

На правах рукописи

КУЗЬКИН

Сергей Александрович

**ПАТОМОРФОЛОГИЯ МИОКАРДА ПРИ ТРАВМЕ
КОСТНОЙ ТКАНИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ПРИМЕНЕНИИ ЭКЗОСОМ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

3.3.2 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Институте молекулярной патологии и патоморфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук

Майбородина Виталина Игоревна

Официальные оппоненты:

Кливер Евгений Эдуардович, доктор медицинских наук, заведующий отделением патологической анатомии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н.Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Новосибирск).

Овсянко Елена Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анатомии человека имени академика Ю.И. Бородина ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (Барнаул).

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2022 г. в _____ час. на заседании совета 24.1.242.03 в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Терапия на основе мультипотентных стромальных клеток (МСК) рассматривается как один из многообещающих подходов к лечению заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе и ишемической болезни сердца. МСК костно-мозгового происхождения успешно прошли клинические испытания III фазы, последовавшие за интенсивной *in vitro* и доклинической оценкой эффективности на экспериментальных моделях ишемического повреждения миокарда. Мультипотентные стромальные клетки (МСК) представляют собой клеточный инструмент с хорошим потенциалом для регенеративной медицины из-за их сильных иммуносупрессивных и репаративных способностей. Сердце взрослого человека имеет ограниченные регенераторные потенциалы, поэтому возможность применения МСК для стимуляции тканеспецифической регенерации миокарда рассматривается в качестве перспективного подхода к восстановлению сердечной мышцы. Несмотря на то, что введение МСК в ряде случаев приводило к временному улучшению сократимости миокарда, образование новых кардиомиоцитов в поврежденном миокарде не было убедительно показано, поэтому выяснение механизмов, с помощью которых МСК оказывают положительное влияние на поврежденную сердечную мышцу, остается одной из актуальных задач современной кардиологии (Ma Z.J. et al., 2020; Haider K.H., Aramini B., 2020; Balbi C., Vassalli G., 2020; Belostotskaya G. et al., 2020; Constantinou C. et al., 2020; Cheng H. et al., 2020).

Уменьшение сердечной нагрузки и реваскуляризация частично увеличивают выживаемость кардиомиоцитов и сохраняют сердечные функции при инфаркте миокарда. Многочисленные терапевтические эффекты МСК костно-мозгового происхождения были подтверждены при ишемических и реперфузионных заболеваниях. Клеточная терапия для компенсации потери кардиомиоцитов после ишемического повреждения в экспериментальных моделях инфаркта и у пациентов с ишемической кардиомиопатией способствует сохранению клеточных элементов и улучшает сердечные функции в долгосрочной перспективе (Chen F. et al., 2020; Constantinou C. et al., 2020). Как это ни парадоксально, но после инъекции МСК сохраняются в течение очень короткого времени (Rodrigues M. et al., 2013; Майбородин И.В. и др., 2014, 2016, 2017; Yates C.C. et al., 2017). Это указывает на то, что пролонгированные защитные эффекты МСК на кардиомиоциты могут быть опосредованы паракринными функциями МСК, такими как экзосомы МСК (ЭМСК). Считается, что экзосомы играют жизненно важную роль в кардиопротективных эффектах, связанных с МСК (Chen F. et al., 2020; Constantinou C. et al., 2020).

Межклеточная коммуникация является важным признаком многоклеточных организмов и может опосредоваться посредством прямого межклеточного контакта или передачи секретируемых молекул. В последние два десятилетия открыт и исследован третий механизм межклеточного взаимодействия, который включает перенос экстраклеточных везикул, представляющих собой мембранозные структуры размером 30-5000 нм. Внеклеточные везикулы, первоначально рассматриваемые как часть клеточных отходов, обладают огромным разнообразием. В зависимости от размера и биогенеза внеклеточные пузырьки можно разделить на разные категории, такие как микровезикулы, апоптозные тельца, эктосомы и экзосомы, из которых последние являются наиболее изученными (Patil M. et al., 2019; Balbi C., Vassalli G., 2020; Bheri S. et al., 2020; Femminò S. et al., 2020; Sun L. et al., 2020; Hu Y. et al., 2020; Bernardi S., Balbi C., 2020).

Экзосомы представляют собой окруженные мембраной внеклеточные везикулы нанометрового (диаметр 30 – 150 нм) размера, секретируемые большинством эукариотических клеток в организме. Экзосомы теперь рассматриваются как ключевой регенеративный компонент секретома МСК и клеток-предшественников. Терапия экзосомами перспективна для восстановления тканей сердца. Экзосомы быстро поглощаются нативными клетками и являются идеальными естественными транспортерами для обмена содержимым клеточными элементами и несут множество сигнальных биомолекул, включая микроРНК (miR), белки,

ферменты, рецепторы клеточной поверхности, факторы роста, цитокины и липиды, которые могут модулировать биологию и функцию клеток-мишеней. ЭМСК проявляют кардио-защитные, иммуномодуляторные и репаративные способности, подавляют воспаление и апоптоз, стимулируют ангиогенез и усиливают пролиферацию и дифференцирование резидентных сердечных МСК (Patil M. et al., 2019; Balbi C., Vassalli G., 2020; Bheri S. et al., 2020; Femminò S. et al., 2020; Sun L. et al., 2020; Hu Y. et al., 2020; Bernardi S., Balbi C., 2020; Haider K.H., Aramini B., 2020; Belostotskaya G. et al., 2020; Constantinou C. et al., 2020; Ma Z.J. et al., 2020; Moghiman T. et al., 2020).

Экзосомы активно участвуют в ремоделировании сердца в ответ на стрессоры. Кроме того, возможно применение экзосом МСК в качестве терапевтического инструмента при лечении заболеваний почек, печени, нервной системы и опорно-двигательного аппарата, вплоть до целевой терапии рака (Patil M. et al., 2019; Bernardi S., Balbi C., 2020). Являясь липосомоподобными структурами, экзосомы могут быть естественными или сконструированными носителями цитопротективных или цитотоксических факторов и лекарственных средств. Возможно добавление в экзосомы МСК необходимых miR для доставки к патологически измененным органам, включая сердце. Бесклеточная терапия на основе экзосом МСК разрабатывается в качестве альтернативы применения МСК (Haider K.H., Aramini B., 2020; Bernardi S., Balbi C., 2020).

Степень разработанности темы исследования. Анализ литературы свидетельствует о том, что в большинстве публикаций, посвященных влиянию экзосом различного происхождения на структуры сердца в норме и патологии, содержатся данные об изменениях после введения экзосом в кровоток или непосредственно в мышцу сердца. Вместе с этим практически отсутствуют данные о распределении внеклеточных везикул по организму после других способов введения. В отдельных сообщениях установлено, что циркулирующие везикулы могут попадать в сосуды сердца, а пузырьки сердечно-сосудистого происхождения могут передаваться в отдаленные ткани посредством кровообращения (Femminò S et al., 2020; Wan Z. et al., 2020). Полностью отсутствуют работы о возможности попадания в сердце экзосом после локальной инъекции в отдаленные органы и ткани при использовании клеточных технологий для влияния на процессы репарации. Также необходимо отметить определенную противоречивость результатов различных исследователей: от сообщений о прямом поглощении экзосом МСК кардиомиоцитами (Cheng H. et al., 2020) до мнения, что сердце по своей природе невосприимчиво к доставке лекарств, опосредованной наночастицами (Sun W. et al., 2020).

Цель исследования: изучить характер и выраженность структурной реорганизации миокарда при травме проксимального мышечка большеберцовой кости и применении экзосом МСК в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Изучить характер структурной реорганизации миокарда кроликов при повреждении проксимального мышечка большеберцовой кости (ПМБК) с введением и без введения экзосом МСК в костный дефект.
2. С помощью стереологического анализа провести сравнительный анализ выраженности структурной реорганизации миокарда левого и правого желудочков сердца при повреждении ПМБК и введении экзосом МСК.
3. С помощью люминесцентной микроскопии изучить возможность попадания в сердце экзосом МСК после их инъекции в дефект ПМБК.
4. Провести количественную оценку клеток воспалительного инфильтрата в миокарде левого и правого желудочков сердца кроликов после моделирования дефекта костной ткани и введения экзосом МСК.

Научная новизна исследования. Впервые показано, что после введения экзосом МСК с мечеными флюоресцентным красителем мембранами в поврежденный ПМБК кроликов, в сосудах миокарда, а также рядом с ними в течение 7 сут выявляются объекты очень малого размера с характерной люминесценцией. Количество таких структур постепенно

уменьшается, снижается интенсивность их свечения, вплоть до почти полного исчезновения к 10-м суткам.

Впервые установлено, что повреждение проксимального мышелка большеберцовой кости у кроликов сопровождается развитием дистрофических изменений кардиомиоцитов, отеком миокарда, полнокроем и расширением лимфатических сосудов, лейкоцитарной инфильтрацией с преобладанием лимфоцитов и макрофагов. Применение экзосом МСК сопровождается более значительной дилатацией кровеносных сосудов с формированием обширных геморрагий, формированием тромбов как в полостях сердца, так и в его сосудах, пролонгацией явлений отека, но снижением выраженности дистрофических изменений кардиомиоцитов.

