

На правах рукописи

Гомбожапова Александра Энхэевна

**ВОССТАНОВИТЕЛЬНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ МИОКАРДА
У БОЛЬНЫХ НА РАННИХ И ПОЗДНИХ СРОКАХ
ИНФАРКТА МИОКАРДА:
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПОЛЯРИЗАЦИЯ МАКРОФАГОВ**

14.01.05 – кардиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской
академии наук» Научно-исследовательский институт кардиологии и Федеральном
государственном автономном образовательном учреждении высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Научный руководитель:

д-р мед. наук Рябов Вячеслав Валерьевич

Научный консультант:

д-р биол. наук, профессор Кжышковска Юлия Георгиевна

Официальные оппоненты:

Парфенова Елена Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт экспериментальной кардиологии, директор.

Бернс Светлана Александровна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория патогенетических аспектов коморбидности, руководитель.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «___» _____ 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.279.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, ул. Киевская, 111а, Научно-исследовательский институт кардиологии

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
д-р мед. наук



Гракова Елена Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Современные методы инвазивного и медикаментозного лечения инфаркта миокарда (ИМ) привели к многократному снижению ранних летальных исходов заболевания (Nielsen P.H., 2010; Puymirat E., 2017; Szummer K., 2018). Однако на сегодняшний день можно выделить два основных тренда, характерных для мировой практики. Первое – это сохранение показателей госпитальной летальности, несмотря на все более широкое внедрение ранней инвазивной стратегии и увеличение частоты проведения эндоваскулярной реваскуляризации миокарда (Szummer K., 2018). Второе – это увеличение количества больных с постинфарктной сердечной недостаточностью (СН) (Chen J., 2013; Ezekowitz J.A., 2009; Gerber Y., 2013; Ritsinger V., 2020).

Основной вклад в показатели госпитальной летальности вносит кардиогенный шок (КШ). В течение последних 15 лет отмечается тенденция к увеличению доли пациентов с КШ (Radhod K.S., 2018). Вместе с тем летальность при КШ не снижается и составляет от 45 до 70%, несмотря на активное использование устройств механической поддержки кровообращения. Разрыв миокарда представляет собой менее частое осложнение ИМ и встречается в 5–20%, но при этом его последствия катастрофичны (Gao X.M., 2012). Аневризма левого желудочка (ЛЖ) развивается у 5–10% больных с ИМ (Ning X., 2018). При этом в острый период ИМ аневризма может стать причиной разрыва миокарда, а в отдаленный период ИМ способствовать прогрессированию ремоделирования сердца и СН, вызывать нарушения ритма и являться причиной системных эмболий (Ruzza A., 2017). Более того, все пациенты, пережившие острый ИМ, остаются в группе высокого риска по развитию неблагоприятного ремоделирования сердца и СН, даже несмотря на своевременное и адекватное лечение инфаркта (Ritsinger V., 2020).

В основе развития осложнений ИМ лежит внезапная потеря сокращающихся кардиомиоцитов и следующий за ней процесс восстановительной регенерации миокарда. То, насколько благополучно будет протекать восстановительная регенерация миокарда, опосредует течение раннего и позднего периода ИМ. Стремительный, но не продолжительный взлет клеточной терапии в лечении ИМ продемонстрировал недостаточность наших знаний о механизмах развития постинфарктного ремоделирования сердца (Fraccarollo D., 2012). Изучение тех процессов, которые определяют баланс между благоприятным и неблагоприятным течением регенерации миокарда, остается актуальным направлением в поиске новых терапевтических мишеней для предотвращения развития острой и хронической СН у больных ИМ.

Система врожденного иммунитета является важным регулятором постинфарктного ремоделирования миокарда (Peet C., 2020). Моноциты/макрофаги принимают участие, как в воспалительной, так и в регенераторной фазе этого процесса. Число провоспалительных сердечных моноцитов/макрофагов быстро увеличивается в первые дни после ИМ (Jung K., 2013; Lee W.W., 2012). В последующие дни воспалительный фенотип моноцитов/макрофагов переходит в преимущественно репаративный фенотип – фенотип, координирующий формирование рубцовой ткани (Nahrendorf M., 2007). Активное участие моноцитов/макрофагов в ответе на острую ишемию миокарда и новые подходы к их изучению сделали эти клетки предметом научного интереса в качестве потенциальных мишеней для предотвращения развития неблагоприятного

ремоделирования сердца после ИМ. Однако различные стратегии, направленные на те или иные субпопуляции моноцитов/макрофагов, дали к настоящему времени противоречивые результаты (Peet С., 2020). Это может быть связано с рядом факторов. Макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток, способных быстро менять свой фенотип под действием сигналов микроокружения, что делает большинство исследований *in vitro* не воспроизводимыми *in vivo* (Nahrendorf М., 2016). Использование упрощенной классификации моноцитов/макрофагов, разделяющих их на две полярные субпопуляции, ограничивает понимание функционирования этих клеток (Nahrendorf М., 2016). Острота, динамичность и мультифакториальность ИМ как заболевания делает его сложным для изучения, как в модели, так и в клинике. Специфичность сердца как органа определяет ограничения к проведению эндомиокардиальной биопсии, что затрудняет накопление клинического материала.

Тем не менее, количество доказательств, демонстрирующих роль моноцитов/макрофагов в разных аспектах развития неблагоприятного раннего и позднего ремоделирования сердца во время и после ИМ растет, а барьеры в изучении моноцитов/макрофагов становятся менее непреодолимыми (Peet С., 2020). Появление в недавнем времени такого метода как секвенирование единичных клеток способствует более прицельной идентификации таргетной популяции макрофагов и новых сигнальных путей для терапевтического воздействия на механизмы, лежащие в основе патогенеза синдрома СН. Все большее количество исследователей склоняются к необходимости пересмотра классификации моноцитов/макрофагов и указывают на важность учета пространственно-временного паттерна аккумуляции сердечных моноцитов/макрофагов при ИМ. При этом возникает необходимость проведения механистических исследований для валидации экспериментальных данных и демонстрации функциональных значений описанных в эксперименте макрофагальных фенотипов.

Гипотеза исследования

У пациентов с фатальным течением ИМ I типа субпопуляции сердечных макрофагов отличаются друг от друга по пространственно-временной динамике, количественным показателям, функциональной активности и ассоциируются с различными клинико-анамнестическими и патоморфологическими характеристиками больных.

Цель исследования

Изучить макрофагальную инфильтрацию миокарда у пациентов с фатальным течением ИМ I типа и ее взаимосвязь с клинико-анамнестическими и патоморфологическими характеристиками больных на ранних и поздних сроках заболевания.

Задачи исследования

1. Оценить динамику макрофагальной инфильтрации миокарда у больных фатальным ИМ I типа с использованием маркеров CD68, CD163, CD206, стабилин-1 и α -SMA.
2. Сравнить интенсивность макрофагальной инфильтрации с использованием маркеров CD68, CD163, CD206, стабилин-1 у больных фатальным ИМ I типа и у больных из группы контроля.
3. Исследовать интенсивность макрофагальной инфильтрации в зоне инфаркта, периинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта, у больных фатальным ИМ I типа на ранних и поздних сроках заболевания.

4. Изучить фенотипы сердечных макрофагов у больных фатальным ИМ I типа в зоне инфаркта, периинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта, на ранних и поздних сроках заболевания с использованием маркеров CD68, CD163, CD206, стабиллин-1 и α -SMA.

5. Исследовать взаимосвязь субпопуляций сердечных макрофагов с клинико-anamнестическими и патоморфологическими характеристиками больных фатальным ИМ I типа на ранних и поздних сроках заболевания.

Научная новизна

В настоящей работе впервые разработан протокол для изучения фенотипов макрофагов и их функциональной активности у больных ИМ I типа.

Выявлено, что у больных ИМ I типа, сердечные макрофаги, помимо широко изучаемых маркеров – CD68, CD163 и CD206, экспрессируют скавенджер-рецептор стабиллин-1.

Получены новые данные о динамике, интенсивности и локализации макрофагальной инфильтрации миокарда у пациентов с фатальным течением ИМ I типа на ранних и поздних сроках заболевания. У больных с фатальным течением ИМ I типа выявлена пролонгированная CD68⁺, CD163⁺, CD206⁺ и стабиллин-1⁺ макрофагальная инфильтрация миокарда. Показано, что у пациентов с ИМ I типа в ответ на острую ишемию интенсивность макрофагальной инфильтрации изменяется как в зоне инфаркта и периинфарктной зоне, так и в отдаленных от инфаркта участках миокарда.

