



Оригинальная статья / Research article

Улучшение структуры миокарда после развившегося фиброзного перерождения в условиях применения аллогенного биоматериала

А. И. Лебедева¹, С. А. Афанасьев², Е. М. Гареев¹, Д. С. Кондратьева², Л. А. Мусина¹,
С. В. Попов², А. В. Прусаков³, А. В. Яшин³, В. С. Понамарёв³✉, В. Д. Раднатаров⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (БГМУ), 450077, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3

² Научно-исследовательский институт кардиологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (НИИ кардиологии Томского НИМЦ), 634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, д. 111а

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (СПбГУВМ), 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Бурятская государственная сельскохозяйственная академия имени В. Р. Филлипова» (ФГБОУ ВО Бурятская ГСХА), 670024, Россия, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Пушкина, д. 8

✉ Контактное лицо: Понамарёв Владимир Сергеевич. E-mail: psevdopyos@mail.ru

ORCID: А. И. Лебедева – <https://orcid.org/0000-0002-9170-2600>; С. А. Афанасьев – <https://orcid.org/0000-0001-6066-3998>; Е. М. Гареев – <https://orcid.org/0000-0002-6561-0892>; Д. С. Кондратьева – <https://orcid.org/0000-0002-4004-2497>; Л. А. Мусина – <https://orcid.org/0000-0003-1237-9284>; С. В. Попов – <https://orcid.org/0000-0002-9050-4493>; А. В. Прусаков – <https://orcid.org/0000-0001-5582-5155>; А. В. Яшин – <https://orcid.org/0000-0002-3614-4730>; В. С. Понамарёв – <https://orcid.org/0000-0002-6852-3110>; В. Д. Раднатаров – <https://orcid.org/0009-0006-5115-7501>.

Статья поступила: 28.11.2022

Статья принята в печать: 02.08.2023

Статья опубликована: 25.08.2023

Резюме

Введение. Вопрос о возможности восстановления постишемического миокарда остается актуальным.

Цель. Целью исследования явилось изучение влияния диспергированного децеллюляризованного аллогенного внеклеточного матрикса (аллогенного биоматериала, ДАБ) на развившееся фиброзное перерождение миокарда, а также раскрытие возможных механизмов клеточной регенерации.

Материалы и методы. Мышечная стенка сердца крыс была подвергнута криодеструкции. Через 45 суток крысам основной группы в область поражённого миокарда интрамиокардиально вводили суспензию аллогенного биоматериала, а крысам контрольной группы – физиологический раствор.

Результаты и обсуждение. В опытной группе происходил регресс сформировавшейся волокнистой соединительной ткани, хемотракция прогениторных клеток, их дифференциация и интеграция в миокард. Толщина мышечной части стенки левого желудочка была на три порядка выше, чем в контрольной группе.

Заключение. Анализ результатов исследования свидетельствует о том, что сердце у взрослых млекопитающих обладает мощным регенеративным резервом. Вполне вероятно, что на основе использования ДАБ может быть разработан протокол, позволяющий восстанавливать сердечную мышцу даже в условиях уже развившегося фиброзного перерождения.

Ключевые слова: экстрацеллюлярный межклеточный матрикс, кардиомиогенные клетки, аллогенный биоматериал, рубец, миокард, регенерация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. И. Лебедева, Е. М. Гареев и Л. А. Мусина – предоставление аллогенного биоматериала, разработка методики исследования, обзор литературы. С. А. Афанасьев, Д. С. Кондратьева, С. В. Попов – выполнение гистологического исследования проб, предоставление фотографий, анализ результатов. А. В. Прусаков, А. В. Яшин, В. С. Понамарёв – проведение эксперимента, отбор проб, оформление статьи, общение с редакцией. В. Д. Раднатаров – написание статьи, обзор литературы.

Благодарность. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00124-21-00, утвержденного 23.12.2020.

Для цитирования: Лебедева А. И., Афанасьев С. А., Гареев Е. М., Кондратьева Д. С., Мусина Л. А., Попов С. В., Прусаков А. В., Яшин А. В., Понамарёв В. С., Раднатаров В. Д. Улучшение структуры миокарда после развившегося фиброзного перерождения в условиях применения аллогенного биоматериала. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(3):202–211. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-202-211>

Improvement of Myocardial Structure after Developed Fibrous Degeneration Under the Use of Allogenic Biomaterial

Anna I. Lebedeva¹, Sergey A. Afanasiev², Evgeny M. Gareev¹, Dina S. Kondratieva²,
Lyalya A. Musina¹, Sergey V. Popov², Alexey V. Prusakov³, Anatoliy V. Yashin³,
Vladimir S. Ponomarev³✉, Vladimir D. Radnatarov⁴

© Лебедева А. И., Афанасьев С. А., Гареев Е. М., Кондратьева Д. С., Мусина Л. А., Попов С. В., Прусаков А. В., Яшин А. В., Понамарёв В. С., Раднатаров В. Д., 2023

© Lebedeva A. I., Afanasiev S. A., Gareev E. M., Kondratieva D. S., Musina L. A., Popov S. V., Prusakov A. V., Yashin A. V., Ponomarev V. S., Radnatarov V. D., 2023

¹ Bashkir State Medical University (BSMU), 3, Lenina str., Ufa, Republic of Bashkortostan, 450077, Russia

² Cardiology Research Institute, Federal State Budgetary Scientific Institution "Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences", 111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russia

³ Saint-Petersburg State University of Veterinary Medicine, 5, Chernigovskaya str., Saint Petersburg, 196084, Russia

⁴ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education "Buryat State Agriculture Academy by V. R. Philippov"; FSBEI HPE Buryat SAA, 8, Pushkina str., Ulan-Ude, Republic of Buryatia, 670024, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir S. Ponamarev. **E-mail:** psevdopyos@mail.ru

ORCID: Anna I. Lebedeva – <https://orcid.org/0000-0002-9170-2600>; Sergey A. Afanasiev – <https://orcid.org/0000-0001-6066-3998>; Evgeny M. Gareev – <https://orcid.org/0000-0002-6561-0892>; Dina S. Kondratieva – <https://orcid.org/0000-0002-4004-2497>; Lyalya A. Musina – <https://orcid.org/0000-0003-1237-9284>; Sergey V. Popov – <https://orcid.org/0000-0002-9050-4493>; Alexey V. Prusakov – <https://orcid.org/0000-0001-5582-5155>; Anatoliy V. Yashin – <https://orcid.org/0000-0002-3614-4730>; Vladimir S. Ponamarev – <https://orcid.org/0000-0002-6852-3110>; Vladimir D. Radnatarov – <https://orcid.org/0009-0006-5115-7501>.

Received: 28.11.2022 **Revised:** 02.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. The question of the possibility of recovery of postischemic myocardium remains relevant.