Впервые на основании количественного морфологического анализа установлен одинаковый характер структурной реорганизации миокарда правого и левого желудочков сердца в ответ на дистантное повреждение костной ткани. Наиболее выраженные изменения структурной организации миокарда правого и левого желудочков сердца кроликов после повреждения проксимального мышелка большеберцовой кости, в том числе и при введении экзосом МСК, развиваются через 7 сут эксперимента и проявляются в уменьшении объемной плотности кардиомиоцитов на 22 – 23%, увеличении объемной плотности сосудов микроциркуляторного русла соответственно в 8,5 и 5 раз и увеличении суммарной объемной плотности клеток, волокон и основного вещества соединительной ткани в 5 – 12 раз.

Впервые установлено, что в миокарде левого и правого желудочков сердца возрастает общая численность клеток воспалительного инфильтрата, при этом увеличиваются относительное и абсолютное содержание нейтрофилов, эритроцитов, моноцитов, макрофагов и клеток с признаками деструкции. Выявленные изменения в численности и процентном содержании клеток воспалительного инфильтрата в миокарде обоих желудочков наиболее выражены через 3 сут после повреждения ПМБК; при использовании экзосом МСК наибольшее увеличение этих показателей происходит через 10 сут.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые знания об особенностях реакций миокарда на повреждение костной ткани конечности без и в условиях применения экзосом МСК. Так как в результате хирургического вмешательства на ПМБК в единичных наблюдениях было зарегистрировано появление в правых полостях сердца сгустков крови, больших количеств гемопозитических клеток и тканевого детрита, целесообразно принимать меры, направленные на недопущение попадания продуктов распада костной ткани в кровотоки.

Данные люминесцентной микроскопии по выявлению в миокарде кроликов экзосом МСК после их введения в участок повреждения ПМБК свидетельствуют о том, что эти структуры могут с током крови переноситься в миокард и присутствовать там на протяжении 10 сут.

Вследствие использования экзосом МСК для воздействия на регенерацию ПМБК в сердечной мышце происходит более быстрое расширение кровеносных сосудов, диapedез эритроцитов с геморрагиями, длительные отечные явления, тромбообразование в сосудах миокарда с облитерацией их просвета, склеротической трансформацией сосудистых оболочек и периваскулярных тканей.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на применении принципов и методов комплексного морфологического анализа реорганизации миокарда после повреждения костной ткани конечности без и с последующим использованием экзосом МСК для воздействия на репаративные процессы, общих подходах к экспериментальному моделированию, созданию новых маркеров иммуно-, гисто- и цитохимии. Используются современные методы морфологической (световая и люминесцентная микроскопия с морфометрическим анализом) и статистической оценки полученных данных. Объект исследований – образцы миокарда левого и правого желудочков кроликов после создания дефекта ПМБК без и в условиях применения ЭМСК. Предмет исследования – особен-

ности морфологических реакций миокарда на отдаленное повреждение костной ткани и введение экзосом МСК.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Введенные в дефект ПМБК экзосомы МСК регистрируются в миокарде правого и левого желудочков в течение 7 сут (в просвете сосудов и периваскулярно).

2. В результате моделирования дефекта ПМБК у кроликов развиваются дистрофические изменения кардиомиоцитов, отек миокарда с признаками лимфостаза, нарушения микроциркуляции и лейкоцитарной инфильтрацией.

3. Применение экзосом МСК для воздействия на регенерацию поврежденной ткани ПМБК сопровождается выраженным диапедезом эритроцитов с формированием обширных геморрагий, пролонгацией отечных явлений, формированием тромбов с облитерацией просвета сосудов сердца. Вместе с этим уменьшается выраженность воспалительной инфильтрации миокарда и снижается выраженность дистрофических изменений кардиомиоцитов.

4. Наиболее выраженные изменения структурной реорганизации миокарда правого и левого желудочков сердца кроликов после повреждения ПМБК, в том числе и при введении экзосом МСК, происходят через 7 сут эксперимента и проявляются в уменьшении объемной плотности кардиомиоцитов, увеличении объемной плотности сосудов микроциркуляторного русла и суммарной объемной плотности клеток, волокон и основного вещества соединительной ткани.

Степень достоверности и апробация результатов. Использованные методы исследования (световая и люминесцентная микроскопия с применением морфометрического анализа), способы моделирования повреждения костной ткани в экспериментальных условиях, применение клеточных технологий, статистическая обработка количественных данных соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить достоверные результаты и сделать обоснованные выводы. Диссертация выполнена на достаточном экспериментальном материале: 57 беспородных кроликов обоего пола, которым моделировали дефект ПМБК с последующим введением ЭМСК. Сформулированные научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на результатах собственных исследований, не носят характера умозрительных заключений и вытекают из результатов работы.

Апробация работы. Результаты проведенного исследования докладывались и обсуждались на 9-й Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2020), VI съезде Российского общества патологоанатомов (Новосибирск, 2022) и заседании Ученого совета Института молекулярной патологии и патоморфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ, из них 3 – в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований, в том числе входящих в базы Web of Sciences и Scopus.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с изложением материала и методов исследования, 2 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 185 источников (46 отечественных и 139 иностранных). Работа иллюстрирована 7 таблицами и 17 многокомпонентными комбинированными рисунками.

Личный вклад автора. Автором проведены планирование и разработка дизайна исследования, сформулированы его цель и задачи, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретированы и опубликованы основные результаты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на беспородных кроликах обоего пола в возрасте 4 – 6 мес, массой 3 – 4 кг. Все манипуляции не были связаны с причинением боли животным и проведены с соблюдением ГОСТ 33215-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур) и ГОСТ 33216-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами). Хирургическое вмешательство проводили с соблюдением всех правил асептики и антисептики в условиях чистой операционной под общим наркозом на основе тотальной внутривенной анестезии пропофолом (Полатайко О.Р., 2009; Кэрролл Г.Л., 2009; Toder M.S. et al., 2016).

Хирургическое вмешательство по моделированию повреждения ПМБК и введение экзосом МСК. Кроликов содержали на стандартной лабораторной диете при естественном освещении в виварии. В условиях асептики и антисептики при использовании тотальной внутривенной анестезии пропофолом в проксимальных мышечках большеберцовой кости 57 беспородных кроликов стоматологическим бором диаметром 2 мм с охлаждением стерильным физиологическим раствором создавали стандартизованное отверстие на глубину 4 мм (Тодер М.С. и др., 2017; Toder M.S. et al., 2016).

Дефекты ПМБК на правой и на левой конечностях заполняли инсулиновым шприцем теплым физиологическим раствором на фосфатном буфере (контроль – 27 кроликов) или вводили 39 мкг ЭМСК на животное (или 19,5 мкг на одну конечность) в этом буфере (опыт – 30 животных). Пять кроликов представляли интактный контроль. Животных выводили из эксперимента спустя 3, 7 и 10 сут после операции.

Получение, культивирование и характеристики МСК, выделение экзосом МСК. МСК получали из костного мозга крысы-самца инбредной линии Wag массой 180 г в возрасте 6 мес, характеризовали и культивировали в соответствии с ранее разработанными рекомендациями (Майбородин И.В. и др., 2011, 2012).

Клетки суспендировали и помещали в пластиковые сосуды («Nunk», Дания), через 2 сут культивирования неприкрепившиеся клеточные элементы сливали вместе со средой. Адгезированные к пластику клетки культивировали в среде α -MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Biolog», Россия), 2 мМ глутамакса и 1% антибиотика в условиях насыщенной влажности в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. Замену культуральной среды осуществляли один раз в 3 – 4 сут. В процессе субкультивирования клеточную культуру в виде монослоя пересеивали в плотности от 1000 до 5000 клеток/см² (в зависимости от ростовых свойств применяемой эмбриональной сыворотки), для разрушения клеточного монослоя до суспензии использовали раствор трипсин-ЭДТА в стандартной концентрации.

Методами просвечивающей световой и люминесцентной микроскопии, а также цитологическими способами было подтверждено, что культивируемые костномозговые клеточные элементы: имеют поверхностные антигены CD105+, CD90+, CD45-, CD34- (Coireau P. et al., 2009; Martins A.A. et al., 2009; Berner A. et al., 2010); во время культивирования *in vitro* адгезируются к поверхности пластика; на протяжении всего времени культивирования остаются фибробластоподобными; не меняются в процессе культивирования на протяжении нескольких генераций; образуют колонии фибробластоподобных клеточных элементов при низкой плотности в начале культивирования.

Кондиционную среду для выделения экзосом МСК собирали на стадии стационарного роста стабильной культуры 3-го пассажа преддифференцированных в костном направлении МСК (0,1 мкМ раствор дезоксиметазона, 50 мкМ раствор аскорбиновой кислоты и 10 мМ раствор β -глицерофосфата, все реактивы производства «Sigma», США) (Майбородин И.В. и др., 2011, 2012; Zhao J., Xu J.J., 2018) при достижении конfluence клеточного монослоя 80 – 90%, согласно указаниям (Krämer-Albers E.-M. et al., 2007; Blazquez R. et al., 2014; Oshcherkova A. et al., 2019; Сухих Г.Т. и др., 2020).

Для удаления клеток, их остатков, апоптозных телец и крупных везикул кондиционную среду после культивирования МСК последовательно центрифугировали: 10 мин при 300g, 10 мин при 2000g, 30 мин при 12000g. Экзосомы МСК осаждали, центрифугируя супернатант 2 ч при 100000g, ресуспендировали в 200 мкл физиологического раствора на фосфатном буфере и повторно центрифугировали при 100000g в течение 2 ч (Lin Y. et al., 2019; Сухих Г.Т. и др., 2020; Chen F. et al., 2020). Выделенные экзосомы МСК ресуспендировали в 200 мкл забуференного физиологического раствора, пропускали через фильтр с порами 0,22 мкм. Количество экзосом МСК определяли по содержанию белка в осадке, использовали коммерческий набор «Qubit protein assay kit» (Thermo Fisher Scientific, USA) и флуориметр «Qubit® 3.0».