Для изучения реактивности макрофагальной реакции у больных ИМ I типа, впервые исследована макрофагальная инфильтрация в миокарде пациентов из группы контроля, а именно погибших от травм, несовместимых с жизнью и не имеющих в анамнезе заболеваний сердечно-сосудистой системы. Показано, что сердечные CD68⁺, CD163⁺, CD206⁺ и стабиллин-1⁺ макрофаги присутствуют в группе контроля. Выявлено, что ранняя макрофагальная реакция в ответ на острую ишемию характерна для сердечных CD68⁺ и CD163⁺ макрофагов. Получены данные о том, что стабиллин-1 и CD206 являются маркерами регенераторной фазы ИМ, о чем свидетельствует увеличение количества стабиллин-1⁺ макрофагов сердца относительно группы контроля лишь на 4-е сутки ИМ, а CD206⁺ макрофагов на 10-е сутки ИМ.

Впервые использовано клиническое моделирование для изучения косвенных проявлений пластичности и противофиброзной активности сердечных макрофагов. Косвенным проявлением свойства пластичности фенотипа макрофагов, экспрессирующих стабиллин-1, является присутствие их в группе контроля и отсутствие в воспалительную фазу ИМ. Выявленная субпопуляция стабиллин-1⁺/ α -SMA⁺ клеток свидетельствует о возможности клеточной трансдифференцировки и также является косвенным проявлением свойства пластичности макрофагов. О противофиброзной активности сердечных стабиллин-1⁺ макрофагов может судить наличие ассоциации их отсутствия и присутствия фиброза в интактном миокарде у больных ИМ. Также было показано, что низкое содержание стабиллин-1⁺/ α -SMA⁺ в интактном миокарде у больных ИМ ассоциируется с патоморфологическими признаками ремоделирования сердца. Косвенным проявлением профиброзной активности сердечных CD68⁺ макрофагов является наличие ассоциации их повышенного количества с наличием фиброза в интактном миокарде у больных ИМ.

Продемонстрирована фенотипическая гетерогенность сердечных макрофагов при ИМ на клиническом материале. Показано, что изменения количества и

фенотипического профиля сердечных макрофагов на ранних и поздних сроках ИМ затрагивают зону инфаркта, перинфарктную зону и зону, отдаленную от инфаркта.

Впервые изучена взаимосвязь макрофагальной инфильтрации миокарда у пациентов с фатальным течением ИМ I типа с клинико-анамнестическими характеристиками больных. Выявлено, что клинико-анамнестические характеристики больных фатальным ИМ I типа ассоциируются с различными субпопуляциями макрофагов, экспрессирующих тот или иной маркер – CD68, CD163, CD206, стабилин-1 и α -SMA – или их комбинацию. Взаимосвязь субпопуляций сердечных макрофагов и клинико-анамнестических показателей зависит от сроков заболевания.

На примере ИМ продемонстрировано, что классификация макрофагов на M1 и M2 типы носит упрощенный характер. Ввиду фенотипической гетерогенности макрофагов и ее динамичности, она не позволяет в полной мере охарактеризовать ту или иную субпопуляцию макрофагов в конкретной клинической ситуации и не позволяет проводить клинико-морфологические параллели. Характеристика макрофагов по профилю экспрессии их маркеров является более точным индикатором их функциональной активности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования данные о макрофагальной инфильтрации миокарда пациентов с фатальным течением ИМ I типа носят фундаментальный и прикладной характер. Результаты работы предоставляют новую информацию о процессах, протекающих в миокарде в ответ на острую ишемию, что в перспективе может внести вклад в разработку новых фармакологических подходов к регулированию постинфарктного ремоделирования сердца. Данная информация ранее была недоступна в результате отсутствия возможности исследования образцов миокарда у больных ИМ в клинической практике.

Разработанный в исследовании протокол позволил определить фенотипы сердечных макрофагов, которые могут быть прицельно использованы для дальнейшего изучения, в том числе в качестве мишеней для регуляции воспалительной реакции, протекающей при ИМ и его конкретных осложнениях в эксперименте. Предметом интереса являются фенотипы макрофагов, экспрессирующих скавенджер-рецепторы CD68, CD163, CD206, стабилин-1, а также выявленная субпопуляция миофибробластоподобных клеток с фенотипом стабилин-1⁺/ α -SMA⁺.

В результате исследования разработан способ диагностики постинфарктного воспаления в миокарде, ассоциирующегося с неблагоприятным ремоделированием сердца.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы стали зарубежные экспериментальные и клинические исследования в области изучения патофизиологических основ постинфарктной регенерации и ремоделирования сердца. В соответствии с целью и задачами, поставленными в данной работе, был разработан дизайн исследования, включающий анализ историй болезней и патологоанатомических исследований, гистопатологическое, иммуногистохимическое и иммунофлюоресцентное исследование образцов миокарда больных, умерших в результате ИМ I типа в 2013-2014гг.

Исследование включало данные и образцы миокарда 41 больного ИМ I типа. Смерть больных наступала на 1-е-28-е сутки заболевания. Группу контроля составляли 9 человек, погибших от травм, несовместимых с жизнью и не имеющих

заболеваний сердечно-сосудистой системы. Перед исследованием образцы миокарда хранились в виде парафиновых блоков. Для изучения пространственно-временного паттерна аккумуляции сердечных макрофагов в каждом случае было проведено иммуногистохимическое исследование образцов миокарда из зоны инфаркта, перинфарктной зоны и зоны, отдаленной от инфаркта. Оценка фенотипической гетерогенности и косвенных свойств пластичности макрофагов проводилась при помощи двойного иммунофлюоресцентного исследования зон инфаркта и отдаленных от инфаркта участков миокарда. Подсчет позитивных по изучаемым маркерам макрофагов в миокарде проводился в 20 полях зрения при оптическом увеличении 630. Подсчет клеток проводился двумя независимыми исследователями. Наличие или отсутствие фиброза в интактном миокарде оценивалось при помощи стандартного гистопатологического исследования. За патоморфологический критерий неблагоприятного ремоделирования сердца было принято отношение длинник/поперечник сердца $<1,1$. Полученные данные были обработаны стандартными методами статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с фатальным течением ИМ I типа с 1-х по 28-е сутки заболевания отмечена инфильтрация макрофагами, экспрессирующими следующие маркеры: CD68, CD163, CD206, стабиллин-1.
2. Количество сердечных CD68+, CD163+, CD206+, стабиллин-1+ макрофагов у пациентов с фатальным течением ИМ I типа отличается от таковых значений в контрольной группе больных, погибших от травм, несовместимых с жизнью и не имеющих в анамнезе заболеваний сердечно-сосудистой системы.
3. Инфильтрация макрофагов, экспрессирующих маркеры CD68, CD163, CD206 и стабиллин-1, у больных фатальным ИМ I обнаружена не только в инфарктной зоне, но также и в перинфарктной зоне, и в зоне, отдаленной от инфаркта, что указывает на вовлечение в воспалительную реакцию участков миокарда, удаленных от зоны инфаркта.
4. Макрофаги в миокарде больных ИМ I типа представлены фенотипически гетерогенной популяцией клеток, изменяющих экспрессионный профиль в фазу воспаления с 1-х по 3-и сутки и в фазу регенерации с 4-х по 28-е сутки.
5. Клинико-anamnestический и патоморфологический портрет пациента с ИМ I типа отличается количественными и фенотипическими характеристиками макрофагальной инфильтрации миокарда.

Личный вклад

Личное участие автора заключалось в участии планирования исследования; изучении и анализе литературы по теме диссертации; отборе больных для включения их в исследование; формировании базы данных. Автор лично проводил иммуногистохимическое и иммунофлюоресцентное исследование миокарда больных. Личное участие автора заключалось в написании тезисов, научных статей, в оформлении патента; в выступлениях с устными и стендовыми докладами на всероссийских и международных конгрессах по кардиологии. Весь материал, полученный в ходе выполнения работы, и затем, представленный в диссертации, обработан, проанализирован и описан лично автором.