Aim. The aim of the study was to study the effect of dispersed decellularized allogeneic extracellular matrix (allogeneic biomaterial, DAB) on the developed fibrous degeneration of the myocardium, as well as to reveal the possible mechanisms of cellular regeneration.

Materials and methods. The muscular wall of the heart of rats was subjected to cryodestruction. After 45 days, the rats of the main group were intramyocardially injected with a suspension of allogeneic biomaterial into the area of the affected myocardium, and the rats of the control group were injected with saline.

Results and discussions. In the experimental group, there was a regression of the formed fibrous connective tissue, chemoattraction of progenitor cells, their differentiation and integration into the myocardium. The thickness of the muscular part of the wall of the left ventricle was three orders of magnitude higher than in the control group.

Conclusion. Analysis of the results of the study indicates that the heart in adult mammals has a powerful regenerative reserve. It is likely that, based on the use of DAB, a protocol can be developed that allows the restoration of the heart muscle even in conditions of already developed fibrous degeneration.

Keywords: extracellular extracellular matrix, cardiomyogenic cells, allogeneic biomaterial, scar, myocardium, regeneration

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anna I. Lebedeva, Evgeny M. Gareev, Lyalya A. Musina – provision of allogeneic biomaterial, development of research methodology, literature review. Sergey A. Afanasiev, Dina S. Kondratieva, Sergey V. Popov – performing a histological examination of samples, providing photographs, analyzing the results. Alexey V. Prusakov, Anatoliy V. Yashin, Vladimir S. Ponamarev – conducting an experiment, sampling, designing an article, communicating with the editors. Vladimir D. Radnatarov – writing an article, literature review.

Acknowledgment. The work was carried out within the framework of State Assignment No. 056-00124-21-00, approved on December 23, 2020.

For citation: Lebedeva A. I., Afanasiev S. A., Gareev E. M., Kondratieva D. S., Musina L. A., Popov S. V., Prusakov A. V., Yashin A. V., Ponamarev V. S., Radnatarov V. D. Improvement of myocardial structure after developed fibrous degeneration under the use of allogeneic biomaterial. *Drug development & registration*. 2023;12(3):202–211. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-202-211>

ВВЕДЕНИЕ

Ремоделирование ишемически поврежденного миокарда, как правило, заканчивается развитием фиброза и приводит к хронической сердечной недостаточности [1]. Признано, что сердце является постмитотическим органом, в котором клеточная регенерация затруднительна [2]. Однако существует и противоположная точка зрения, где обсуждается возможность регенераторного клеточного потенциала [3–8]. С целью стимуляции восстановительных процессов в ишемически поврежденных органах используют различные методы: генно- и тканеинженерные конструкции, клеточную терапию, имплантацию экстрацеллюлярного матрикса, биопринтинг и т. д. [9–11]. Индукция эндогенной пролиферации кардиомиоцитов исследуется в последнее время как потенциальный подход к созданию миокарда *de novo*. Одним из перспективных подходов к реорганизации кардиосклеротических трансформаций яв-

ляется применение децеллюляризованных аллогенных биоматериалов (ДАБ), изготовленных на основе внеклеточного матрикса.

Целью данного исследования явилось изучение влияния аллогенного биоматериала на уже развившееся фиброзное перерождение миокарда, а также раскрытие возможных механизмов клеточной регенерации при использовании ДАБ в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар, массой 200–250 г. Животных содержали в условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Манипуляции с животными проводили, руководствуясь положениями приказа Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказа

Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755).

Было оказано криодеструктивное воздействие на миокард всех животных. Для этого животных наркотизировали (раствор зоветила в дозе 1 мг/кг внутримышечно) и выполняли левостороннюю торакотомию. К верхушке сердца на 10 с прикладывали массивный металлический стилет, охлажденный до температуры жидкого азота. Рабочей поверхностью являлся плоский торец стилета диаметром 6 мм. Затем рану послойно зашивали [12]. Такое деструктивное воздействие обеспечивает получение у всех лабораторных животных практически одинаковых по объему и локализации очагов поражения (рисунок 1).

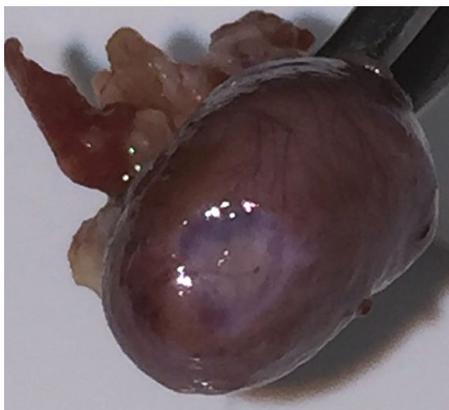


Рисунок 1. Зона криодеструкции миокарда через 45 суток после применения жидкого азота. Макропрепарат

Figure 1. Zone of myocardial cryodestruction 45 days after the application of liquid nitrogen. macropreparation

Животные были разделены на две группы – контрольную ($n = 40$) и основную ($n = 40$). Через 45 суток после криодеструкции при повторной торакотомии в основной группе в пограничные области фиброзного участка, сформировавшегося на месте криогенного некроза, вводили суспензию ДАБ. Каждому животному выполняли 6 интрамиокардиальных инъекций, содержащих 0,5 мг сухого вещества и объемом не более 10 мкл. Доза была выбрана в соответствии с ранее проведенными исследованиями (Лебедева и др., 2018). Суспензию ДАБ в 0,9%-м физиологическом растворе готовили непосредственно перед проведением инъекций. В качестве ДАБ использовали измельченную форму биоматериала Аллоплант® с размером частиц 50–80 мкм, разработанного в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ г. Уфы. Биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР № 87 901-87 от 22.07.1987 года. Для настоящего исследования биоматериал был изготовлен из экстрацеллюлярного матрикса сухожилий крысы. Животным контрольной группы вводили 0,9%-й физиологический раствор в том же объеме.

Через 3, 7, 14, 45 суток после введения ДАБ или физиологического раствора крыс выводили из эксперимента. На каждую точку исследования приходилось по 10 животных. Сердца животных, выведенных из эксперимента, фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), окрашивали их гематоксилином и эозином по Ван Гизону и по Маллори. Для иммуногистохимических исследований парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первых антител применяли MMP-9, Pecam-1, c-kit, Gata-4 в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), сердечный тропонин I тип 3 в разведении 1:150 (ООО «БелкиАнтитела», Россия). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Определяли толщину мышечной стенки левого желудочка.

Анализ осуществлялся с применением непараметрических (ранговых) методов – однофакторного дисперсионного анализа по Крускалу–Уоллесу и сравнения некоррелированных данных методом Манна–Уитни [13]. Использовались медианы (Me) и границы вариации (Min-Max). Построение диаграммы осуществляли в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологические исследования миокарда крыс контрольной группы, выведенных из эксперимента в различные сроки после введения физиологического раствора, не выявили значимых внутригрупповых различий. На рисунке 1 представлен типичный вид миокарда таких крыс. Определялась плотная волокнистая аваскулярная соединительная ткань. Выявлялись мышечные волокна, «запечатанные» коллагеновыми волокнами. В перифокальной зоне, на границе мышечной и плотной волокнистой соединительной ткани, определялись признаки интерстициального фиброза. Количество кровеносных сосудов было снижено, а капиллярные сети отсутствовали или были резко редуцированы.