Окрашивание липидных компонентов мембран экзосом проводили флуоресцентным красителем PKH26, согласно инструкции производителя (Sigma-Aldrich, USA). Избыток красителя удаляли, центрифугируя 10 мин при 2000g и 2 ч при 100000g или используя колонки Exosome Spin Columns (MW 3,000), следуя стандартному протоколу (Thermo Fisher Scientific).

Методы морфологического анализа. Из сердец выведенных из экспериментов кроликов вырезали фрагмент толщиной около 5 мм так, чтобы в образце оказались правые и левые предсердия и желудочки с максимальной площадью полостей. Затем по перегородке разделяли правые и левые отделы, которые обрабатывали отдельно. Образцы фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 1 сут, обезживали в реактиве «Изопреп» (БиоВитрум, Россия), просветляли в ксилоле и заключали в гистопласт. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996), исследовали при увеличении до 1200 раз в световом микроскопе Axioimager M1 (Carl Zeiss, Germany).

Кроме того, неокрашенные срезы миокарда изучали в режиме люминесценции указанного микроскопа с фильтрами Alexa Fluor 488 (диапазон возбуждения 450-490 нм, диапазон регистрации 515-∞ нм) или для родамина (Rhod – диапазон возбуждения 540-552 нм, диапазон регистрации 575-640 нм). При получении микрофотографий использовали автоматическую экспозицию. В процессе совмещения изображений с применением фильтров Alexa 488 и для родамина можно получить зеленый и красный (или оранжевый и желтый) цвет в зависимости от преобладания интенсивности свечения при том или ином фильтре. Зеленый цвет дает более яркая флуоресценция при использовании фильтра Alexa 488, красный цвет – на фоне применения родаминового фильтра, желтый и его оттенки получаются в результате смешения зеленого и красного цветов в той или иной пропорции (Майбородин И.В. и др., 2020; Сухих Г.Т. и др., 2020; Maiborodin I.V. et al., 2020).

Количественные морфологические исследования проводили на изображениях, сделанных с помощью цифровой видеокамеры, с применением комплекса программ для морфометрии Axiovision (Zeiss, Германия). Стереологический анализ проводили при увеличении в 200 раз (тестовая площадь $3,5 \times 10^5$ мкм²), подсчет цитограмм – при увеличении в 400 раз (тестовая площадь $8,7 \times 10^4$ мкм²).

При проведении стереологического анализа на срезах миокарда правого и левого желудочков оценивали объемную плотность кардиомиоцитов, кровеносных капилляров, соединительной ткани (суммарно клеток, волокон и основного вещества). Рассчитывали также объемные отношения капилляров к кардиомиоцитам и соединительной ткани к кардиомиоцитам. Объем выборки при оценке объемной плотности основных структурных компартментов миокарда составил 25 неперекрывающихся полей зрения (фотоизображений миокарда) как для правого, так и для левого желудочков сердца каждого животного.

Для определения цитограмм стромальных клеток (лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, тканевых базофилов, эритроцитов, моноцитов, макрофагов и клеток с деструктивными изменениями) в миокарде анализировали от 500 до 1000 клеток в разных участках препарата, в зависимости от однородности клеточного состава. Приняв общее количество клеток за 100%, определяли относительное содержание клеток каждого типа.

На каждом препарате осуществляли по 3 – 5 измерений в разных участках, согласно указаниям J.R.Head и L.L.Seeling (1984). Измеряли изображения, полученные при помощи

цифровой видеокамеры микроскопа, на экране компьютера с использованием программного обеспечения морфологического модуля Axiovision (Zeiss, Германия).

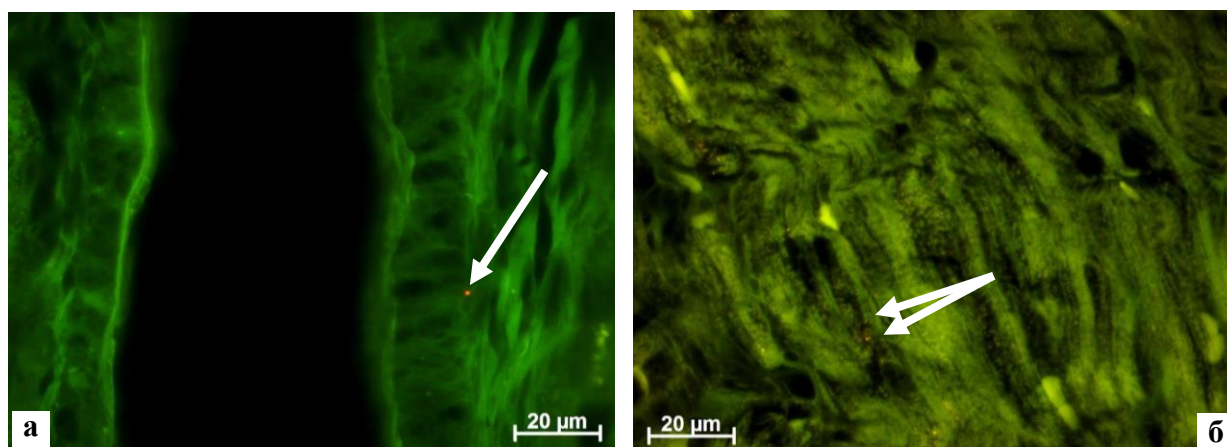
Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием прикладной статистической программы MS Excel 7.0 (Microsoft, USA). Определяли среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (σ). Статистическую значимость различий сравниваемых средних величин оценивали на основании критерия Стьюдента для заданного порога (p) вероятности безошибочных прогнозов (Плохинский Н.А., 1970). Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем доверительной вероятности 95% и выше. При расчетах учитывали, что распределение исследуемых признаков было близким к нормальному.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Доказательства присутствия экзосом в сердце кроликов после их введения в дефект кости задней конечности. В миокарде интактных и контрольных кроликов (без введения экзосом) объекты с преимущественным свечением при использовании фильтра для родамина не выявлены во все сроки эксперимента.

Для определения возможности попадания экзосом МСК, меченных красителем РКН26, в сердце при использовании режима люминесценции ввиду небольшого размера и числа искомых объектов на единицу площади среза миокарда приходилось фотографировать многочисленные участки сердечной мышцы с попеременной установкой фильтров Alexa Fluor 488 или для родамина. Однако большинство структур, окрашенных РКН26, и в результате со значительным преобладанием флюоресценции на фоне использования родаминового фильтра, зарегистрировано случайно.

Спустя 3 сут после операции в миокарде животных были найдены единичные объекты, очень ярко светящиеся на фоне установки родаминового фильтра (рисунок). Люминесценция иногда была настолько интенсивной, что подобные структуры были заметны на большом увеличении. Размеры флюоресцирующих красным цветом объектов никогда не превышали 1 мкм, а чаще всего были намного меньше, то есть эти объекты были пылевидными. Светящиеся таким образом частицы чаще всего они были расположены рядом с сосудами, в их стенках или на эндотелии капилляров. К 7-м суткам ярко светящиеся объекты при использовании фильтра для родамина из миокарда практически полностью исчезли. Только изредка можно было найти единичные пылевидные структуры со слабой люминесценцией в условиях применения родаминового фильтра.



Очень мелкие, пылевидные объекты с интенсивной флюоресценцией при использовании родаминового фильтра (стрелки) в адвентициальной оболочке крупной артерии (а) и рядом с капилляром между кардиомиоцитами (б) в сердце кролика через 3 (а) и 7 (б) суток после повреждения ПМБК и введения экзосом МСК. Компьютерное совмещение изображений, полученных с неокрашенных срезов в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa 488 и для родамина.

Через 10 сут в сердечной мышце крайне редко все еще встречались слабо флюоресцирующие красным цветом объекты. Но это свечение было на уровне неспецифической аутофлюоресценции в контроле. В связи с этим результат расценен, как сомнительный.

Обнаружение через 3 и 7 сут в миокарде даже единичных экзосом МСК после их введения в дефект кости задней конечности свидетельствует о том, что возможно проникновение данных структур в сосудистое русло с последующей диссеминацией по всему организму. Следует учитывать, что проникновение экзосом МСК в миокард возможно только через кровь, из лимфатических сосудов возможен транспорт экзосом в регионарные лимфатические узлы, где существует сброс жидкой части лимфы в кровь (Бородин Ю.И., Григорьев В.Н., 1986; Rusznyak I. et al., 1967), или миграция экзосом МСК по системе лимфатических узлов и через грудной проток и левый венозный угол – место слияния *vena jugularis* и *vena subclavia*, выход опять же в кровь.

Разные размеры и интенсивность свечения найденных объектов при использовании родаминового фильтра, скорее всего, и служат доказательствами того, что подобным образом флюоресцирующие структуры являются экзосомами МСК. Согласно литературным данным, экзосомы имеют диаметр 40 – 100 нм (Février B, Raposo G., 2004), а эктосомы – 50 – 1000 нм (Théry C. et al., 2009), то есть экстрацеллюлярные везикулы МСК даже одного происхождения могут очень сильно различаться по величине.