Внедрение результатов работы в практику

В ходе выполнения работы был разработан и апробирован протокол иммуногистохимического и иммунофлюоресцентного анализа макрофагальной инфильтрации у больных ИМ, который может быть использован в дальнейших

исследованиях для изучения потенциальных маркеров неблагоприятного течения постинфарктной регенерации миокарда и целевых методов ее регуляции. Результаты, полученные в ходе использования данного протокола, обосновывают перспективность неинвазивной визуализации постинфарктной воспаления миокарда при помощи сцинтиграфии миокарда с ^{99m}Tc -аналогом соматостатина (Sazonova S., 2021). Неинвазивная визуализация постинфарктного воспаления в миокарде является потенциальным инструментом для персонализированного отбора пациентов в рандомизированные клинические исследования противовоспалительных стратегий по предотвращению неблагоприятного ремоделирования миокарда, а в случае их успеха – инструментом для персонализированного назначения противовоспалительных агентов и контроля эффективности проводимого ими лечения.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре кардиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также применяются в новых научно-исследовательских протоколах по изучению системного моноцитарно-макрофагального ответа на острую ишемию миокарда у больных ИМ на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов, предоставленных в работе, обоснована соответствием дизайна исследования поставленным в работе целям и задачам, применением современных методов исследования, применением высокотехнологичного оборудования и подтверждена адекватными методами статистической обработки.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на 16 всероссийских и международных конференциях: на XVI ежегодном научно-практическом семинаре молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической кардиологии» (Томск, 2016), на III национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), на Российском национальном конгрессе кардиологов (Санкт-Петербург, 2017; Казань, 2020, он-лайн), на XII Всероссийском форуме «Вопросы неотложной кардиологии» (Москва, 2019), на Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (Томск, 2018; Томск 2021), на международном конгрессе по сердечной недостаточности (Париж, 2017; Вена, 2018; Афины, 2019), на международном конгрессе по неотложной кардиологии (Милан, 2018; Малага, 2019), на международном конгрессе по сердечно-сосудистой биологии (Вена, 2018), на Европейском конгрессе кардиологов (Барселона, 2017; Париж, 2019; Амстердам, 2020, он-лайн). Часть работы была поддержана Фондом содействия инновациям (программа «УМНИК») в рамках выполнения проекта «Разработка метода диагностики неблагоприятного ремоделирования сердца с использованием биомаркеров макрофагов у больных во время и после инфаркта миокарда» (номер договора 11854ГУ/2017).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, из них 8 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Структура диссертации

Работа изложена на 167 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 52 рисунками, содержит 39 таблиц. Список литературы включает 203 источника (6 отечественных и 197 иностранных).

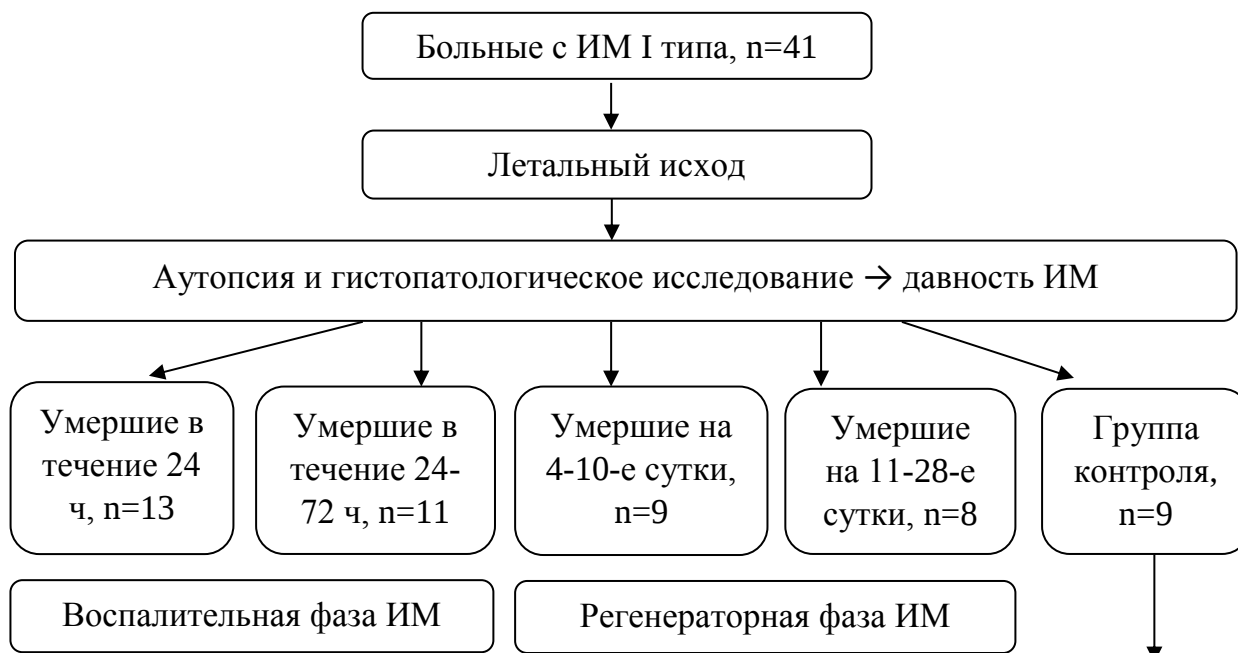
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Протокол исследования был одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИИ кардиологии (г. Томск), протокол №128 от 23 декабря 2014г. Исследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинской декларации. Патологоанатомическое исследование проводилось согласно приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2013 года № 354н «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий». В рамках настоящего исследования процесс подписания информированного согласия являлся неосуществимым, но протокол исследования был одобрен Комитетом по биомедицинской этике. Таким образом, противоречия Хельсинской декларации отсутствуют.

Объектом исследования являлись фрагменты миокарда больных, умерших в результате ИМ I типа в отделении неотложной кардиологии (руководитель отделения – д.м.н. Рябов В.В.) НИИ кардиологии Томского НИМЦ (директор – д.м.н., профессор, академик Российской академии наук Попов С.В.). Критериями исключения являлись ИМ II-V типов, инфекционные осложнения (сепсис, пневмония), онкологические заболевания, клапанные пороки, требующие хирургической коррекции, а также случаи, когда ИМ не являлся причиной смерти пациента.

Для изучения пространственно-временного паттерна аккумуляции сердечных макрофагов и их фенотипов (задачи 1–4) больные были разделены по группам в зависимости от давности ИМ: 1-ая группа – умершие в течение первых суток ИМ; 2-ая – умершие в течение 24-72 часов; 3-я группа – умершие на 4-10-е сутки; и 4-ая группа – на 11-28-е сутки. Группу контроля составляли 9 человек, погибших от травм, несовместимых с жизнью и не имеющих заболеваний сердечно-сосудистой системы. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



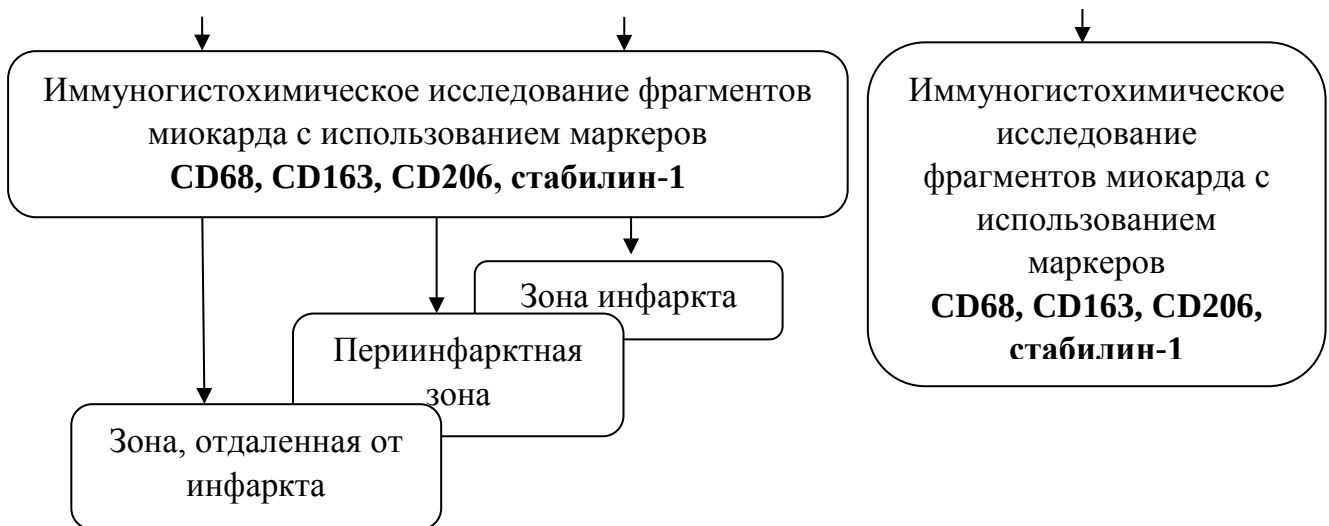


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Для изучения фенотипов (задача 4) макрофагов дополнительно проведено двойное иммунофлюоресцентное окрашивание со следующими парами маркеров: CD163 и CD206, стабилин-1 и α -SMA. Больные были разделены по группам в зависимости от давности ИМ: 1-ая группа – умершие в течение трех суток ИМ; 2-ая – умершие на 4-28-е сутки. Дизайн исследования представлен на рисунке 2.