Принципиально иначе выглядел миокард крыс основной группы, где плотная волокнистая соединительная ткань трансформировалась в рыхлую. Реактивная зона была представлена тонкими коллагеновыми волокнами с расширенными межволоконными пространствами, содержащими аморфное вещество.

При этом уже по прошествии 3 суток отмечалась выраженная макрофагальная инфильтрация пограничных участков. На рисунке 2, А видно, что центром «притяжения» для макрофагов в этот период являются частицы ДАБ. Именно вокруг них отмечалась наиболее выраженная концентрация этих клеток. Использование окраски по Хейлу показало, что в цитоплазме макрофагальных клеток присутствуют гликозаминогликаны (ГАГ) (рисунок 2, Б).

Для оценки изменения ангиогенного потенциала поврежденные участки миокарда были проанализированы на присутствие Pecam-1-позитивных клеток и разрастание недифференцированных кровеносных сосудов. В основной группе Pecam⁺-клетки наблюдались в стенке сосудов, а также в виде сосудистых почечек роста. Впервые выявление этих клеток становится возможным по прошествии семи су-

ток после инъекции ДАБ (рисунок 3, А). Просветы недифференцированных сосудов были свободные и расширенные.

Эффективный рост гемокапилляров возможен только при соответствующем микроокружении, представленном продуктами биodeградации ДАБ в поврежденном миокарде. Мы исследовали экспрессию инфильтрирующими клетками фермента металлопротеиназы-9 (ММР-9), являющегося представителем целого семейства структурно связанных протеолитических ферментов. Оказалось, что в основной группе уже в ранние сроки (3 суток) инфильтрирующие ДАБ макрофаги были позитивны к данному ферменту. Фермент выявлялся как в цитоплазме клеток, так и в виде отложений на коллагеновых волокнах (рисунок 3, Б). Для животных, выведенных из эксперимента в период 7–14 суток, была

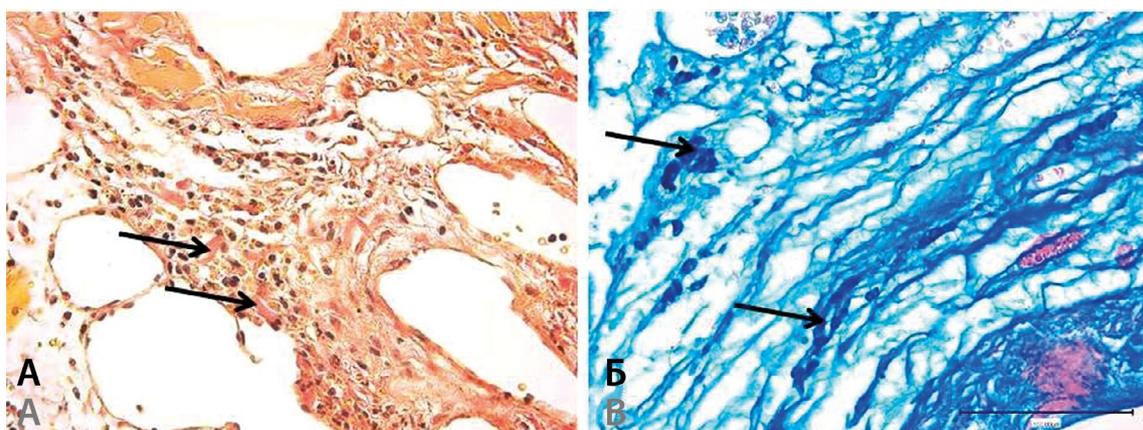


Рисунок 2. Клеточная реакция в ответ на введение ДАБ через 3 суток.

А – инфильтрация макрофагами частиц ДАБ (↑). Окраска по Ван Гизону; Б – Хейл-позитивная реакция макрофагов (↑). Окраска по Хейлу

Figure 2. Cellular response to DAB administration after 3 days.

А – infiltration of DAB particles by macrophages (↑). Coloring according to Van Gieson; B – Hale-positive reaction of macrophages (↑). Hale coloring

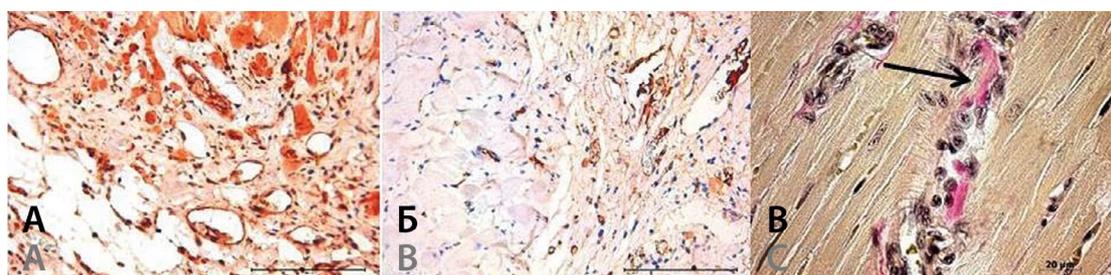


Рисунок 3. Реорганизация миокардиального рубца.

А – новообразованные гемокапилляры после введения ДАБ через 7 суток. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления Pecam⁺ с докраской гематоксилином; Б – экспрессия ММР-9 через 3 суток после введения ДАБ в рубец. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления ММР-9 с докраской гематоксилином; В – фрагментация коллагеновых волокон (↑) макрофагами и фибробластами. Окраска по Ван Гизону

Figure 3. Reorganization of the myocardial scar.

А – newly formed hemocapillaries after the introduction of DAB after 7 days. Indirect immunoperoxidase method for the detection of Pecam⁺ with additional staining with hematoxylin; B – MMP-9 expression 3 days after DAB injection into the scar. Indirect immunoperoxidase method for the detection of MMP-9 with additional staining with hematoxylin; C – fragmentation of collagen fibers (↑) by macrophages and fibroblasts. Coloring according to Van Gieson

характерна экспрессия MMP-9, которая прямо пропорционально коррелировала с численностью макрофагальных клеток. Наряду с завершением резорбции и утилизацией аллогенного биоматериала снижалось количество макрофагов и, соответственно, содержание MMP-9.

В основной группе при исследовании подвергшихся фиброзному перерождению участков миокарда были обнаружены зоны с фрагментированными коллагеновыми волокнами (рисунок 3, В). Фрагменты волокон были набухшие, но сохраняли свои тинкториальные свойства – фуксинофилию. Возле них определялась макрофагально-фибробластическая инфильтрация.