Постепенно (на протяжении 10 сут), экзосомы МСК (меченные РКН26 объекты) исчезают из сердечной мышцы. В процессе элиминации с течением времени снижаются численность флюоресцирующих структур, их размеры и яркость свечения. То есть влияние экзосом МСК на миокард растянуто по времени и плавно уменьшается. Следует особо отметить, что на протяжении всего времени присутствия экзосом МСК в миокарде не было найдено накопления данных объектов в клетках, в том числе, макрофагах, как это описано при изучении непосредственного места введения экзосом – мягких тканей рядом с проксимальным мышцелком большеберцовой кости (Сухих Г.Т. и др., 2020). Исчезновение из миокарда экзосом, скорее всего, связано с их медленным распадом, разрушением мембран (затухание красной флюоресценции).

Таким образом, после введения экзосом МСК с мечеными флюоресцентным красителем мембранами в дефекты ПМБК кроликов люминесцирующие объекты очень малого размера выявляются в сосудах миокарда через 3 и 7 сут после операции, а также рядом с ними. Количество таких структур и интенсивность их свечения постепенно уменьшаются, вплоть до полного исчезновения к 10-м суткам. В миокарде кроликов экзосомы МСК после их введения в участок поврежденной костной ткани задней конечности присутствуют не менее 7 сут. Эти структуры можно, при использовании люминесцентной метки, обнаружить методами световой микроскопии; их элиминация скорее всего, происходит через медленную деструкцию мембран.

Патоморфология миокарда при повреждении большеберцовых костей и применении экзосом мультипотентных стромальных клеток. В миокарде левого желудочка кроликов из группы интактного контроля наблюдали умеренно выраженные явления полнокровия сосудов и мононуклеарной инфильтрации, что, скорее всего, было связано со стрессированием животных во время выведения из эксперимента, премедикацией и наркозом. Через 3 сут после повреждения ПМБК в миокарде кроликов отмечались дистрофические изменения кардиомиоцитов, которые выражались в разреженности их саркоплазмы, особенно в перинуклеарной зоне. Наблюдались выраженные расширения интерстициальных пространств и лимфатических сосудов. Появлялась мононуклеарная инфильтрация (диффузная и периваскулярная), встречались единичные нейтрофилы.

Необходимо отметить, что у одного животного контрольной группы через 3 сут после повреждения трубчатых костей нижних конечностей в правых полостях сердца были найдены фибриновые тромбы, обильно инфильтрированные гемопоэтическими клетками, происходящими, скорее всего, из красного костного мозга. О костномозговом происхождении этих клеток свидетельствует разнородность бластных форм – от мегакариоцитов (гигантских клеток с многолопастным ядром) (Абрамов М.Г., 1985) до клеток эритроидного

(полихроматофильные и оксифильные нормоциты: крупные клетки с разной степенью насыщения цитоплазмы гемоглобином и часто с колесовидным ядром) (Абрамов М.Г., 1985) и миелоидного (нейтрофильные метамиелоциты и палочкоядерные нейтрофилы с хорошо выраженными подковообразными ядрами) (Абрамов М.Г., 1985) ростков.

Возможно, что при массивном повреждении костной ткани, в которой находятся кровеносные структуры красного костного мозга, при создании дефекта ПМБК происходит попадание клеток костного мозга в кровь. Сначала они попадают в правое предсердие и правый желудочек, где остаются до полного лизиса или организации, затем могут мигрировать далее – в легочные артерии с вероятностью их эмболии. Присутствие такого тромба в полости сердца не только нарушает функционирование сердечной мышцы в настоящий момент, но и может способствовать прогрессированию нарушений в дальнейшем.

Через 3 сут после повреждения ПМБК с последующим введением экзосом МСК в миокарде левого желудочка кроликов были отмечены еще более выраженные явления отека, но это произошло уже на фоне очень значительного расширения кровеносных капилляров. В некоторых случаях миокард вследствие выраженного полнокровия был имbibирован форменными элементами крови. Уровень лейкоцитарной инфильтрации соответствовал такому у оперированных животных без введения экзосом. Среди лейкоцитов было много лимфоцитов и макрофагов, присутствовали в небольшом количестве нейтрофилы.

Так как экзосомы МСК содержат в большой концентрации VEGF или запускают синтез этого цитокина эндотелиальными клетками (Yu M. et al., 2020; Hoang D.H. et al., 2020; Qu Q. et al., 2020), то возможно, что в месте их нахождения начинается ангиогенез, а в результате интенсивной сократительной работы миокарда эритроциты выходят из молодых новообразованных сосудов с несформированными оболочками посредством диапедеза.

Структуры костного мозга в сердце не обнаружены ни в одном случае. Однако у 2 животных в полостях желудочков были найдены тромбы, иногда морфологически напоминающие таковые при эндокардите. Тромбы состояли из эритроцитов и фибрина с диффузной лейкоцитарной инфильтрацией, иногда имели своеобразный «хвост» по току крови.

Лейкоцитарная инфильтрация указывает на то, что эти тромбы образованы не в момент эвтаназии животных (процессы умирания), а за какой-то период времени до этого. Тогда как отсутствие констрикции фибрина и лизиса эритроцитов свидетельствуют о не очень отдаленном сроке формирования тромбов в полостях сердца. Патогенез образования этих тромбов связан с собственно хирургическим вмешательством и повреждением ПМБК, а не с применением экзосом МСК. При попадании тканевого детрита из места операции с током крови в сердце, в его полостях, где ток крови замедляется и имеет турбулентный характер, активируется фибриноген, происходит тромбообразование. В данном случае важно профилактировать эмболию легочных артерий, возможную при отрыве тромбов от эндотелия полостей сердца.

К 7-м суткам после создания дефекта ПМБК значительно усиливались дистрофические изменения кардиомиоцитов (их саркоплазма становилась более разреженной, литически измененной). Сохранялись явления интерстициального отека и лимфостаз. К этим изменениям присоединилась дилатация кровеносных сосудов. Характер воспалительноклеточной инфильтрации существенно не менялся, по-прежнему преобладали лимфоциты, присутствовали нейтрофилы. В данный срок не выявлены различия в состоянии микроциркуляции и лейкоцитарной инфильтрации миокарда кроликов, обусловленных введением экзосом МСК при повреждении ПМБК. Вместе с этим, необходимо отметить развитие умеренного периваскулярного склероза, тромбоз и облитерацию просвета некоторых сосудов.

Изменения микроциркуляции, лимфотока и содержания лейкоцитов в тканях сердца через 7 сут связаны с операцией и процессами регенерации поврежденной костной ткани задних конечностей, по-видимому, в результате воспалительного процесса в ПМБК, даже асептического, вызванного необходимостью элиминации детрита, в том числе и нежизнеспособных костных фрагментов. В кровеносное русло и далее в миокард поступают токсины и антигены, которые вызывают расширение кровеносных сосудов миокарда и начальных путей его лимфатической системы.

Формирование соединительнотканых прослоек может быть связано как с дистрофическими изменениями кардиомиоцитов, сопровождающимися нарушениями паренхиматозно-стромальных взаимоотношений, так и с обнаруженным в предыдущий срок тромбообразованием и диапедезом эритроцитов через сосудистую стенку капилляров. Тромбы после операции и применения экзосом МСК образуются не только в полостях сердца, но также могут возникать и в крупных сосудах артериального типа, куда проникает эктосомальная фракция внеклеточных везикул, которая может взаимодействовать с аннексином V, реагировать с протромбином и фактором свертывания крови X с образованием протромбинового комплекса и являться триггером коагуляции крови (Sadallah S. et al., 2011; Silachev D.N. et al., 2019).

Дистрофические изменения кардиомиоцитов проявлялись в разреженности их саркоплазмы (литических изменениях), образовании околядерных «опустошений», что свидетельствовало о нарушении процессов внутриклеточной регенерации. Особенно выраженными эти изменения были через 7 сут эксперимента без использования экзосом МСК. К этому сроку развивается наиболее интенсивная воспалительная реакция в участке повреждения костной ткани и происходит наиболее выраженное поступление в кровь продуктов распада и биологически активных веществ, вырабатываемых клетками воспалительного инфильтрата. Применение экзосом способствовало снижению выраженности литических изменений кардиомиоцитов, но они все-таки сохранялись до конца эксперимента.

Через 10 сут после создания дефекта ПМБК отек сердечной мышцы становятся меньше, нормализуется состояние кровеносных и лимфатических сосудов. Однако сохраняется лейкоцитарная (преимущественно мононуклеарная) инфильтрация, возрастает количество лимфоцитов и макрофагов, нейтрофилы практически исчезают. Также необходимо отметить присутствие небольшого количества кардиомиоцитов с кариорексисом и кариопикнозом (признаками неробиотических изменений).

То есть, по мере нарастания репаративной регенерации поврежденных тканей задних конечностей кроликов и стихания воспаления проникновение детрита в кровь и транспортировка его в сердце снижаются, состояние миокарда постепенно нормализуется. Лейкоцитарная инфильтрация с увеличением численности макрофагов и клеток с признаками деструктивных изменений указывает на медленное восстановление структуры сердечной мышцы, но также и на то, что не все патологические изменения исчезли, и морфологическая картина вернулась к исходному состоянию.

Спустя 10 сут после создания дефекта ПМБК с использованием экзосом МСК расширение сосудов отсутствовало, но отек и лейкоцитарная инфильтрация сохранялись на прежнем уровне. Также сохранялись облитерация сосудистого просвета и соединительнотканые разрастания по ходу сосудов (периваскулярный склероз), хотя они были и не настолько выраженными, как в предыдущий срок.

