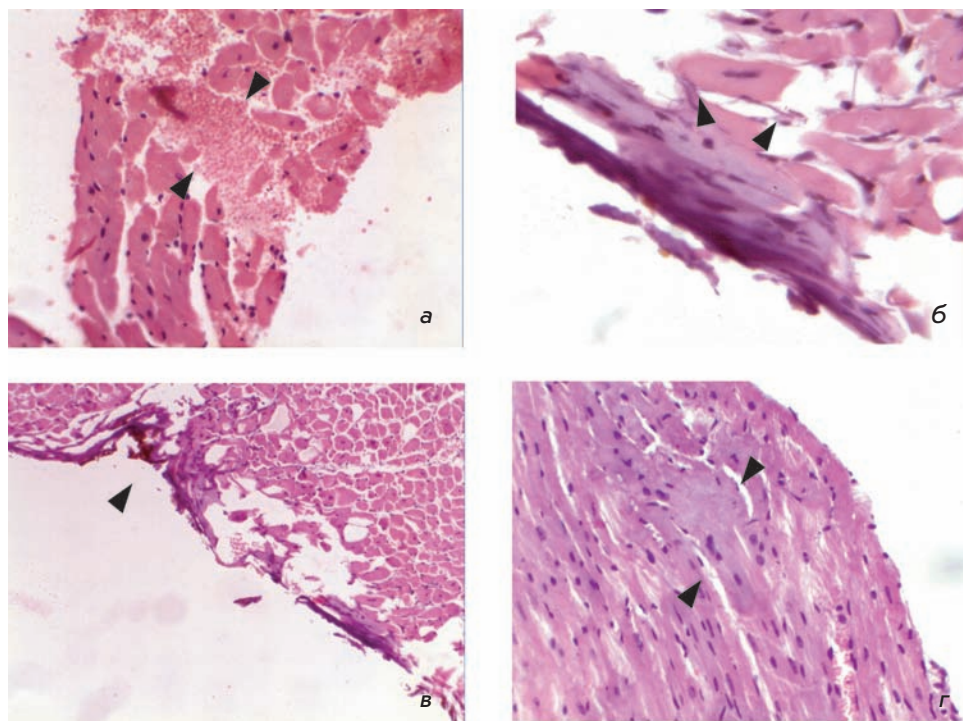


Рис. 4. Результаты гистологического исследования сердца лабораторных животных в результате моделирования инфаркта миокарда. а – Начинаяющийся коагуляционный некроз и дезорганизация кардиомиоцитов, отек стромы, кровоизлияние. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 20$; б – исчезновение поперечной исчерченности саркоплазмы кардиомиоцитов, фигуры апоптоза. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 60$; в – полоса прямого коагуляционного некроза эпикарда и подлежащего поверхностного слоя кардиомиоцитов в зоне воздействия электрода, отек интерстиция миокарда. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$; г – фрагментация мышечных волокон в результате фибрилляции. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$.

лежит коагуляционный (сухой) некроз кардиомиоцитов под воздействием гипоксии и развивающегося ацидоза тканей. Коагуляционный некроз развивается в тканях с низким содержанием жидкости, высоким содержанием белков и низкой активностью гидролитических ферментов. Другая разновидность гибели клеток, наблюдавшаяся в исследованном материале, – апоптоз.

Апоптоз – это генетически запрограммированная клеточная смерть, наблюдающаяся в норме в различных органах и тканях, особенно в тех, которые характеризуются постоянным обновлением клеток. Этот процесс осуществляется в результате активации определенных генов под воздействием различных стимулов. Путем апоптоза удаляются ненужные, «отработавшие» свой цикл клетки в ходе следующих процессов: эмбриогенеза, гомеостатической регуляции сохранения клеточной популяции в тканях, иммунной защиты, старения, а также при повреждении клеток различными патологическими факторами. В частности, гипоксия может вызывать апоптоз, если выраженность кислородной недостаточности не критическая, в то же время некроз клетки развивается при выраженном кислородном голодании. Гистологически наиболее очевидные изменения при апоптозе

касаются ядра. Хроматин конденсируется, образуя глыбки разной формы и размеров (кариопикноз), что при световой микроскопии проявляется в виде неправильных очертаний ядра и его гиперхромности. Аналогичную картину мы наблюдали при моделировании инфаркта путем наложения лигатуры на коронарную артерию. В дальнейшем в ходе апоптоза ядро клетки фрагментируется (кариорексис), цитоплазма делится на несколько связанных апоптозных телец путем формирования мембранных перемычек, в части цитоплазматических фрагментов ядерный материал может отсутствовать. Апоптозные тельца в итоге фагоцитируются окружающими здоровыми клетками или тканевыми макрофагами. В отличие от некроза, апоптозные тельца не вызывают ответного воспаления, поскольку целостность клеточной мембраны сохраняется до самого процесса фагоцитирования, что предотвращает выход клеточных ферментов в окружающие ткани и не вызывает хемотаксиса для клеток воспаления.