При исследовании состава клеточного инфильтрата, формирующегося в миокарде крыс после инъекции ДАБ, было обнаружено присутствие малодифференцированных *c-kit*⁺/*GATA-4*⁺-клеток (рисунок 4, А). Эти клетки выявлялись спустя 7 суток в реактивной зоне, граничащей с сохранившимся миокардом, и в субэпикардальном пространстве. Клетки имели неправильную полиморфную форму. На электроннограммах в цитоплазме этих клеток были видны многочисленные овальные митохондрии с параллельно ориентированными ламеллярными кристами и умеренно плотным матриксом. Определялись диссоциированные миофиламенты, на концах которых фиксировались осмиофильные гранулы гликогена, участвующие в сборке сократительных элементов. Обнаруживались полисомы и единичные рибосомы, а также мелкие везикулы и пиноцитозные пузырьки по периферии цитолеммы. Клетки не имели миофибрилл с поперечной исчерченностью. Однако между собой эти клетки были способны формировать вставочные диски (рисунок 4, Б).

Еще одной особенностью клеточного инфильтрата миокарда крыс основной группы было присутствие клеток, позитивных к сердечному тропонину I. Такие клетки выявлялись уже через 3 суток, где сердечный тропонин I локализовался в них в виде цитоплазматических гранул. К 7 суткам эти клетки приобретали удлинённые формы, имели малую форму, в их цитоплазме четко проявлялась поперечная исчерченность. Клетки были разрозненны и не образовывали между собой контактов. По прошествии 14 суток позитивные к сердечному тропонину I клетки образовывали между собой контакты и выявлялись в виде функционального синцития. Но ядерно-цитоплазматическое отношение было практически равно единице. Новые миоциты были малых размеров и имели одновекторное направление. К 45 суткам клетки увеличивались в размерах. Ядерно-цитоплазматическое отношение смещалось и становилось меньше единицы. Происходила гипертрофия клеток как концентрическая (утолщение миофибриллярных пучков), так и эксцентрическая (удлинение кардиомиоцитов за счет присоединения саркомеров). Клетки имели центрально расположенные ядра и концентрировались в виде кластеров (рисунок 5).

Морфометрический анализ показал, что через 45 суток в основной группе толщина мышечной части стенки левого желудочка оказалась значимо ($Z = 2,6, p < 0,008$) выше, чем в контрольной: $Me = 0,906$ мм [0,730–1,580] против $Me = 0,330$ мм [0,222–0,455] (рисунок 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях данной экспериментальной модели хронической фазы инфаркта миокарда была рассмотрена способность ДАБ инициировать регресс фиб-

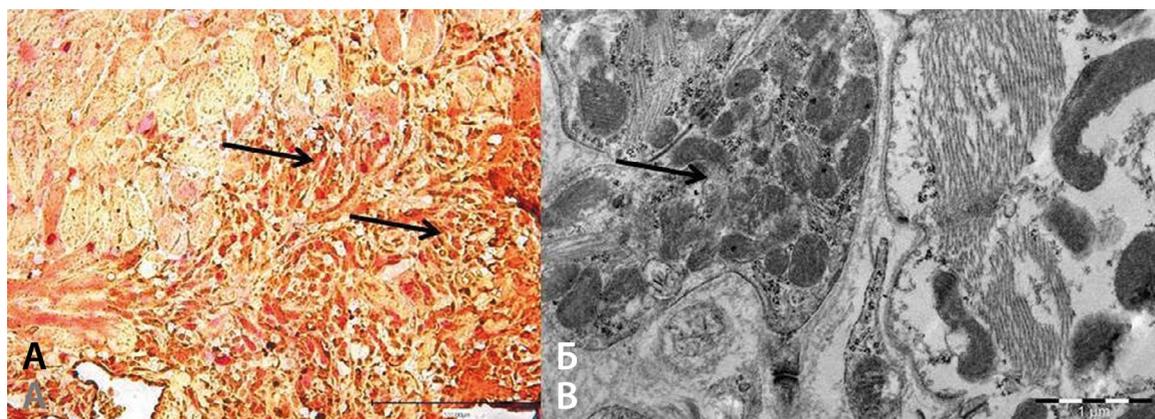


Рисунок 4. Малодифференцированные кардиомиогенные клетки через 7 суток после введения ДАБ в рубец.

А – *c-kit*/*GATA-4*. Двойной непрямой иммунопероксидазный метод выявления *c-kit*/*GATA-4* с докраской гематоксилином; Б – кардиомиобласты. Электроннограмма

Figure 4. Poorly differentiated cardiomyogenic cells 7 days after DAB injection into the scar.

А – *s-set*/*GATA-4*. Double indirect immunoperoxidase chain *c-kit*/*GATA-4* with pre-staining hematoxylin; Б – cardiomyoblasts. Electrongram

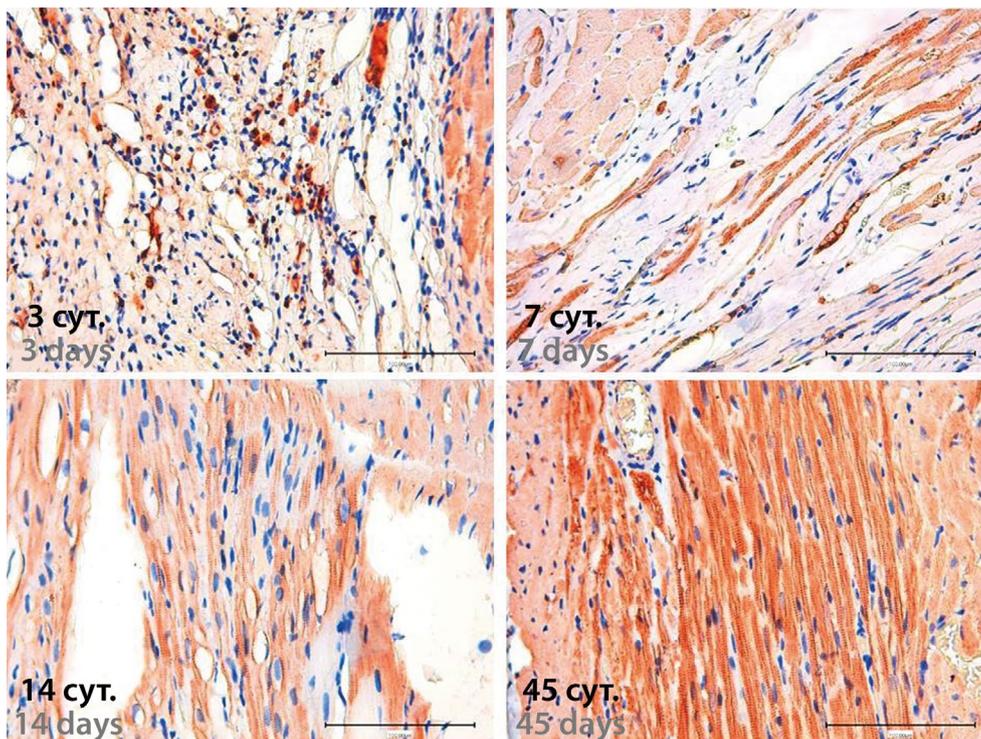


Рисунок 5. Сердечный тропонин I после введения ДАБ в различные сроки. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления сердечного тропонина I с докраской гематоксилином