Таким образом, повреждение ПМБК у кроликов приводит к отеку миокарда, расширению сначала лимфатических, а потом и кровеносных сосудов, лейкоцитарной инфильтрации сердечной мышцы с преобладанием лимфоцитов. В процессе обширных операций на трубчатых костях конечностей возможно попадание структур красного костного мозга в правые полости сердца с формированием там тромбов. Применение экзосом МСК для воздействия на регенерацию ПМБК способствует более быстрой дилатации кровеносных сосудов с выраженным диапедезом или даже геморрагиями, продлению отечных явлений, формированию тромбов как в полостях сердца, так и в его сосудах с облитерацией их просвета, склеротической трансформации сосудистых оболочек и периваскулярных тканей.

Морфометрический анализ миокарда левого и правого желудочков сердца. Объемная плотность кардиомиоцитов в *левом* желудочке сердца кроликов через 3 и 7 сут после создания дефекта ПМБК была статистически достоверно меньше соответственно на 12 и 19,6%, чем в интактном контроле (табл. 1). При этом спустя 7 сут этот показатель стал ниже на 8,6% по сравнению с 3-ми сутками. К 10-м суткам объемная плотность кардиомиоцитов была выше 9,6% относительно 7-х суток (см. табл. 1).

Таблица 1 – Стереологический анализ миокарда левого желудочка сердца кроликов в различные сроки после повреждения проксимального мышелка большеберцовой кости (M±σ)

Показатель	Интактный контроль	Время после имплантации		
		3 сут	7 сут	10 сут
Без введения экзосом МСК				
Объемная плотность (в %):				
кардиомиоцитов	93,70±2,18	82,40±2,74 [#]	75,30±1,66 ^{#§}	83,30±2,83 ^{#&}
капилляров	3,63±0,81	4,89±1,13 [#]	10,34±1,08 ^{#§}	3,89±1,06 ^{&}
соединительной ткани	2,67±0,81	12,71±1,39 [#]	14,36±1,11 [#]	12,81±0,90
Объемное отношение (число):				
капилляров к кардиомиоцитам	0,039±0,014	0,059±0,012	0,137±0,014 ^{#§}	0,047±0,019
соединительной ткани к кардиомиоцитам	0,028±0,015	0,154±0,020	0,191±0,013 ^{#§}	0,154±0,018
С введением экзосом МСК				
Объемная плотность (в %):				
кардиомиоцитов	93,70±2,18	80,10±1,31 [#]	74,9±1,27 ^{#§}	80,01±2,18 ^{#&}
капилляров	3,63±0,81	11,00±0,86 [#]	7,91±0,72 [#]	2,92±1,02 ^{§&}
соединительной ткани	2,67±0,81	8,90±0,84 [#]	17,19±1,30 ^{#§}	17,07±1,15 ^{#§}
Объемное отношение (число):				
капилляров к кардиомиоцитам	0,039±0,014	0,137±0,011	0,105±0,09	0,036±0,016
соединительной ткани к кардиомиоцитам	0,028±0,015	0,111±0,011	0,229±0,013	0,213±0,017

Примечание: [#] – p<0,05 при сравнении с интактным контролем; [§] – p<0,05 при сравнении с 3 сут после операции; [&] – p<0,05 при сравнении с 7 сут после операции.

Объемная плотность кровеносных капилляров в миокарде была значительно увеличена только через 7 сут эксперимента по сравнению как с интактным контролем, так и с 3-ми и 10-ми сутками – соответственно в 2,8, 2 и 2,7 раза (см. табл. 1). Объемная плотность соединительной ткани в миокарде через 3 и 7 сут после повреждения ПМБК возросла в 4,8 и 5,4 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. Спустя 10 сут этот показатель был увеличен в 4,8 раза интактных животных, но был несколько ниже, чем через 7 сут (см. табл. 1).

Разнонаправленные изменения паренхиматозного и стромального компартментов обусловили, особенно через 7 сут, значимое увеличение объемного отношения капилляров к кардиомиоцитам (соответственно на 51%, в 3,5 раза через 3 и 7 сут опыта) и объемного отношения соединительной ткани к кардиомиоцитам – соответственно в 5,5, 6,8 и 5,5 раза через 3, 7, и 10 сут.

В группе животных с введением экзосом МСК получена сходная динамика изменений объемных плотностей основных структурных компартментов миокарда (см. табл. 1). Через 3, 7 и 10 сут после создания дефекта ПМБК с последующим введением в участок травмы экзосом объемная плотность кардиомиоцитов в миокарде левого желудочка кроликов уменьшилась соответственно на 14,5%; 20 и 14,6% по сравнению с интактным контролем. Спустя 7 сут данный показатель был статистически значимо ниже соответственно на 6,9 и 6,8% по сравнению с данными через 3 и 10 сут (см. табл. 1).

Объемная плотность кровеносных капилляров в миокарде левого желудочка через наиболее значительно изменялась через 3 сут после операции – увеличение в 3 раза, через 7 сут этот показатель был увеличен в 2,2 раза относительно интактных кроликов. Однако спустя 10 сут этот показатель уменьшался в 3,8 и 2,7 раза, соответственно, по сравнению с данными через 3 и 7 сут (см. табл. 1). Значительно возросла объемная плотность соединительной ткани (что было связано в основном с отеком миокарда). Через 3, 7 и 10 сут этот показатель достоверно увеличивался соответственно в 3,3, 6,4 и 6,4 раза по сравнению с интактным контролем (см. табл. 1).

Объемное отношение капилляров к кардиомиоцитам в миокарде левого желудочка после восстановления дефекта костной ткани и введения экзосом МСК достоверно возросло

через 3 и 7 сут эксперимента соответственно в 3,5 и 2,7 раза (см. табл. 1) относительно интактного контроля, а объемное отношение соединительной ткани к кардиомиоцитам увеличивалось еще в большей степени – соответственно в 3,9, 8,2 и 7,6 раза (см. табл. 1).

Таким образом, после повреждения ПМБК в миокарде левого желудочка кроликов через 3 и 7 и 10 сут снижается объемная плотность паренхиматозного компартмента, но возрастает объемная плотность сосудистого русла и соединительной ткани относительно интактных животных. Подобный характер изменений регистрируется и после применения экзосом МСК. Именно такие изменения обуславливают ремоделирование миокарда, наиболее выраженное через 7 сут опыта.

Объемная плотность кардиомиоцитов в миокарде *правого* желудочка сердца кроликов через 3 и 7 сут после создания дефекта ПМБК статистически достоверно уменьшалась на 14,7 и 21,8%, соответственно, по сравнению с интактным контролем (табл. 2). Спустя 7 сут данный показатель уменьшался на 9,2% по сравнению с данными через 3 сут. К 10-м суткам объемная плотность кардиомиоцитов возросла относительно 3-х и 7-х суток (соответственно на 10,4 и 17,9%), но оставалась уменьшенной на 4,7% по сравнению с интактным контролем (см. табл. 2).

Таблица 2 – Стереологический анализ миокарда правого желудочка сердца кроликов в различные сроки после повреждения проксимального мышелка большеберцовой кости (M±σ)

Показатель	Интактный контроль	Время после имплантации		
		3 сут	7 сут	10 сут
Без введения экзосом МСК				
Объемная плотность (в %):				
кардиомиоцитов	96,20±2,05	82,10±2,37 [#]	75,21±1,99 ^{#§}	91,66±2,29 ^{§&}
капилляров	1,23±0,79	5,59±0,92 [#]	10,90±0,94 ^{#§}	4,56±0,74 ^{&}
соединительной ткани	2,55±0,85	12,31±1,55 [#]	13,89±1,09 [#]	3,78±0,96 ^{§&}
Объемное отношение (число):				
капилляров к кардиомиоцитам	0,013±0,014	0,068±0,016	0,145±0,015	0,049±0,015
соединительной ткани к кардиомиоцитам	0,027±0,014	0,150±0,019	0,185±0,015,	0,041±0,016
С введением экзосом МСК				
Объемная плотность (в %):				
кардиомиоцитов	96,20±2,05	80,40±2,23 [#]	75,00±1,50 ^{#§}	79,30±3,35 [#]
капилляров	1,23±0,79	12,00±0,82 ^{#*}	8,34±0,91 [#]	3,97±0,72 ^{#&}
соединительной ткани	2,55±0,85	7,60±1,08	16,66±0,75 ^{#§*}	16,73±1,62
Объемное отношение (число):				
капилляров к кардиомиоцитам	0,013±0,014	0,149±0,015	0,111±0,012	0,050±0,020
соединительной ткани к кардиомиоцитам	0,027±0,014	0,095±0,020	0,222±0,011	0,211±0,025

Примечание: [#] – p<0,05 при сравнении с интактным контролем; [§] – p<0,05 при сравнении с 3 сут после операции; [&] – p<0,05 при сравнении с 7 сут после операции; * – p<0,05 при сравнении с данными без введения экзосом.

Объемная плотность кровеносных капилляров в миокарде была увеличена относительно интактного контроля во все сроки эксперимента – соответственно в 4,5, 8,8 и 3,7 раза через 3, 7 и 10 сут после операции (см. табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что в правом желудочке, так же как и в левом, объемная плотность капилляров наиболее значительно возросла через 7 сут эксперимента.

Объемная плотность соединительной ткани в миокарде правого желудочка значительно увеличивалась уже через 3 сут (в 4,8 раза). Через 7 сут после создания дефекта ПМБК этот показатель был увеличен в 5,4 раза, а через 10 сут – в 1,5 раза (см. табл. 2). Следует отметить, что увеличение объемной плотности соединительной ткани было обусловлено преимущественно развивающимся отеком.