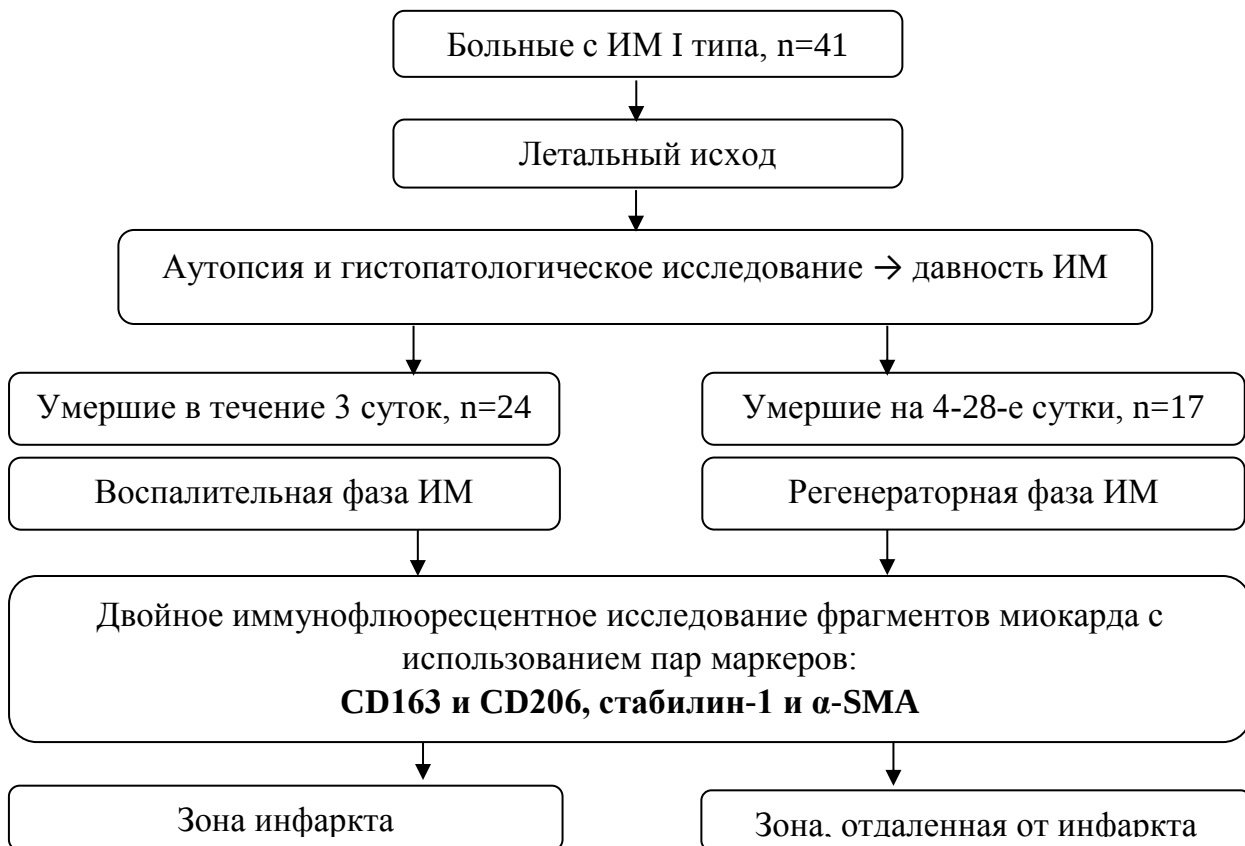


Рисунок 2 – Дизайн исследования: изучение фенотипов макрофагов при помощи двойного иммунофлюоресцентного окрашивания

Для исследования взаимосвязи субпопуляций сердечных макрофагов с клиническими и патоморфологическими характеристиками больных фатальным ИМ I типа на ранних (воспалительная фаза, первые 3-е суток) и поздних (регенераторная фаза, 4-28-е сутки) сроках заболевания были рассмотрены следующие характеристики: 1) фиброз в зоне, отдаленной от инфаркта (данные патогистологического исследования); 2) патоморфологический критерий неблагоприятного ремоделирования сердца: отношение длинник/поперечник сердца <1,1; 3) разрыв миокарда; 4) аневризма ЛЖ.

Основные клиничко-anamнестические характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Клиничко-anamнестические характеристики пациентов, включенных в исследование

Параметры	Все пациенты	Первая группа	Вторая группа	Третья группа	Четвертая группа
Количество пациентов, п	41	13 (32 %)	11 (27 %)	9 (21 %)	8 (20 %)
Возраст, года	74±10	73±10	72±9	74±11	78±11
Мужской пол	17 (41 %)	5 (38 %)	4 (36 %)	5 (55 %)	3 (37 %)
ИМпST	36 (89 %)	12 (92 %)	11 (100 %)	8 (89 %)	5 (62 %) *
Локализация инфаркта					
Передний ИМ	13 (32 %)	5 (39 %)	6 (55 %)	1 (11 %) [†]	1 (12,5 %)
Задний ИМ	10 (24 %)	2 (15 %)	4 (36 %)	3 (33 %)	1 (12,5 %)
Циркулярный ИМ	18 (44 %)	6 (46 %)	1 (9 %) [§]	5 (56 %) [†]	6 (75 %) *
Факторы риска ИБС					
Сахарный диабет	10 (24 %)	3 (23 %)	2 (18 %)	2 (22 %)	3 (38 %)
Гипертоническая болезнь	38 (93 %)	13 (100 %)	10 (91 %)	7 (78 %)	8 (38 %)
Ожирение	12 (29 %)	4 (31 %)	4 (36 %)	3 (33 %)	1 (13 %)
Дислипидемия	10 (24 %)	0	3 (27 %)	2 (22 %)	1 (13 %)
Курение	12 (29 %)	2 (15 %)	4 (36 %)	4 (44 %)	2 (25 %)
Семейный анамнез ССЗ	3 (7 %)	0	1 (9 %)	2 (22 %)	0
Наличие в анамнезе					
Нарушения ритма сердца	6 (15 %)	0	1 (9 %)	1 (11 %)	4 (50 %) [†]
ХСН	21 (51 %)	2 (15 %) [†]	7 (64 %)	6 (67 %)	6 (75 %)
ХОБЛ	15 (36 %)	7 (54 %)	4 (36 %)	1 (11 %) [†]	3 (37 %)
МКБ	5 (12 %)	1 (8 %)	0	4 (44 %) [†]	0
ХБП	17 (41 %)	1 (8 %)	6 (56 %) [†]	8 (89 %) [†]	2 (25 %)
САД при поступлении, мм рт. ст.	101 (79; 127)	90 (60; 113)	110 (89; 140)	101 (89; 101)	122 (101; 134)