Таким образом, морфологическая картина изменений в группе мышцей, у которых инфаркт моделировали путем наложения лигатуры на левую коронарную артерию, и в группе с контролируемой электрокоагуляцией участка миокарда была разной. В первой

группе она характеризовалась наличием мелких рассеянных очагов некроза и очагов апоптоза в разных участках левого желудочка, что обусловлено большой площадью ткани, подвергшейся гипоксии. Незначительность очагов некроза при лигировании устья коронарной артерии, вероятно, обусловлена хорошо развитой сетью кровоснабжения между бассейном левой и правой коронарных артерий и отсутствием атеросклеротического поражения артерий. Во второй группе изменения имели характер локального поражения миокарда, вызванного преимущественно прямым поражением ткани. Согласно общепринятой среди морфологов стадийности инфаркта миокарда, обнаруженная гистологическая картина начинающегося коагуляционного некроза кардиомиоцитов, отека и кровоизлияний без воспалительной реакции соответствует давности инфаркта около 4–12 ч. Необратимые изменения в миокарде при наступлении критической ишемии начинаются уже через 0.5 ч, однако ни макроскопически, ни гистологически на этом этапе они не видны, обнаружить эти изменения можно только при электронно-микроскопическом исследовании. Только через 4 ч появляется незначительная внешняя пестрота ткани, и при гистологическом исследовании обнаруживаются вышеописанные изменения. После 12 ч от начала развития инфаркта усиливаются некротические изменения клеток с карioreксисом ядер и появляются первые лейкоциты. Через сутки отмечаются хорошо выраженные некроз кардиомиоцитов и интерстициальная инфильтрация нейтрофилами. На 4-е сут начинается фагоцитоз погибших кардиомиоцитов, к 10-м сут появляется грануляционная ткань в краях зоны инфаркта. Через 2 недели завершается замещение зоны инфаркта грануляционной тканью, появляется коллаген, и в течение последующих 6 недель формируется рубцо-

вая ткань. Обнаруженные нами изменения в первой группе сердец мышцы соответствуют ранней стадии инфаркта миокарда.

ВЫВОДЫ

Полученные нами в ходе данной работы результаты позволяют заключить, что оптимальным алгоритмом анестезиологического обеспечения при проведении операции моделирования инфаркта миокарда является инъекционный, смешанный золетил/ксилазиновый наркоз с миорелаксантами и искусственной вентиляцией легких. Соблюдение правильного температурного режима при работе с лабораторными мышцами стока CD-1 в пред-, интра- и послеоперационном периоде позволяет минимизировать смертность у лабораторных животных по нехирургическим причинам. Точное следование заданным топографо-анатомическим ориентирам при выполнении этапа торакотомии и перикардотомии позволяет минимизировать интраоперационную кровопотерю и возможность повреждения ткани легкого при осуществлении оперативного доступа. Оптимальным шовным материалом для лигирования нисходящей ветви левой коронарной артерии является Prolene 6/0. Согласно данным ЭКГ и постмортального гистологического исследования, предлагаемая методика позволяет говорить о создании принципиально корректной модели инфаркта миокарда на лабораторных мышцах, однако эта модель нуждается в отработке и изучении с целью дальнейшей стандартизации в соответствии с международными требованиями. ●

Работа поддержана Программой Министерства образования и науки (ГК 02.467.11.3010 и Соглашение 01.168.24.004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burgueño A.L., Landa M.S., Schuman M.L., Alvarez A.L., Carabelli J., García S.I., Pirola C.J. // *Metabolism*. 2007. V. 56(10). P. 1439–1443.
- Cascio W.E., Cozzi E., Hazarika S., Devlin R.B., Henriksen R.A., Lust R.M., van Scott M.R., Wingard C.J. // *Inhal Toxicol*. 2007. V. 19. P. 67–73.
- Matsuzawa N., Takamura T., Kurita S., Misu H., Ota T., Ando H., Yokoyama M., Honda M., Zen Y., Nakanuma Y., et al. // *Hepatology*. 2007. V. 46(5). P. 1392–1403.
- Cohen J.K., Cai L.Q., Zhu Y.S., La Perle K.M. // *Comp. Med*. 2007. V. 57(4). P. 370–376.
- Denvir M.A., Sharif I., Anderson T., Webb D.J., Gray G.A., McDicken W.N. // *J. Am. Soc. Echocardiogr*. 2005. V. 18(2). P. 155–162.
- Lee S., Schwinger R.H., Brixius K. // *Pflügers Arch*. 2008. V. 455(5). P. 767–774.
- Moura R., Tjwa M., Vandervoort P., Cludts K., Hoylaerts M.F. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007. V. 27(10). P. 2163–2169.
- Nogueira B.V., Peotta V.A., Meyrelles S.S., Vasquez E.C. // *Arch. Med. Res*. 2007. V. 38(8). P. 816–821.
- Rajasingh J., Bord E., Hamada H., Lambers E., Qin G., Losordo D.W., Kishore R. // *Vet. Res. Commun*. 2007. V. 31. P. 35–41.
- Simpson E.R., Jones M.E. // *Ernst Schering Found. Symp. Proc*. 2006. V. 1. P. 45–67.
- Son N.H., Park T.S., Yamashita H., Yokoyama M., Huggins L.A., Okajima K., Homma S., Szabolcs M.J., Huang L.S., Goldberg I.J. // *J. Clin. Invest*. 2007. V. 117(10). P. 2791–2801.
- Tang Y., Liu W., Yu S., Wang Y., Peng Q., Xiong Z., Wang Y., Wei T. // *Plast. Reconstr. Surg*. 2007. V. 120(4). P. 869–878.
- Wang G.S., Kearney D.L., De Biasi M., Taffet G., Cooper T.A. // *J. Clin. Invest*. 2007. V. 117(10). P. 2802–2811.
- Смолянников А.В., Наддачина Т.А. Патологическая анатомия коронарной недостаточности. М.: Медицина, 1963.