Изменения миокарда правого желудочка после повреждения ПМБК практически полностью повторяли структурные изменения сердечной мышцы левого желудочка. Такие изменения были реакцией на поступление из поврежденных тканей детрита, обладающего антигенными и токсическими свойствами, и заключались в расширении межклеточных пространств, кровеносных и лимфатических сосудов для предотвращения диссеминации указанных факторов. Выявленные реактивные изменения сосудистого русла нормализовались к 10-м суткам после операции.

Разнонаправленные изменения паренхиматозного и стромального компарментов миокарда обусловили значительное увеличение объемного отношения капилляров к кардиомиоцитам во все сроки эксперимента (соответственно в 5,2, 11 и 3,8 раза через 3, 7 и 10 сут), а также объемного отношения соединительной ткани к кардиомиоцитам (соответственно в 5,6, 6,8 и 1,5 раза в эти же сроки). Как уже отмечалось, наиболее выраженная реорганизация миокарда правого желудочка наблюдалась через 7 сут эксперимента.

Через 3, 7 и 10 сут после создания дефекта ПМБК с последующим введением в участок травмы экзосом МСК объемная плотность кардиомиоцитов в миокарде правого желудочка кроликов уменьшалась на 16, 22 и 17,%, соответственно, при сравнении с интактным контролем (см. табл. 2). Спустя 7 сут данный показатель был статистически значимо ниже на 7,2 и 5,7% по сравнению с данными на 3-и и 10-е сутки (см. табл. 2).

Объемная плотность кровеносных капилляров в миокарде правого желудочка через 3, 7 и 10 сут после операции и введения экзосом возросла в 9,8, 6,8 и 3,2 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. Несмотря на то, что через 10 сут этот показатель уменьшался в 3 и 2 раза, соответственно, по сравнению с данными через 3 и 7 сут, он все же оставался увеличенным по сравнению с интактным контролем (см. табл. 2).

Объемная плотность соединительной ткани в миокарде правого желудочка через 3, 7 и 10 сут увеличилась соответственно в 2,9; 6,5 и 6,6 раза относительно интактных кроликов. При этом спустя 7 и 10 сут этот показатель был выше соответственно в 2 и 2,2 раза по сравнению с 3-ми сутками (см. табл. 2). В правом желудочке наиболее значительные изменения объемного отношения капилляров к кардиомиоцитам зафиксированы через 3 сут эксперимента – в 11,5 раза; через 7 и 10 сут этот показатель был увеличен соответственно в 8,5 и 3,8 раза. Объемное отношение соединительной ткани к кардиомиоцитам последовательно возрастало и было максимальным через 7 и 10 сут (увеличение в 8,2 и 7,8 раза).

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что в миокарде правого и левого желудочков развиваются одинаковые по направленности структурно-функциональные и воспалительно-клеточные изменения в ответ на дистантное повреждение костной ткани, которые сохраняются в течение не менее 10 сут.

Количественный анализ клеток воспалительного инфильтрата в миокарде левого и правого желудочка сердца кроликов после моделирования дефекта костной ткани и введения экзосом МСК. Численная плотность всех лейкоцитов с эритроцитами в миокарде *левого* желудочка сердца кроликов через 3, 7 и 10 сут после создания дефекта ПМБК возрастала на 71,9; 59,9 и 65,8%, соответственно, относительно интактного контроля (табл. 3). Процентное содержание лимфоцитов среди всех лейкоцитов через 3; 7 и 10 сут статистически достоверно уменьшилось соответственно на 25,9; 48,4 и 38,4% по сравнению с интактными животными. Спустя 7 сут этот показатель уменьшался на 17,9% по сравнению с данными через 3 сут (см. табл. 3).

Относительное содержание нейтрофилов через 3, 7 и 10 сут после операции было выше соответственно в 4,1; 4,1 и 2,1 раза по сравнению с интактным контролем. Спустя 10 сут данный показатель снижался на 91,8 и 94,5% соответственно по сравнению с 3-ми и 7-ми сутками (см. табл. 3). Абсолютное количество нейтрофильных лейкоцитов в единице площади среза сердца через 3, 7 и 10 сут после создания дефекта ПМБК возрастало в 7,4; 6,7 и 3,6 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. При этом спустя 10 сут данный показатель уменьшался на 87% по сравнению с 7-ми сутками (см. табл. 4), что могло быть обусловлено снижением интенсивности воспалительного процесса в ПМБК.

Таблица 3 – Количество и соотношение отдельных клеток в миокарде левого желудочка сердца кроликов в разные сроки после создания дефекта ПМБК и введения экзосом МСК (M±σ)

Структуры		Интактный контроль	Время после имплантации		
			3 сут	7 сут	10 сут
Без введения экзосом МСК					
Численная плотность	N _A	556,0±72,6	956,0±159,0 [#]	889,0±92,8 [#]	922,0±120,0 [#]
Лимфоциты	%	79,7±3,57	63,3±2,29 [#]	53,7±3,61 ^{#S}	57,7±4,53 [#]
	N _A	443,0±63,0	606,0±107	477,0±56,8	532,0±78,9
Нейтрофилы	%	1,89±0,78	7,67±1,32 [#]	7,78±0,83 [#]	4,0±0,71 ^{#S&}
	N _A	10,3±3,97	72,8±16,5 [#]	69,2±10,9 [#]	37,0±8,86 ^{#&}
Эозинофилы	%	0,78±0,83	1,0±0,87	0,67±0,87	1,44±1,42
	N _A	4,67±5,1	9,11±8,08	6,11±8,16	13±12,6
Тканевые базофилы	%	0,56±0,73	1,33±1,01	1±0,87	1,22±1,20
	N _A	3±3,81	12,8±9,73	8,78±7,66	11,3±10,7
Эритроциты	%	1,56±0,73	3,78±0,67 [#]	3,56±0,53 [#]	2,0±0,87
	N _A	8,78±5,07	36,3±9,23 [#]	31,6±5,53 [#]	17,9±7,06
Моноциты	%	1,78±0,83	4,56±0,88 [#]	4,44±0,73 [#]	2,11±0,78 ^{S&}
	N _A	9,89±4,83	44,0±13,2 [#]	39,3±7 [#]	19,6±7,55
Макрофаги	%	12,0±2,55	13,7±1,32	24,8±2,6 ^S	27,7±3,39 ^S
	N _A	66,3±14,4	130,0±23,3 [#]	220,0±34,6 ^S	256,0±45,5 ^S
С признаками деструкции	%	1,78±0,67	4,67±0,71 [#]	4,11±0,93 [#]	3,89±0,93
	N _A	9,67±3,32	44,4±9,63 [#]	37,0±10,9 [#]	36,1±11,1 [#]
С введением экзосом МСК					
Численная плотность	N _A	556,0±72,6	758,0±131,0	911,0±105,0 [#]	1067,0±132,0 [#]
Лимфоциты	%	79,7±3,57	50,1±3,26 ^{#*}	50,3±3,67 [#]	51,4±4,42 [#]
	N _A	443,0±63,0	380,0±71,2	459,0±62,9	550,0±96,3
Нейтрофилы	%	1,89±0,78	4,25±0,754 ^{#*}	7,56±1,13 ^S	7,44±1,01 ^{S*}
	N _A	10,3±3,97	32,6±9,49 ^{#*}	69,1±14,8 ^S	78,6±7,89 ^{S*}
Эозинофилы	%	0,78±0,83	0,75±0,86	1,11±1,17	1,33±1,22
	N _A	4,67±5,1	5,75±6,28	10,1±10,6	14,8±13,6
Тканевые базофилы	%	0,56±0,73	0,917±0,99	1,78±0,83	2,22±0,83
	N _A	3±3,81	6,92±7,88	16,2±7,79	23,8±9,4 [#]
Эритроциты	%	1,56±0,73	6,5±1,17 ^{#*}	4±0,866 [#]	1,78±0,833 ^S
	N _A	8,78±5,07	48,9±9,91 [#]	36,1±7,13 [#]	18,9±9,25 ^S
Моноциты	%	1,78±0,83	7,17±0,84 ^{#*}	6,78±0,83 ^{#*}	4,89±0,60 ^{S*}
	N _A	9,89±4,83	55±13,9 [#]	61,7±9,72 [#]	52,1±8,81 ^{#*}
Макрофаги	%	12,0±2,55	26,3±2,86 ^{#*}	23,9±1,45 [#]	27,1±3,3 [#]
	N _A	66,3±14,4	199,0±37,4 [#]	217,0±26,9 [#]	288,0±42,0 [#]
С признаками деструкции	%	1,78±0,67	4,08±0,79 [#]	4,56±0,88 [#]	3,78±0,97
	N _A	9,67±3,32	30,8±7,4 [#]	41,7±10,1 [#]	39,8±8,9 [#]

Примечание: N_A – численная плотность клеток на 10⁵ мкм² площади среза; [#] – p<0,05 при сравнении с интактным контролем; ^S – p<0,05 при сравнении с 3 сут после операции; [&] – p<0,05 при сравнении с 7 сут после операции; * – p<0,05 при сравнении с данными без введения экзосом.

Процентное содержание макрофагов через 7 и 10 сут стало больше в 2,1 и 2,3 раза, соответственно, чем у интактных животных. При этом данный показатель в указанные сроки был выше на 81% и в 2 раза, соответственно, по сравнению с данными через 3 сут (см. табл. 3). Число фагоцитов в единице площади среза миокарда через 3, 7 и 10 сут возросло на 96,1%, в 3,3 и 3,9 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. Через 7 и 10 сут этот показатель возрастал на 69,2 и 96,9%, соответственно, по сравнению с 3-ми сутками (см. табл. 3). На повышение концентрации антигенных веществ в миокарде реагируют не только нейтрофилы, но и макрофагальная система. Сначала в сердечной мышце возрастает содержание предшественников макрофагов – моноцитов, а к 7-м суткам возрастает численность макрофагов.