Поражение коронарного русла, стенозы более 70%					
Ствол ЛКА	5 (12 %)	2 (15 %)	1 (9 %)	0	2 (25 %)
ПНА	16 (39 %)	3 (23 %)	4 (36 %)	4 (44 %)	5 (62,5 %)
ОА	14 (34 %)	2 (15 %)	3 (27 %)	4 (44 %)	5 (62,5 %) [#]
ПКА	12 (29 %)	3 (23 %)	1 (8 %)	3 (33 %)	5 (62,5 %) [*]
Шкала GRACE (при поступлении), %	27 (9; 40)	40 (9; 60)	14 (6; 40)	30 (27; 40)	10 (7; 27)
Реперфузионная терапия					
Тромболизис	13 (31 %)	6 (46 %)	7 (64 %)	0 (0 %) ^{†‡}	0 (0 %) ^{*#}
Чрескожное коронарное вмешательство	19 (46 %)	5 (38 %)	4 (36 %)	5 (56 %)	5 (62,5 %)
Медикмент. терапия					
Двойная дезагрегантная терапия	37 (90 %)	9 (69 %) [‡]	11 (100 %)	9 (100 %)	8 (100 %)
Ингибиторы АПФ	7 (17 %)	0 (0 %)	2 (18 %)	2 (22 %)	3 (37,5 %) [#]
Бета-адреноблокаторы	15 (36 %)	1 (8 %) [‡]	3 (27 %)	5 (56 %)	6 (75 %)
Осложнения ИМ					
ОСН при поступлении	29 (71 %)	12 (92 %)	6 (55 %) [§]	7 (78 %)	4 (50 %) [#]
Аневризма ЛЖ	11 (27 %)	1 (8 %)	4 (36 %)	3 (33 %)	3 (37,5 %)
Рецидив ИМ	11 (27 %)	1 (8 %)	2 (18 %)	3 (33 %)	5 (62,5 %) [‡]
Постинфарктная стенокардия	11 (27 %)	1 (8 %)	2 (18 %)	2 (22 %)	6 (75 %) [‡]
Причина смерти					
Кардиогенный шок	32 (78 %)	10 (77 %)	6 (55 %)	9 (100 %) [†]	7 (88 %)
Разрыв миокарда	6 (15 %)	2 (15 %)	4 (36 %)	0 [†]	0 [*]
Аритмогенный шок (ФЖ)	3 (7 %)	1 (4 %)	1 (9 %)	0	1(12,5 %)

Данные представлены в количественном и процентном выражении или в виде $M \pm SD$ или в виде $Me (Q1; Q3)$. * $p < 0,05$ - различие между второй и четвертой группой; [†] $p < 0,05$ - различие между второй и третьей группой; [§] $p < 0,05$ - различие между первой и второй группой; [‡] $p < 0,05$ - отличие от других групп; [‡] $p < 0,05$ - различие между первой и третьей группой; [#] $p < 0,05$ - различие между первой и четвертой группой. АПФ - ангиотензин-превращающий фермент, ИБС - ишемическая болезнь сердца, ИМ - инфаркт миокарда, ИМпST - ИМ с подъемом сегмента ST, ЛЖ - левый желудочек, ЛКА - левая коронарная артерия, ОА -

огибающая артерия, ОСН - острая сердечная недостаточность, ПНА - передняя нисходящая артерия, ПКА - правая коронарная артерия, САД - систолическое артериальное давление, ССЗ - сердечнососудистые заболевания, ФЖ - фибрилляция желудочков, ХБП – хроническая болезнь почек, ХОБЛ - хроническая обструктивная болезнь легких, ХСН - хроническая сердечная недостаточность.

Гистопатологическое исследование

Аутопсия проводилась на базе патологоанатомического отделения в течение 24 часов от момента смерти пациента. После стандартной гистологической проводки, образцы миокарда заливали в парафин при помощи гистопроцессора Thermo Scientific Excelsior ES (США). Таким образом, образцы миокарда хранились в виде парафиновых блоков и представляли собой биобанк для последующего изучения и подготовки микротомных срезов. Из каждого парафинового блока было получено по 20 срезов миокарда. Срезы фиксировались на предметных стеклах с полилизинным покрытием.

Для определения сроков и локализации ИМ проводилось гистопатологическое исследование микротомных срезов миокарда с использованием микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия) в светлом поле и в поляризованном свете. Перед микроскопией препараты были окрашены гематоксилином и эозином по стандартной методике. Таким образом, на основании гистопатологического исследования были отобраны фрагменты миокарда из зоны инфаркта, перинфарктной зоны и зоны, отдаленной от инфаркта.

Иммуногистохимическое исследование

Исследование проводилось с применением антител к маркерам макрофагов. В качестве общего маркера макрофагов был использован CD68, в качестве классических маркеров M2 макрофагов использовались CD163 и CD206, а в качестве дополнительного маркера M2 макрофагов – стабилин-1. В ходе исследования использовались мышинные моноклональные антитела к CD68 (Cell Marque, разведение 1:500), антитела к CD163 (Cell Marque, разведение 1:50), мышинные моноклональные антитела к CD206 (Santa Cruz, разведение 1:100), синтезированные в лаборатории Врожденного Иммунитета и Иммунологической Толерантности (Университет Гейдельберга) антитела к стабину-1 RS1 (разведение 1:1000).

Следуя протоколу иммуногистохимического окрашивания, на первом этапе проводилась депарафинизация срезов и отмывка в спиртах. Следующим этапом являлась демаскировка антигенов в цитратном буфере pH 6.0 (Spring Bioscience) на водяной бане при температуре 96°C. Далее на 10 минут наносился пероксидазный блок для блокирования эндогенной пероксидазы. Затем производилось блокирование неспецифического связывания сывороткой (3% бычий сывороточный альбумин в растворе натрий-фосфатного буфера – PBS, phosphate buffered saline) путем ее нанесения на срезы и инкубации срезов во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 мин. После этого первичные антитела в рабочем разведении наносились на срезы и инкубировались во влажной камере в течение 60 минут с последующей 3-кратной отмывкой в PBS. Вторичные HRP-меченные антитела наносились на срез на 45 минут (или использовалась система визуализации для антител мышь-кролик) с последующей 4-кратной отмывкой в PBS. Далее добавляли DAB (3,3-диаминобензидин) - хромаген субстрат и производили окрашивание ядер гематоксилином. Затем проводилась дегидратация срезов с последующим их покрытием предметным стеклом.

Материал исследовался при помощи микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия). Количество CD68+, CD163+, CD206+ и стабилин-1+ макрофагов было подсчитано в зоне инфаркта, перинфарктной зоне и зоне, отдаленной от ИМ. Для каждого маркера производили подсчет позитивных по изучаемым маркерам макрофагов в миокарде в 20 полях зрения при оптическом увеличении 630. Подсчет клеток проводился двумя независимыми исследователями.

Иммунофлюоресцентное исследование

Исследование проводилось с применением антител к маркерам макрофагов. В качестве классических маркеров M2 макрофагов использовались CD163 и CD206, а в качестве дополнительного маркера M2 макрофагов – стабилин-1. В качестве маркера миофибробластов использовался α -SMA (α -гладкомышечный актин). В ходе исследования использовались первичные антитела к CD163 (Cell Marque, разведение 1:1000), к CD206 (Santa Cruz, разведение 1:1000), синтезированные в лаборатории Врожденного Иммунитета и Иммунологической Толерантности (Университет Гейдельберга) антитела к стабину-1 RS1 (разведение 1:1000), к α -SMA (разведение 1:300).

Следуя протоколу иммунофлюоресцентного окрашивания, на первом этапе проводилась депарафинизация срезов и отмывка в спиртах. Следующим этапом являлась демаскировка антигенов в цитратном буфере буфере Tris-EDTA pH 9,0 (Spring Bioscience) на водяной бане при температуре 96°C. Далее на 10 минут наносился пероксидазный блок для блокирования эндогенной пероксидазы. Затем производилось блокирование неспецифического связывания сывороткой (3% бычий сывороточный альбумин в растворе натрий-фосфатного буфера – PBS, phosphate buffered saline) путем ее нанесения на срезы и инкубации срезов во влажной камере при комнатной температуре в течение 50 мин. После этого первичные антитела в рабочем разведении наносились на срезы и инкубировались во влажной камере в течение 25 минут с последующей 3-кратной отмывкой в PBS. Следующий этап заключался в нанесении на срезы вторичных антител в рабочем разведении: Alexa Fluor 488 (1:300), Cyanine-3 (Cy3) (1:300) и ядерный краситель 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:1000). Приготовление раствора вторичных антител в проводилось в светонепроницаемой пробирке типа Эппендорф. Срезы инкубировались в течение 60 минут при комнатной температуре в темной влажной камере с последующей 4-кратной отмывкой в PBS. Далее на срезы наносили среду для заключения (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako Cytomation) и фиксировали покровное стекло. Препараты хранились при температуре 4°C в светонепроницаемом планшете с крышкой.