Figure 5. Cardiac troponin I after DAB administration at various times. Indirect immunoperoxidase method for the detection of cardiac troponin I with additional staining with hematoxylin

розного перерождения миокарда, развившегося в результате криодеструкции. На основании проведенных морфометрических исследований можно сказать, что интрамиокардиальные инъекции суспензии аллогенного биоматериала в зоне кардиосклероза

способствовали утолщению мышечной части стенки левого желудочка. Такой эффект является результатом целого комплекса изменений, инициированных присутствием на границе сохраненного и пораженного миокарда частиц ДАБ.

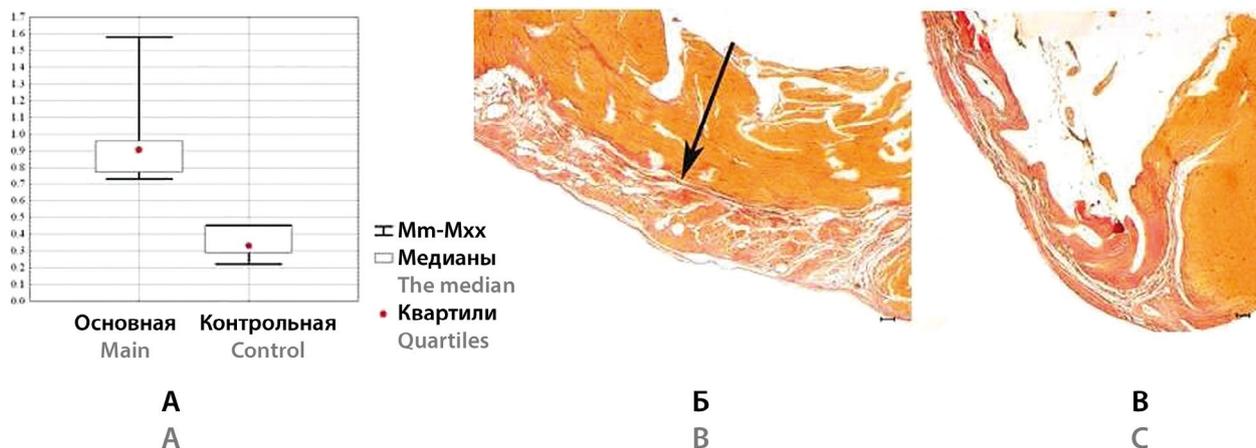


Рисунок 6. Толщина мышечной стенки в основной и контрольной группах крыс через 45 суток после введения физ. раствора.

A – по оси абсцисс – экспериментальные группы. По оси ординат – толщина мышечной стенки миокарда (мм); Б – толщина мышечной части стенки левого желудочка сердца через 45 суток после введения ДАБ (основная группа); В – стенка левого желудочка сердца через 45 суток после введения физ. раствора (контрольная группа). Окраска по Ван Гизону

Figure 6. The thickness of the muscle wall in the main and control groups of rats 45 days after the introduction of physical. solution. A – along the abscissa axis - experimental groups. On the y-axis - the thickness of the muscle wall of the myocardium (mm); B – the thickness of the muscular part of the wall of the left ventricle of the heart 45 days after the introduction of DAB (main group); C – the wall of the left ventricle of the heart 45 days after the introduction of physical. solution (control group). Coloring according to Van Gieson

В нашем исследовании реакция миокарда на имплантацию ДАБ выражалась в активной макрофагальной инфильтрации, особенно возле его частиц. Эта реакция в основной группе наблюдалась уже в ранние сроки и отсутствовала в контрольной группе. Известно, что макрофаги – гетерогенная популяция, включающая различные фенотипы клеток. Они могут проявлять свои функции в зависимости от течения раневого процесса и влияния прочих экзогенных факторов: быть классически активированными (провоспалительными) – M1 и альтернативно активированными (противовоспалительными) – M2 [14]. В нашем исследовании на фоне инъекции ДАБ показано присутствие макрофагов, в цитоплазме которых содержатся гликозаминогликаны. Присутствие таких ГАГ⁺-макрофагов было зафиксировано и в ранее проведенных исследованиях, выполненных с использованием ДАБ. Отмечалось, что эти клетки имеют большое значение в ремоделировании грануляционной ткани, регуляции гомеостаза и формировании зрелого регенерата, который организуется на месте биодеградируемого биоматериала [3–6]. Ранее нами было показано, что инъекции суспензии ДАБ, выполненные в связи с воспалительно-деструктивными и дегенеративными заболеваниями различных тканей и органов, включая острую и подострую фазу ишемического поражения миокарда, ингибируют развитие фиброза в реактивных зонах [3, 4]. При этом также отмечалось присутствие макрофагов, содержащих гликозаминогликаны. Известно, что гликозаминогликаны, связываясь с белковой составляющей, формируют протеогликианы, а эти комплексы играют основную роль в передаче сигналов от внеклеточного матрикса к клетке и служат своеобразными рецепторами клетки к адгезивным молекулам внеклеточного матрикса [15–18]. Именно с ними связывают способность клетки взаимодействовать с микросредой, обеспечивая межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия. Кроме этого, они участвуют в гидратации тканей, фибриллообразовании коллагена, модулируют эффекты факторов роста, цитокинов, влияют на пролиферацию, адгезию клеток, репаративные процессы [19].

Хорошо известно, что функциональная состоятельность любой ткани во многом определяется в том числе и ее адекватным кровоснабжением. Реализация репаративного потенциала любого органа также возможна лишь при его достаточной оксигенации. В нашем исследовании о повышении васкуляризации свидетельствует факт появления Pecam-1-позитивных клеток и разрастания недифференцированных кровеносных сосудов. Известно, что Pecam-1 в высокой степени экспрессируется на эндотелиальных клетках [20]. Эти явления наблюдались только в миокарде основной группы животных и после инъекций ДАБ. Обнаруженный в этом исследовании факт сти-

муляции неоангиогенеза хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о более интенсивном формировании нового микроциркуляторного русла после интрамиокардиальных инъекций ДАБ при экспериментальном инфаркте миокарда [21].