Относительное содержание клеток с признаками деструктивных изменений через 3 и 7 сут после хирургического вмешательства увеличивалось в 2,6 и 2,3 раза, соответственно, по сравнению с интактным контролем. Численная плотность таких клеток в единице площади среза сердца через 3, 7 и 10 сут после повреждения ПМБК возросла в 4,6, 3,8 и 3,7 раза, соответственно, относительно интактных кроликов (см. табл. 3).

Содержание всех лейкоцитов с эритроцитами в единице площади среза миокарда кроликов через 7 и 10 сут после создания дефекта ПМБК с последующим введением экзосом МСК было больше на 63,8 и 91,9%, соответственно, чем в интактном контроле (см. табл. 3). Процентное содержание лимфоцитов среди всех лейкоцитов через 3, 7 и 10 сут было статистически значимо меньше на 59,1; 58,4 и 55,1%, соответственно, чем у интактных животных (см. табл. 3). Относительное содержание нейтрофилов через 3, 7 и 10 сут после операции было выше в 2,2; 4 и 3,9 раза, соответственно, по сравнению с интактным контролем. При этом спустя 7 и 10 сут данный показатель возрастал на 77,9 и 75,1%, соответственно, по сравнению с 3-ми сутками (см. табл. 3).

Абсолютное количество нейтрофильных лейкоцитов в единице площади среза сердца через 3, 7 и 10 сут после повреждения ПМБК с использованием экзосом МСК возросло в 3,2; 6,7 и 7,6 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. Спустя 7 и 10 сут данный показатель возрастал в 2,1 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению с 3-ми сутками (см. табл. 3). Количество клеток красной крови в единице площади среза миокарда через 3 и 7 сут возросло в 5,6 и 4,1 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. При этом через 10 сут данный показатель уменьшался в 2,6 раза, по сравнению с 3-ми сутками (см. табл. 3).

Процентное содержание макрофагов через 3, 7 и 10 сут стало больше в 2,2 раза, на 99,2% и 2,3 раза, соответственно, чем у интактных животных (см. табл. 3). Содержание фагоцитов в единице площади среза миокарда через 3; 7 и 10 сут возросло в 3, 3,3 и 4,3 раза, соответственно, относительно интактных кроликов (см. табл. 3).

Относительное количество клеток с признаками деструкции через 3 и 7 суток после хирургического вмешательства было выше в 2,3 и 2,6 раза, соответственно, по сравнению с интактным контролем (см. табл. 3). Численная плотность клеток с признаками деструктивных изменений в единице площади среза сердца через 3, 7 и 10 сут после повреждения ПМБК с последующим применением экзосом МСК возросла в 3,2; 4,3 и 4,1 раза, соответственно, относительно интактных кроликов (см. табл. 3).

В качестве одного из эффектов экзосом МСК было обнаружено, что на 3-и сутки после создания дефекта ПМБК с последующим введением экзосом по сравнению с такой же операцией, но без экзосом, в миокарде левого желудочка статистически значимо уменьшалось процентное содержание лимфоцитов, нейтрофилов, численная плотность нейтрофилов – на 26,3%; 80,5% и в 2,2 раза, соответственно.

Согласно литературным данным, экзосомы МСК подавляют пролиферацию и функциональную активность клеточных элементов лимфоцитарного и миелоидного рядов (Zhu Y.G. et al., 2014; Simonson O.E. et al., 2015; Harrell C.R. et al., 2020), по-видимому, вследствие этого в миокарде возможно снижение численности лимфоцитов и нейтрофилов.

Через 7 сут после создания дефекта ПМБК с использованием экзосом МСК увеличенным оставалось только процентное содержание моноцитов – на 52,7% относительно такой же операции, но без экзосом (см. табл. 3). Через 10 сут после повреждения ПМБК с применением экзосом МСК в миокарде левого желудочка по сравнению с состоянием после хирургического вмешательства, выполненного без экзосом, возрастали процентное содержание и численная плотность нейтрофилов соответственно на 86% и в 2,1 раза, относительное и абсолютное количество моноцитов – в 2,3 и 2,7 раза, соответственно.

Абсолютное количество всех лейкоцитов с эритроцитами в миокарде *правого* желудочка сердца кроликов через 3; 7 и 10 сут после создания дефекта ПМБК возрастало соответственно на 66,7, 55,6 и 61,2% по сравнению с интактным контролем (табл. 4). Процентное содержание лимфоцитов среди всех лейкоцитов в миокарде правого желудочка сердца через 3, 7 и 10 сут было статистически достоверно меньше на 23,3, 47,5 и 34,1%, соответ-

ственно, чем у интактных животных. При этом спустя 7 сут данный показатель уменьшался на 19,6% по сравнению с 3-ми сутками (см. табл. 4).

Таблица 4 – Количество и соотношение отдельных клеток в миокарде правого желудочка сердца кроликов в разные сроки после создания дефекта ПМБК и введения экзосом МСК (M±σ)

Структуры		Интактный контроль	Время после имплантации		
			3 сут	7 сут	10 сут
Без введения экзосом МСК					
Численная плотность	N _A	600,0±86,6	1000,0±150,0 [#]	933,0±100,0 [#]	967,0±112,0 [#]
Лимфоциты	%	78,2±3,42	63,4±2,24 [#]	53,0±3,32 ^{#§}	58,3±4,03 [#]
	N _A	469,0±66,1	635,0±104,0	496,0±69,3	564,0±79,8
Нейтрофилы	%	2,33±0,71	8,0±1,32 [#]	8,11±0,78 [#]	4,33±0,71 ^{#§&}
	N _A	13,9±4,34	79,8±17,7 [#]	76,2±13,9 [#]	41,9±8,58 ^{#&}
Эозинофилы	%	1,11±0,782	1,22±0,83	0,89±0,78	1,67±1,22
	N _A	7,0±5,1	11,8±7,92	8,56±7,47	15,9±11,5
Тканевые базофилы	%	0,67±0,71	1,44±0,88	1,11±0,78	1,56±1,13
	N _A	4,22±4,76	14,8±9,93	10,2±7,22	15,2±10,6
Эритроциты	%	1,22±0,97	3,56±0,53 [#]	3,44±0,53 [#]	1,56±0,88
	N _A	7,56±6,67	35,9±8,94 [#]	31,9±4,37 [#]	14,6±7,49
Моноциты	%	2,11±0,78	4,89±1,05 [#]	5,0±1,0 [#]	2,33±0,71 ^{#§&}
	N _A	12,9±5,56	49,1±14,1 [#]	46,4±9,98 [#]	22,7±7,14
Макрофаги	%	12,2±2,91	13,0±2,0	23,8±3,46 ^{#§}	26,8±2,64 ^{#§}
	N _A	73,2±19,9	129,0±23,2 [#]	221,0±33,9 ^{#§}	259,0±38,5 ^{#§}
С признаками деструкции	%	2,11±0,78	4,44±0,73 [#]	4,67±0,5 [#]	3,44±1,13
	N _A	12,4±4,19	44,2±9,2 [#]	43,6±6,78 [#]	33,2±12,0 [#]
С введением экзосом МСК					
Численная плотность	N _A	600,0±86,6	800,0±148,0	956,0±88,2 [#]	1111,0±127,0 [#]
Лимфоциты	%	78,2±3,42	47,5±4,38 ^{#*}	47,4±2,7 [#]	50,0±4,97 [#]
	N _A	469,0±66,1	378,0±63,8 [*]	453,0±42,1	556,0±90,6
Нейтрофилы	%	2,33±0,71	4,5±0,67 ^{#*}	8,22±1,09 ^{#§}	7,89±1,05 ^{#§*}
	N _A	13,9±4,34	36,4±9,86 ^{#*}	78,9±14,8 ^{#§}	87,2±13,0 ^{#§*}
Эозинофилы	%	1,11±0,78	1,08±0,9	1,33±1,12	1,56±1,13
	N _A	7,0±5,1	8,83±7,02	13,1±11,1	17,8±13,1
Тканевые базофилы	%	0,67±0,71	1,08±0,99	2,0±0,71	2,44±0,73
	N _A	4,22±4,76	9,0±8,46	19,1±6,85	27,6±9,38 [#]
Эритроциты	%	1,22±0,97	6,33±1,23 ^{#*}	4,22±0,83 [#]	1,89±0,93 [§]
	N _A	7,56±6,67	50,0±9,77 [#]	40,1±7,37 [#]	21,0±10,5 [§]
Моноциты	%	2,11±0,78	7,83±0,84 ^{#*}	7,67±0,5 ^{#*}	5,22±0,67 ^{#§&*}
	N _A	12,9±5,56	63,4±16,9 [#]	73,2±7,61 ^{#*}	58,1±10,1 ^{#*}
Макрофаги	%	12,2±2,91	27,2±3,43 ^{#*}	24,1±1,36 [#]	27,8±3,63 [#]
	N _A	73,2±19,9	219,0±55,8 [#]	231,0±27,5 [#]	308,0±48,3 [#]
С признаками деструкции	%	2,11±0,78	4,5±0,798 [#]	5,01±0,71 [#]	3,22±0,97
	N _A	12,4±4,19	36,2±10,1 [#]	47,8±7,6 [#]	35,1±8,68 [#]

Примечание: N_A – численная плотность клеток на 10⁵ мкм² площади среза; [#] – p<0,05 при сравнении с интактным контролем; [§] – p<0,05 при сравнении с 3 сут после операции; [&] – p<0,05 при сравнении с 7 сут после операции; * – p<0,05 при сравнении с данными без введения экзосом.