Материал исследовался при помощи микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия). Количество макрофагов было подсчитано в зоне инфаркта и зоне, отдаленной от ИМ. Для каждого маркера производили подсчет позитивных по изучаемым маркерам макрофагов в миокарде в 20 полях зрения при оптическом увеличении 630. Подсчет клеток проводился двумя независимыми исследователями.

Статистическая обработка материала

Обработка данных выполнялась с использованием пакета программ «Statistica 10.0» и «MedCalc 11.5.0.0». Характер распределения количественных признаков оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка и визуального представления в виде гистограмм. Количество макрофагов представлено в виде медианы и межквартильного размах. Статистическая значимость различий между двумя независимыми количественными переменными оценивались с помощью U критерия

Mann-Whitney. Для сравнения двух зависимых переменных критерий Вилкоксона и критерий знаков. Для определения значимости различий при множественном сравнении (3 и более групп) применялся критерий Kruskal-Wallis и поправка Бонферрони. Статистическую значимость различий качественных признаков оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. Для выявления предикторов развития неблагоприятного ремоделирования сердца использовали ROC анализ с построением характеристических кривых и расчетом площади под кривой. Значимым считали значение площади под ROC кривой (AUC), превышающее 0,70. Корреляционный анализ выполнялся с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Коэффициент корреляции (R) менее 0,3 рассматривался как показатель наличия слабой корреляционной связи, от 0,3 до 0,7 – как показатель наличия умеренной корреляционной связи, более 0,7 – как показатель наличия сильной корреляционной связи. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Динамика макрофагальной CD68+, CD163+, CD206+ и стабилин-1+ инфильтрации миокарда у больных фатальным ИМ I типа.

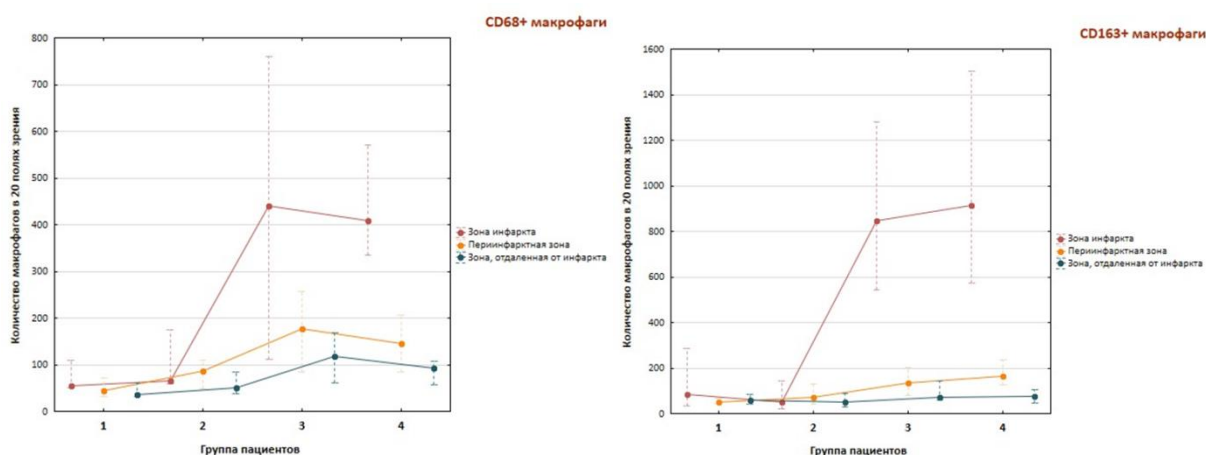


Рисунок 3 – Динамика макрофагальной CD68+ и CD163+ инфильтрации миокарда у больных фатальным ИМ I типа в зоне инфаркта, периинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта

В зоне инфаркта количество CD68+ и CD163+ макрофагов было выше, чем в группе контроля, уже в воспалительную фазу ИМ ($p_{1-контроль} < 0,001$) (рисунок 3). Их количество увеличивалось по мере суток заболевания и не уменьшалось к 28-у дню ($p_{4-контроль} < 0,001$). Данные корреляционного анализа подтверждают эту динамику (рисунок 4).

В зоне инфаркта содержание стабилин-1+ и CD206+ макрофагов увеличивалось относительно группы контроля только в регенераторную фазу ИМ, начиная с 4-х и 11-х суток заболевания, соответственно (рисунок 5). Их количество увеличивалось по мере суток заболевания и не уменьшалось к 28-у дню ($p_{4-контроль} < 0,001$). Данные корреляционного анализа подтверждают эту динамику (рисунок 6).

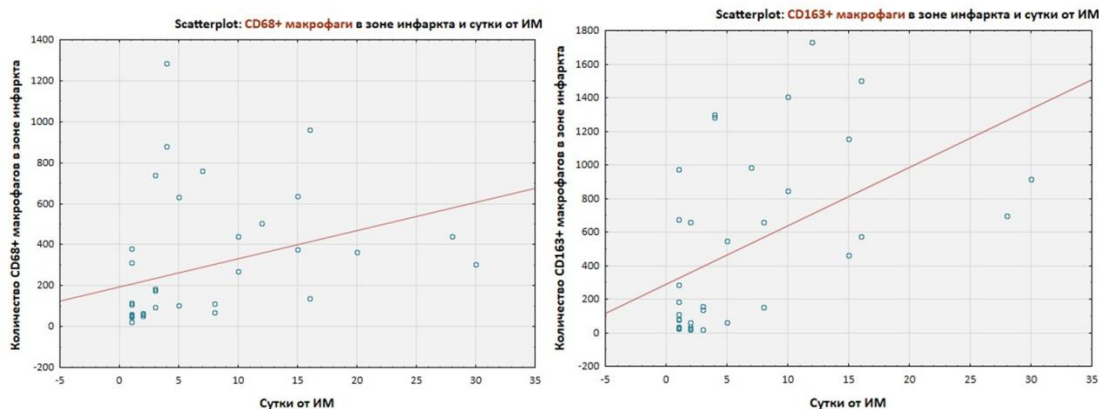


Рисунок 4 – CD68+ макрофаги/сутки от ИМ в зоне инфаркта ($R=0,67$, $p < 0,001$) и CD163+ макрофаги/сутки от ИМ в зоне инфаркта ($R=0,58$, $p < 0,001$)

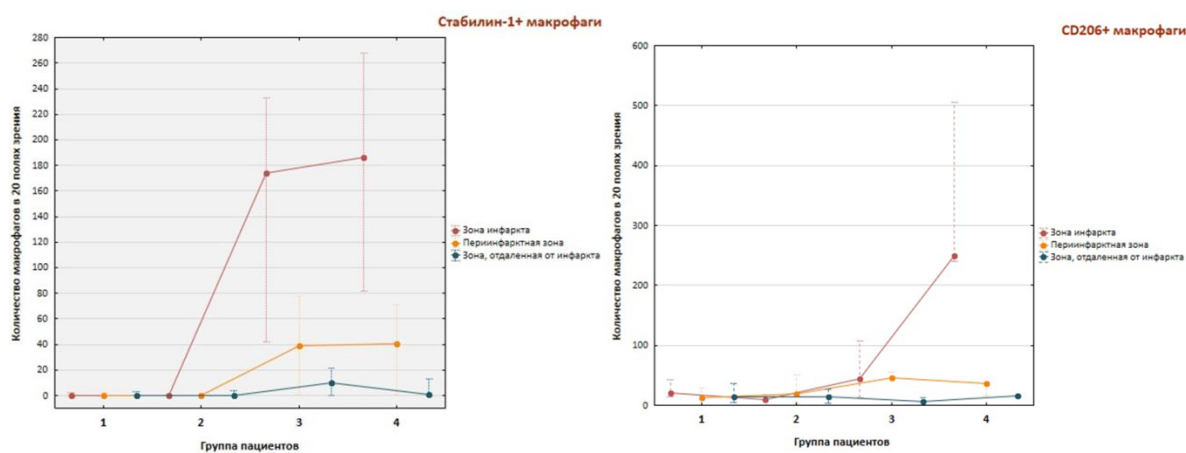


Рисунок 5 – Динамика макрофагальной стабиллин-1+ и CD206+ инфильтрации миокарда у больных фатальным ИМ I типа в зоне инфаркта, перинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта

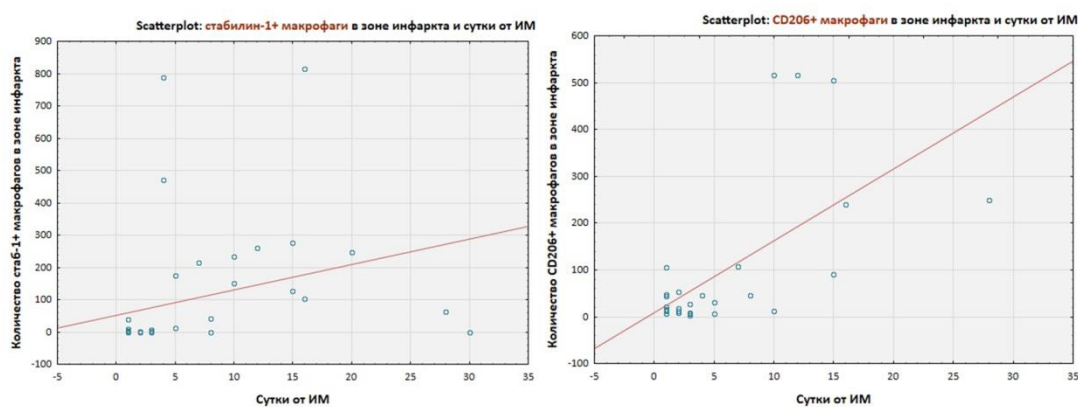


Рисунок 6 – Стабилин-1+ макрофаги/сутки от ИМ ($R=0,6$, $p < 0,001$) в зоне инфаркта и CD206+ макрофаги/сутки от ИМ в зоне инфаркта ($R=0,43$, $p=0,02$)

Таким образом, у больных фатальным ИМ I типа количество CD68+, стабиллин-1+, CD163+ и CD206+ макрофагов в зоне инфаркта увеличивается по мере суток, прошедших от ИМ, и не уменьшается к 28-у дню заболевания. При этом содержание CD68+ и CD163+ макрофагов в зоне инфаркта увеличивается уже в воспалительную фазу ИМ, а содержание стабиллин-1+ и CD206+ макрофагов в зоне инфаркта увеличивается только в регенераторную фазу ИМ.

2. Интенсивность инфильтрации макрофагов, экспрессирующих маркеры CD68, CD163, CD206 и стабилин-1, у больных фатальным ИМ I типа и у больных из группы контроля.

У больных фатальным ИМ с 1-х по 28-е сутки заболевания содержание сердечных CD68+ и CD163+ макрофагов превышает таковое у больных из группы контроля *во всех исследуемых зонах* ($p < 0,001$). С 1-х по 10-е сутки заболевания содержание сердечных CD206+ макрофагов у больных фатальным ИМ не отличается от такового у больных из группы контроля, но увеличивается в *зоне инфаркта* на 11-е сутки заболевания ($p_{4-контроль}=0,003$). С 1-х по 3-и сутки заболевания у больных фатальным ИМ определяется более низкое содержание сердечных стабилин-1+ макрофагов (таблица 2) относительно такового у больных из группы контроля, но оно увеличивается в *зоне инфаркта*, начиная с 4-х суток заболевания ($p_{3-контроль}=0,02$, $p_{4-контроль}=0,008$).

Таблица 2 – Иммуногистохимический анализ стабилин-1+ сердечных макрофагов у пациентов с ИМ

Показатель	Воспалительная фаза		Регенераторная фаза		Группа 5 (контроль), n=9	p
	Группа 1 (умершие в течение 24 часов), n=13	Группа 2 (умершие в течение 24–72 часов), n=11	Группа 3 (умершие с 4-го по 10-й день), n=9	Группа 4 (умершие на 11–28-е сутки), n=8		
Стабилин-1+ макрофаги в зоне инфаркта	0,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)	174,0 (42,0; 233,0)	186,5 (82,0; 267,5)	18,0 (8,0; 30,0)	$p_{1-3}=0,001$ $p_{2-3}=0,001$ $p_{1-5}=0,01$ $p_{2-5}=0,002$ $p_{3-5}=0,02$ $p_{4-5}=0,008$
Стабилин-1+ макрофаги в перинфарктной зоне	0,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)	39,0 (1,0; 78,0)	40,5 (1,0; 71,0)	18,0 (8,0; 30,0)	$p_{1-3}=0,02$ $p_{2-3}=0,02$ $p_{1-5}=0,003$ $p_{2-5}=0,001$
Стабилин-1+ макрофаги в отдаленной от инфаркта зоне	0,0 (0,0; 3,0)	0,0 (0,0; 4,0)	10,0 (0,0; 21,0)	0,5 (0,0; 13,0)	18,0 (8,0; 30,0)	$p_{2-3}=0,03$ $p_{1-5}=0,005$ $p_{2-5}=0,001$
Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха Количество клеток в 20 полях зрения						

Таким образом, количество сердечных CD68+, CD163+, CD206+, стабилин-1+ у пациентов с фатальным течением ИМ I типа макрофагов отличается от таковых значений в контрольной группе больных и зависит от сроков заболевания.

3. Интенсивность макрофагальной инфильтрации в зоне инфаркта, перинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта, у больных фатальным ИМ I типа на ранних и поздних сроках заболевания.

У больных фатальным ИМ I типа в зоне инфаркта (рисунок 7) наиболее высокое содержание сердечных CD68+ макрофагов наблюдается в первые сутки ИМ ($p_{\text{зи-пз}}=0,002$) и на 4-е-28-е сутки заболевания ($p_{\text{зи-пз}}=0,008-0,01$), CD206+ макрофагов на 11-е-28-е сутки ($p_{\text{зи-пз}}=0,04$), стаилин-1+ и CD163+ макрофагов на 4-28-е сутки инфаркта (стаилин-1: $p_{\text{зи-пз}}=0,011-0,028$; CD163: $p_{\text{зи-пз}}=0,008-0,02$).