Одна из сложностей рассматриваемого вопроса заключается в том, что придется воздействовать уже на состоявшееся фиброзное перерождение сердечной мышцы. Именно это неблагоприятное окружение препятствует реализации программы органоспецифичной регенерации. Проведенные исследования показали, что росту гемокapилляров предшествует трансформация плотной волокнистой соединительной ткани в рыхлую. Показано, что этому процессу способствует разрушение толстых пучков коллагеновых волокон под воздействием определенных факторов, например активации металлопротеиназ [22]. Такой механизм, вероятно, вполне мог реализоваться и в нашем исследовании. Это предположение хорошо согласуется с тем, что уже по прошествии 3 суток после инъекции ДАБ выявлялись участки с выраженной трансформацией плотной волокнистой соединительной ткани в рыхлую. При этом была зафиксирована нарастающая экспрессия MMP-9. Протеолитический фермент MMP-9 относится к коллагеназам и отвечает за деструкцию коллагена, а именно этот белок составляет основу ДАБ и соединительной ткани, формирующейся на месте пораженного миокарда. Вероятно, этим объясняется резорбция частиц биоматериала и трансформация плотной волокнистой соединительной ткани в рыхлую. Важным является то обстоятельство, что, согласно полученным данным, в резорбции коллагена были задействованы как макрофаги, так и фибробластические клетки – фиброкласты. Известно, что фиброкласты участвуют в резорбции самих коллагеновых волокон, а макрофаги утилизируют деструктивные, лизированные, разрушенные волокна в виде детрита [23]. Этот результат свидетельствует о том, что при использовании ДАБ происходит, вероятно, максимально полная активация эндогенных механизмов, направленных на регресс фиброзных образований, возникших на месте повреждения миокарда.

Говоря о желательности формирования органоспецифичного регенерата, нужно представлять, какие клетки способны составить его основу. Этот вопрос остается открытым. В проведенном исследовании были рассмотрены наиболее известные маркеры (C-kit и GATA-4) региональных прогениторных клеток. При этом тот факт, что антитела C-kit и GATA-4 имеют разную внутриклеточную локализацию, позволяет проводить их комбинированную идентификацию. В настоящее время C-kit⁺-клетки не рассматриваются как возможные предшественники кардиомиобластов [7]. Однако признается, что GATA-4 выполняет функцию ключевого регулятора кардиальных генов,

участвует в контроле сборки саркомеров в кардиомиоцитах и в их дифференцировке [24]. В связи с этим c-kit⁺/GATA-4⁺-клетки можно отнести к малодифференцированным кардиомиогенным формам и коммитированным клеткам, что подтверждается их ультраструктурными особенностями – высокой энергоемкостью, белок- и углеводсинтетической активностью, синтезом диссоциированных филаментов [25]. Помимо этого, были обнаружены и прослежены хронологические этапы дифференциации позитивных клеток к сердечному тронину I – кардиоспецифичному белку сокращающихся кардиомиоцитов [26].

Известно, что резидентные прогениторные клетки миокарда локализованы в стволовых нишах, в субэпикардальном пространстве, не отрицается способность эпителиально-мезенхимальных переходов, а также хемоаттракция стволовых клеток из костного мозга [27]. Ранее выявлено, что ДАБ является аттрактантом мезенхимальных стволовых клеток CD45⁺/CD90⁺ [28]. Эти данные хорошо согласуются с представлением о том, что внеклеточный матрикс, как основной компонент ДАБ, влияет на фенотип и поведение клеток, их эпителиально-мезенхимальный переход или переход в эндотелии сосудов. Считается, что эти переходы определяют общность механизмов, работающих как в эмбриогенезе, так и при заживлении ран. Исходя из того, что в нашем исследовании c-kit⁺/GATA-4⁺-клетки были обнаружены уже по прошествии 3 суток и в непосредственной близости кардиомиоцитов, можно предположить, что источником выявленных скоплений кардиомиобластов являются клеточные ниши резидентных стволовых кардиомиогенных клеток. Это предположение не противоречит данным о том, что в сердце клеточные ниши расположены в зонах с низкой гемодинамической нагрузкой: в предсердиях и в верхушке сердца [29]. В нашем исследовании именно верхушка сердца и была подвергнута воздействию криодеструкции с последующими инъекциями суспензии ДАБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов исследования свидетельствует о том, что сердце у взрослых млекопитающих обладает мощным регенеративным резервом. И при восстановлении поврежденного миокарда нужно изменить эндогенную программу регенерации. При этом имплантация ДАБ обеспечивает хемоаттракцию макрофагов, способствующих резорбции плотных коллагеновых волокон и активации неоангиогенеза, а также появлению малодифференцированных кардиомиогенных клеток с их дальнейшей дифференцировкой в полноценные рабочие кардиомиоциты. Вполне вероятно, что на основе использования ДАБ может быть разработан протокол, позволяющий восстанавливать сердечную мышцу даже в условиях уже развившегося фиброзного перерождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Travers J.G., Kamal F.A., Robbins J., Yutzey K.E., Blaxall B.C. Cardiac fibrosis. *Circulation Research*. 2016;118(6):1021–1040. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.
2. Soonpaa M.H., Kim K.K., Pajak L., Franklin M., Field L.J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996;271(5):H2183–H2189. DOI: 10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2183.
3. Лебедева А.И. Биоматериал Аллоплант при регенерации миометрия рога матки экспериментальных животных – стимулятор макрофагов мезенхимного происхождения. *Биомедицина*. 2016;2:45–53.
4. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Попов С.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Экспериментальный кардиомиогенез в условиях применения различных доз аллогенного биоматериала. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018;165(6):753–756.
5. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Попов С.В., Афанасьев С.А. Стимуляция аутологичных прогениторных и коммитированных клеток в ишемически поврежденном миокарде. *Российский кардиологический журнал*. 2018;23(11):123–129.
6. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Гареев Е.М., Кадыров Р.З., Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Попов С.В. Эффект интрамиокардиального введения аллогенного биоматериала на уровень ангиогенеза и ремоделирования постишемического рубца у крыс. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020;22(3):156–166.
7. Парфенова Е.В. Стволовые клетки сердца: факт или фантазия? *Российский кардиологический журнал*. 2019;24(11):84–90.
8. Belostotskaya G., Sonin D., Galagudza M. Intracellular development of resident cardiac stem cells: an overlooked phenomenon in myocardial self-renewal and regeneration. *Life*. 2021;11(8):723. DOI: 10.3390/life11080723.
9. Попов С.В., Рябов В.В., Сусллова Т.Е., Штатолкина М.А., Веснина Ж.В., Крылов А.Л., Афанасьев С.А., Марков В.А., Карпов Р.С. Фундаментальные и прикладные аспекты клеточных технологий в кардиологии и кардиохирургии. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2008;28(4):5–15.
10. Пронина Е.А., Попыхова Э.Б., Степанова Т.В., Иванов А.Н. Современные направления и перспективы развития регенеративной медицины. *Современные проблемы науки и образования*. 2019;3.
11. Bolli R., Mitrani R.D., Hare J.M., Pepine C.J., Perin E.C., Willerson J.T., Traverse J.H., Henry T.D., Yang P.C., Murphy M.P., March K.L., Schulman I.H., Ikram S., Lee D.P., O'Brien C., Lima J.A., Ostovaneh M.R., Ambale-Venkatesh B., Lewis G., Khan A., Bacallao K., Valasaki K., Longsomboon B., Gee A.P., Richman S., Taylor D.A., Lai D., Sayre S.L., Bettencourt J., Vojvodic R.W., Cohen M.L., Simpson L., Aguilar D., Loughin C., Moyé L., Ebert R.F., Davis B.R., Simari R.D. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRN CONCERT-HF trial. *European Journal of Heart Failure*. 2021;23(4):661–674.
12. Афанасьев С.А., Роговская Ю.В., Фалалева Л.П., Свиридов И.Н., Шахов В.П., Попов С.В. Сравнительная оценка ремоделирования сердца крысы после экспериментального стеноза коронарной артерии и криодеструкции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009;6:631–634.
13. Кузнецов Ю.Е., Лунегов А.М., Понамарев В.С., Ромашова Е.Б. Корреляционные взаимосвязи между содержанием общих желчных кислот и основными биохимическими показателями крови у норки (*Mustela vison* Schreber, 1777). *Сельскохозяйственная биология*. 2022;57(6):1217–1224. DOI: 10.15389/agrobiol.2022.6.1217rus.
14. Гомбожапова А.Э., Роговская Ю.В., Ребенкова М.С., Кжышковская Ю.Г., Рябов В.В. Фенотипическая гетерогенность сердечных макрофагов в постинфарктной регенерации миокарда:

- перспективы клинических исследований. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2018;33(2):70–76. DOI: 10.29001/2073-8552-2018-33-2-70-76.
15. Ponamarev V., Yashin A., Prusakov A., Popova O. Influence of Modern Probiotics on Morphological Indicators of Pigs' Blood in Toxic Dyspepsia. In: *Agriculture Digitalization and Organic Production: Proceedings of the Second International Conference*. St. Petersburg: Springer. 2022. 133–142. DOI: 10.1007/978-981-19-7780-0_12.
 16. Baryshev V.A., Popova O.S., Ponamarev V.S. New methods for detoxification of heavy metals and mycotoxins in dairy cows. *Online Journal of Animal and Feed Research*. 2022;12(2):81–88. DOI: 10.51227/ojaf.2022.11.
 17. Stepanov I.S., Kalugniy I.I., Markova D.S., Yashin A.V., Prusakov A.V., Ponamarev V.S., Lunegov A.M. Development and application of new methods of correction and prevention of metabolic diseases in Holstein cattle. *IOP conference series: earth and environmental science: Agriculture, field cultivation, animal husbandry, forestry and agricultural products*. 2021;723(2):022030. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022030.
 18. Kalugniy I.I., Markova D.S., Yashin A.V., Prusakov A.V., Ponamarev V.S., Andreeva N.L. Diagnosis of hepatopathy in Holstein cattle with metabolic disorders. *IOP conference series: earth and environmental science: Agriculture, field cultivation, animal husbandry, forestry and agricultural products*. 2021;723:022029.
 19. Bassat E., Mutlak Y.E., Genzelinakh A., Shadrin I.Y., Umansky K.B., Yifa O., Kain D., Rajchman D., Leach J., Bassat D.R., Udi Y., Sarig R., Sagi I., Martin J.F., Bursac N., Cohen Sh., Tzahor E. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature*. 2017;13(547(7662)):179–184. DOI: 10.1038/nature22978.
 20. Avari H., Rogers K.A., Savory E.J. Quantification of Morphological Modulation, F-Actin Remodeling and PECAM-1 (CD-31) Re-distribution in Endothelial Cells in Response to Fluid-Induced Shear Stress under Various Flow Conditions. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2019;141(4). DOI: 10.1115/1.4042601.
 21. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Afanasiev S.A., Kondratyeva D.S., Popov S.V. Macrophages as homeostatic regulators in the ischemically damaged myocardium after use of allogenic biomaterial. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020;19(1):67–75.
 22. Протасов М. В., Смагина Л. В., Галибин О. В., Пинаев Г. П., Воронкина И. В. Зависимость активности ММП в раневом экссудате крыс от состояния тканей раны на начальных этапах раневого процесса. *Цитология*. 2008;50(10):882–886.
 23. Шехтер А. Б., Милованова З. П. Фибробласт-фиброкласт: ультраструктурные механизмы резорбции коллагеновых волокон при инволюции соединительной ткани. *Архив патологии*. 1975;37(3):13–19.
 24. Oka T., Maillet M., Watt A., Schwartz R.J., Aronow B.J., Duncan S.A., Molkentin J.D. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation Research*. 2006;98(6):837–845. DOI: 10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4.
 25. Хлопонин П. А. Малодифференцированные кардиомиоциты в нормальном и репаративном кардиомиогенезе. Вопросы морфологии XXI в. Выпуск 3. СПб.: Издательство ДЭАН. 2012. С. 88–94.
 26. Katrukha I.A. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Moscow)*. 2013;78(13):1447–1465. DOI: 10.1134/S0006297913130063.
 27. Kuhn E.N., Wu S.M. Origin of cardiac progenitor cells in the developing and postnatal heart. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):321–325.
 28. Курчатова Н. Н., Сибиряк С. В., Хасанов Р. А., Юсупова Р. Ш., Яковлева В. Г., Нигматуллина Э. А., Мулдашев Э. Р. Миграция мезенхимальных стволовых клеток в биоматериалы Alloplant: предварительные данные. *Иммунология Урала*. 2005;1(4):17.
 29. Linke A., Muller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D., Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Böhm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze Th. H., Kajstura J., Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102:8966–8971.