Относительное содержание нейтрофилов через 3, 7 и 10 сут после операции было выше в 3,4, 3,5 раза и на 85,8%, соответственно, по сравнению с интактным контролем. При этом спустя 10 сут данный показатель снижался на 84,8 и 87,3%, соответственно, по сравнению с 3-ми и 7-ми сутками (см. табл. 4). Количество нейтрофильных лейкоцитов в единице площади среза миокарда через 3, 7 и 10 сут после повреждения ПМБК возросло в 5,7, 5,5 и 3 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. При этом спустя 10 сут этот показатель уменьшался на 81,9% по сравнению с 7-ми сутками (см. табл. 4).

Процентное содержание макрофагов через 7 и 10 сут возросло на 95,1% и в 2,2 раза, соответственно, по сравнению с интактными животными и на 83,1% и в 2,1 раза, соответственно, по сравнению с данными через 3 сут (см. табл. 4). Число фагоцитов в единице площади среза миокарда через 3; 7 и 10 сут возросло на 76,2%, в 3 и 3,5 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. Через 7 и 10 сут этот показатель был выше на 71,3% и в 2 раза, соответственно, чем через 3 сут (см. табл. 4).

Относительное содержание клеток с признаками деструктивных изменений через 3 и 7 сут после хирургического вмешательства возросло в 2,1 и 2,2 раза, соответственно, по сравнению с интактным контролем (см. табл. 8). Численная плотность этих клеток в срезе сердца через 3, 7 и 10 сут после повреждения ПМБК возросла в 3,6; 3,5 и 2,7 раза, соответственно, относительно интактных кроликов (см. табл. 4).

Выявленные изменения миокарда правого желудочка после создания дефекта ПМБК были схожи с таковыми в левом желудочке.

Содержание всех лейкоцитов с эритроцитами в единице площади среза миокарда кроликов через 7 и 10 сут после повреждения ПМБК с последующим введением экзосом МСК было больше на 59,3% и 85,2%, соответственно, чем в интактном контроле (см. табл. 4). Процентное содержание лимфоцитов среди всех лейкоцитов через 3, 7 и 10 сут было статистически значимо меньше на 64,6; 65 и 56,4%, соответственно, чем у интактных животных (см. табл. 4). Относительное содержание нейтрофилов через 3, 7 и 10 сут после операции возрастало на 93,1%, в 3,5 и 3,4 раза, соответственно, по сравнению с интактным контролем. При этом спустя 7 и 10 сут данный показатель был больше на 82,7 и 75,3%, соответственно, чем через 3 сут (см. табл. 4).

Абсолютное количество нейтрофилов в единице площади среза сердца через 3, 7 и 10 сут после создания дефекта ПМБК и использования экзосом МСК возросло в 2,6; 5,7 и 6,3 раза, соответственно, относительно интактных кроликов. Спустя 7 и 10 сут данный показатель был выше в 2,2 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению с 3-ми сутками (см. табл. 4). Доля макрофагов через 3, 7 и 10 сут возрастало в 2,2 раза, на 97,5% и в 2,3 раза, соответственно, по сравнению с контролем (см. табл. 4). Содержание фагоцитов в единице площади среза миокарда через 3, 7 и 10 сут возросло в 3, 3,2 и 4,2 раза относительно интактных кроликов (см. табл. 4). Доля клеток с явлениями деструкции через 3 и 7 сут после хирургического вмешательства было выше в 2,1 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению с интактным контролем (см. табл. 4). Численная плотность этих клеток в единице площади среза сердца через 3, 7 и 10 сут после создания дефекта ПМБК с последующим применением экзосом МСК возросла в 2,9; 3,9 и 2,8 раза, соответственно, относительно интактных кроликов (см. табл. 4).

В качестве эффекта применения экзосом МСК было обнаружено, что на 3-и сутки после повреждения ПМБК с последующим их введением, по сравнению с такой же операцией, но без них, в миокарде правого желудочка статистически значимо уменьшались процентное содержание и численная плотность лимфоцитов на 33,5 и 68%, соответственно, а также относительное и абсолютное количество нейтрофилов – соответственно на 77,8% и в 2,2 раза. На фоне этого возрастало процентное содержание эритроцитов, моноцитов и макрофагов – соответственно на 77,8; 60,1% и в 2,1 раза.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что в миокарде правого и левого желудочков сердца развиваются одинаковые по направленности структурно-функциональные изменения в ответ на дистантное повреждение костной ткани, которые сохраняются в течение не менее 10 сут. Выявленные изменения составляют структурную основу сердечной недостаточности в посттравматический период. Применение экзосом МСК сопровождается снижением литических изменений кардиомиоцитов, но более выраженными нарушениями гемодинамики с формированием обширных геморрагий.

ВЫВОДЫ

1. По данным патоморфологического исследования, повреждение проксимального мышелка большеберцовой кости у кроликов сопровождается развитием дистрофических изменений кардиомиоцитов, отеком миокарда, полнокровием и расширением лимфатических сосудов, лейкоцитарной инфильтрацией с преобладанием лимфоцитов и макрофагов. В процессе обширных операций на трубчатых костях конечностей возможно попадание структур красного костного мозга в правые полости сердца с формированием тромбов.

2. Введенные в поврежденный проксимальный мышелок большеберцовой кости кроликов экзосомы МСК с мечеными флюоресцентным красителем мембранами выявляются в течение 7 сут в сосудах миокарда и периваскулярно. Интенсивность свечения экзосом МСК и их количество постепенно снижаются вплоть до почти полного исчезновения к 10-м суткам эксперимента.

3. Применение экзосом МСК сопровождается более значительной дилатацией кровеносных сосудов с формированием обширных геморрагий, формированием тромбов как в полостях сердца, так и в его сосудах, пролонгацией явлений отека, но снижением выраженности дистрофических изменений кардиомиоцитов.

4. В миокарде правого и левого желудочков развиваются одинаковые по направленности структурно-функциональные и воспалительно-клеточные изменения в ответ на дистантное повреждение костной ткани, которые сохраняются в течение 10 сут. Наиболее выраженные изменения структурной организации миокарда правого и левого желудочков сердца кроликов после повреждения проксимального мышелка большеберцовой кости, в том числе и при введении экзосом МСК, происходят через 7 сут эксперимента и проявляются в уменьшении объемной плотности кардиомиоцитов на 22 – 23%, увеличении объемной плотности сосудов микроциркуляторного русла соответственно в 8,5 и 5 раз и увеличении суммарной объемной плотности клеток, волокон и основного вещества соединительной ткани в 5 – 12 раз.

5. В миокарде левого и правого желудочков сердца кроликов после повреждения проксимального мышелка большеберцовой кости возрастает общая численность клеток инфильтрата, наиболее значительно через 3 сут эксперимента (соответственно на 72 и 67%). В наибольшей степени увеличивается относительное и абсолютное содержание нейтрофилов (соответственно в 4,1 и 7,4 раза), эритроцитов (соответственно в 2,4 и 4,1 раза), макрофагов (соответственно в 2,1 раза и на 81%), клеток с признаками деструкции (соответственно в 2,6 и 4,6 раза).

6. В результате введения экзосом МСК после моделирования дефекта проксимального мышелка большеберцовой кости наиболее значительное увеличение общей численности клеток инфильтрата в миокарде левого и правого желудочков сердца происходит через 10 сут эксперимента (соответственно на 92 и 85%). В воспалительном инфильтрате в большей степени возрастает относительное и абсолютное содержание нейтрофилов (соответственно в 3,9 и 7,6 раза), эритроцитов (соответственно в 5,2 и 6,6 раза), макрофагов (соответственно в 2,3 и 4,2 раза), клеток с признаками деструкции (соответственно в 2,1 и 4,1 раза).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кузькин С.А., Майбородин И.В., Майбородина В.И., Шевела А.А. Возможность попадания в миокард экзосом мультипотентных стромальных клеток, введенных в дефект кости конечности в эксперименте // *Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов. Материалы 9-й Всероссийской научно-практической конференции.* – Новосибирск, 2020. – С. 76-77.

2. Кузькин С.А., Майбородин И.В., Колдышева Е.В., Клиникова М.Г., Майбородина В.И. Патоморфология миокарда при отдаленном повреждении костной ткани и применении экзосом мультипотентных стромальных клеток // *Современные проблемы науки и образования.* – 2021. – № 5; URL: <https://science-education.ru/article/view?id=31136>

3. Кузькин С.А., Майбородин И.В., Шевела А.А., Майбородина В.И., Лушникова Е.Л., Шевела А.И. Возможность попадания экзосом мультипотентных стромальных клеток в миокард в результате инъекции в дефект костной ткани конечности // **Медицина в Кузбассе.** – 2021. – № 4. – С. 20-25.

4. Maiborodin I., Klinnikova M., Kuzkin S., Maiborodina V., Krasil'nikov S., Pichigina A., Lushnikova E. Morphology of the Myocardium after Experimental Bone Tissue Trauma and the Use of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Multipotent Stromal Cells // **J. Pers. Med.** - 2021. Vol. 11. - № 11. - P. 1206.

5. Кузькин С.А., Майбородина В.И. Патоморфология миокарда при травме костной ткани и экспериментальном применении экзосом мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток // **Материалы VI съезда Российского общества патологоанатомов.** – М: Группа МДВ, 2022. – С. 84-85.

Соискатель

С.А. Кузькин