REFERENCES

1. Travers J.G., Kamal F.A., Robbins J., Yutzey K.E., Blaxall B.C. Cardiac fibrosis. *Circulation Research*. 2016;118(6):1021–1040. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.
2. Soonpaa M.H., Kim K.K., Pajak L., Franklin M., Field L.J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996;271(5):H2183–H2189. DOI: 10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2183.
3. Lebedeva A.I. Biomaterial Alloplant in the regeneration of the myometrium of the uterine horn of experimental animals is a macrophage stimulator of mesenchymal origin. *Journal Biomed*. 2016;2:45–53. (In Russ.)
4. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Popov S.V., Afanasiev S.A., Kondratyeva D.S. Experimental cardiomyogenesis under conditions of application of various doses of allogenic biomaterial. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;165(6):753–756. (In Russ.)
5. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Popov S.V., Afanasiev S.A. Stimulation of autologous progenitor and committed cells in ischemic damaged myocardium. *Russian Journal of Cardiology*. 2018;23(11):123–129. (In Russ.)
6. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Musina L.A., Gareev E.M., Kadyrov R.Z., Kondratyeva D.S., Afanasiev S.A., Popov S.V. The effect of intramyocardial administration of allogenic biomaterial on the level of angiogenesis and remodeling of the postischemic scar in rats. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2020;22(3):156–166. (In Russ.)
7. Parfenova E.V. Heart stem cells: fact or fantasy? *Russian Journal of Cardiology*. 2019;24(11):84–90. (In Russ.)
8. Belostotskaya G., Sonin D., Galagudza M. Intracellular development of resident cardiac stem cells: an overlooked phenomenon in myocardial self-renewal and regeneration. *Life*. 2021;11(8):723. DOI: 10.3390/life11080723.
9. Popov S.V., Ryabov V.V., Suslova T.E., Shtatolkin M.A., Vesnina Zh.V., Krylov A.L., Afanasiev S.A., Markov V.A., Karpov R.S. Fundamental and applied aspects of cellular technologies in cardiology and cardiac surgery. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. 2008;28(4):5–15. (In Russ.)
10. Pronina E.A., Popykhova E.B., Stepanova T.V., Ivanov A.N. Modern directions and prospects for the development of regenerative medicine. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2019;3. (In Russ.)
11. Bolli R., Mitrani R.D., Hare J.M., Pepine C.J., Perin E.C., Wilkerson J.T., Traverse J.H., Henry T.D., Yang P.C., Murphy M.P., March K.L., Schulman I.H., Ikram S., Lee D.P., O'Brien C., Lima J.A., Ostovaneh M.R., Ambale-Venkatesh B., Lewis G., Khan A., Bacallao K., Valasaki K., Longsomboon B., Gee A.P., Richman S., Taylor D.A., Lai D., Sayre S.L., Bettencourt J., Vojvodic R.W., Cohen M.L., Simpson L., Aguilar D., Loghin C., Moyé L., Ebert R.F., Davis B.R., Simari R.D. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRN CONCERT-HF trial. *European Journal of Heart Failure*. 2021;23(4):661–674.
12. Afanasiev S.A., Rogovskaya Yu.V., Falaleeva L.P., Sviridov I.N., Shakhov V.P., Popov S.V. Comparative evaluation of rat heart remodeling after experimental coronary artery stenosis and cryodestruction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009;6:631–634. (In Russ.)
13. Kuznetsov Yu. E., Lunegov A. M., Ponamarev V. S., Romashova E. B. Correlations between the content of total bile acids and the main biochemical parameters of blood in minks (*Mustela vison Schreber, 1777*). *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*. 2022;57(6):1217–1224. (In Russ.) DOI: 10.15389/agrobiol.2022.6.1217rus.
14. Gombzhapova A. E., Rogovskaya Yu. V., Rebenkova M. S., Kzhyskowska J. G., Ryabov V. V. Phenotypic heterogeneity of cardiac macrophages during wound healing following myocardial infarction: perspectives in clinical research. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2018;33(2):70–76. (In Russ.) DOI: 10.29001/2073-8552-2018-33-2-70-76.

15. Ponamarev V., Yashin A., Prusakov A., Popova O. Influence of Modern Probiotics on Morphological Indicators of Pigs' Blood in Toxic Dyspepsia. In: Agriculture Digitalization and Organic Production: Proceedings of the Second International Conference. St. Petersburg: Springer. 2022. 133–142. DOI: 10.1007/978-981-19-7780-0_12.
16. Baryshev V.A., Popova O.S., Ponamarev V.S. New methods for detoxification of heavy metals and mycotoxins in dairy cows. *Online Journal of Animal and Feed Research*. 2022;12(2):81–88. DOI: 10.51227/ojaf.2022.11.
17. Stepanov I.S., Kalugniy I.I., Markova D.S., Yashin A.V., Prusakov A.V., Ponamarev V.S., Lunegov A.M. Development and application of new methods of correction and prevention of metabolic diseases in Holstein cattle. *IOP conference series: earth and environmental science: Agriculture, field cultivation, animal husbandry, forestry and agricultural products*. 2021;723(2):022030. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022030.
18. Kalugniy I.I., Markova D.S., Yashin A.V., Prusakov A.V., Ponamarev V.S., Andreeva N.L. Diagnosis of hepatopathy in Holstein cattle with metabolic disorders. *IOP conference series: earth and environmental science: Agriculture, field cultivation, animal husbandry, forestry and agricultural products*. 2021;723:022029.
19. Bassat E., Mutlak Y. E., Genzelinakh A., Shadrin I. Y., Umansky K. B., Yifa O., Kain D., Rajchman D., Leach J., Bassat D. R., Udi Y., Sarig R., Sagi I., Martin J. F., Bursac N., Cohen Sh., Tzahor E. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature*. 2017;13(547(7662)):179–184. DOI: 10.1038/nature22978.
20. Avari H., Rogers K.A., Savory E.J. Quantification of Morphological Modulation, F-Actin Remodeling and PECAM-1 (CD-31) Re-distribution in Endothelial Cells in Response to Fluid-Induced Shear Stress under Various Flow Conditions. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2019;141(4). DOI: 10.1115/1.4042601.
21. Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Afanasiev S.A., Condratyeva D.S., Popov S.V. Macrophages as homeostatic regulators in the ischemically damaged myocardium after use of allogenic biomaterial. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020;19(1):67–75.
22. Protasov M.V., Smagina L.V., Galibin O.V., Pinaev G.P., Voronkina I.V. Dependence of MMP activity in rat wound exudate on the state of wound tissues at the initial stages of the wound process. *Citologiya*. 2008;50(10):882–886. (In Russ.)
23. Shekhter A. B., Milovanova Z. P. Fibroblast-fibroblast: ultrastructural mechanisms of collagen fiber resorption during connective tissue involution. *Pathology Archive*. 1975;37(3):13–19. (In Russ.)
24. Oka T., Maillet M., Watt A., Schwartz R. J., Aronow B. J., Duncan S. A., Molkenstein J. D. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation Research*. 2006;98(6):837–845. DOI: 10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4.
25. Khloponin P. A. Poorly differentiated cardiomyocytes in normal and reparative cardiomyogenesis. Questions of morphology of the XXI century. Issue 3. Saint Petersburg: Izdatel'stvo DEAN. 2012. P. 88–94. (In Russ.)
26. Katrukha I.A. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Moscow)*. 2013;78(13):1447–1465. DOI: 10.1134/S0006297913130063.
27. Kuhn E. N., Wu S. M. Origin of cardiac progenitor cells in the developing and postnatal heart. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):321–325.
28. Kurchatova N.N., Sibiryak S.V., Khasanov R.A., Yusupova R.Sh., Yakovleva V.G., Nigmatullina E.A., Muldashev E.R. Migration of mesenchymal stem cells into Allograft biomaterials: preliminary data: *Immunologiya Urala*. 2005;1(4):17. (In Russ.)
29. Linke A., Muller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D. Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Böhm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze Th. H., Kajstura J., Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102:8966–8971.