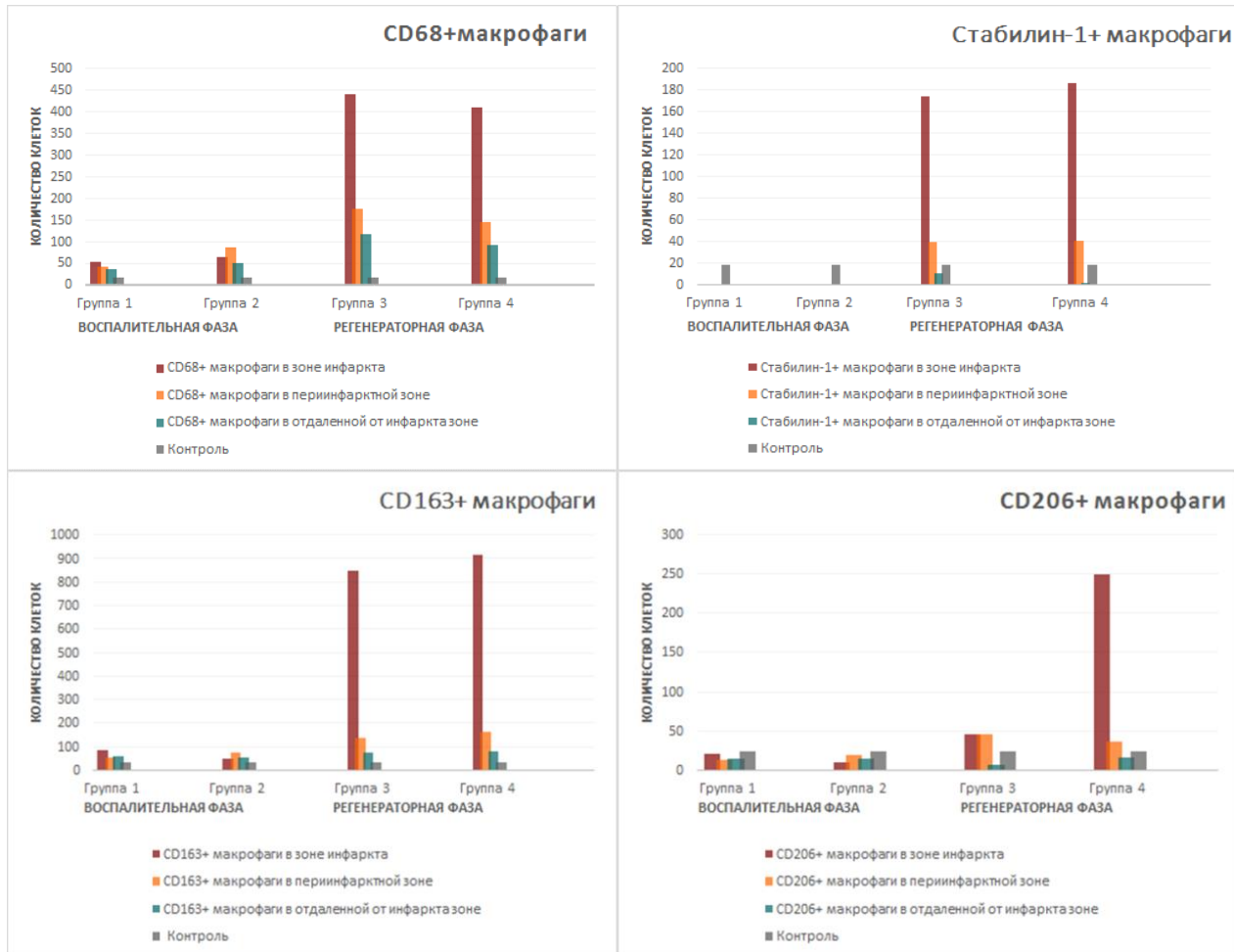


Рисунок 7 – Макрофагальная инфильтрация в зоне инфаркта, перинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта, у больных фатальным ИМ I

С 1-х по 28-е сутки заболевания содержание сердечных CD68+ макрофагов в зоне, отдаленной от инфаркта, превышает таковое у группы контроля (таблица 3). С 4-х по 28-е сутки заболевания содержание сердечных CD163+ макрофагов в зоне, отдаленной от инфаркта, превышает таковое у группы контроля (таблица 3). С 1-х по 3-и и с 11-х по 28-е сутки ИМ определяется более низкое содержание сердечных стаилин-1+ макрофагов в зоне, отдаленной от инфаркта, относительно такового у группы контроля (таблица 4).

У больных фатальным ИМ I типа наиболее высокое содержание CD68+, CD163+, CD206+, стаилин-1+ макрофагов определяется преимущественно в зоне инфаркта. В течение ИМ количество CD68+, CD163+ и стаилин-1+ макрофагов изменяется и в интактном миокарде, что указывает на вовлечение в воспалительную реакцию участков миокарда, удаленных от зоны инфаркта.

Таблица 3 – CD68+ и CD163+ макрофаги в отдаленной от инфаркта зоне

	Группа	CD68+ макрофаги в отдаленной от инфаркта зоне	Группа контрол я	р	CD163+ макрофаги в отдаленной от инфаркта зоне	Группа контрол я	р
Воспалительная фаза	1 n=13	37,0 (31,0; 62,0)	17,0 (14,0; 24,0)	0,04	60,0 (42,5; 85,5)	32,0 (21,0; 36,0)	-
	2 n=11	51,0 (39,0; 85,0)	17,0 (14,0; 24,0)	0,008	52,0 (31,0; 87,0)	32,0 (21,0; 36,0)	-
Регенераторная фаза	3 n=9	118,0 (61,0; 169,0)	17,0 (14,0; 24,0)	0,01	73,0 (59,0; 142,0)	32,0 (21,0; 36,0)	0,03
	4 n=8	92,5 (57,0; 107,0)	17,0 (14,0; 24,0)	0,03	77,5 (46,0; 107,0)	32,0 (21,0; 36,0)	0,04
Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха Количество клеток в 20 полях зрения							

Таблица 4 – Стабилин-1+ макрофаги в отдаленной от инфаркта зоне

	Группа	Стабилин-1+ макрофаги в отдаленной от инфаркта зоне	Группа контроля	р
Воспалительная фаза	Группа 1 n=13	0,0 (0,0; 3,0)	18,0 (8,0; 30,0)	0,01
	Группа 2 n=11	0,0 (0,0; 4,0)	18,0 (8,0; 30,0)	0,01
Регенераторная фаза	Группа 3 n=9	10,0 (0,0; 21,0)	18,0 (8,0; 30,0)	-
	Группа 4 n=8	0,5 (0,0; 13,0)	18,0 (8,0; 30,0)	0,03
Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха Количество клеток в 20 полях зрения				

4. Фенотипы сердечных макрофагов у больных фатальным ИМ I типа в зоне инфаркта, перинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта, на ранних и поздних сроках заболевания с использованием маркеров.

Анализ фенотипической гетерогенности макрофагальной инфильтрации показал (рисунок 8), что с 1-го по 28-й день ИМ отмечались различия в количестве CD68+, стабилин-1+, CD163+ и CD206+ макрофагов в зоне инфаркта (от $p < 0,001$ до $p = 0,004$), в перинфарктной зоне (от $p < 0,001$ до $p = 0,02$) (рисунок 9) и зоне, отдаленной от инфаркта ($p < 0,001$) (рисунок 10).

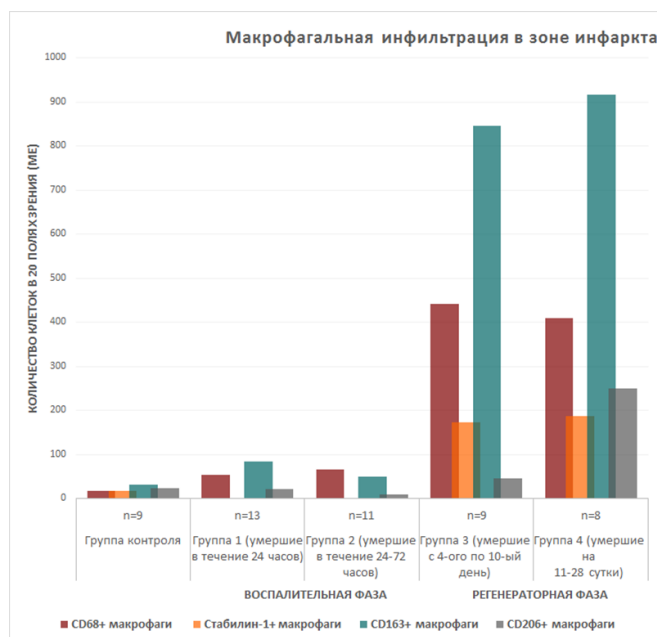


Рисунок 8 – Макрофагальная инфильтрация в зоне инфаркта

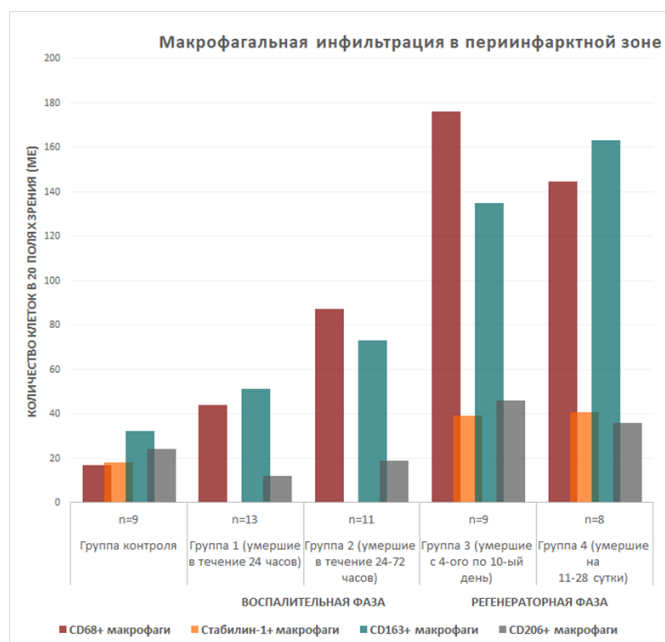


Рисунок 9 – Макрофагальная инфильтрация в перинфарктной зоне

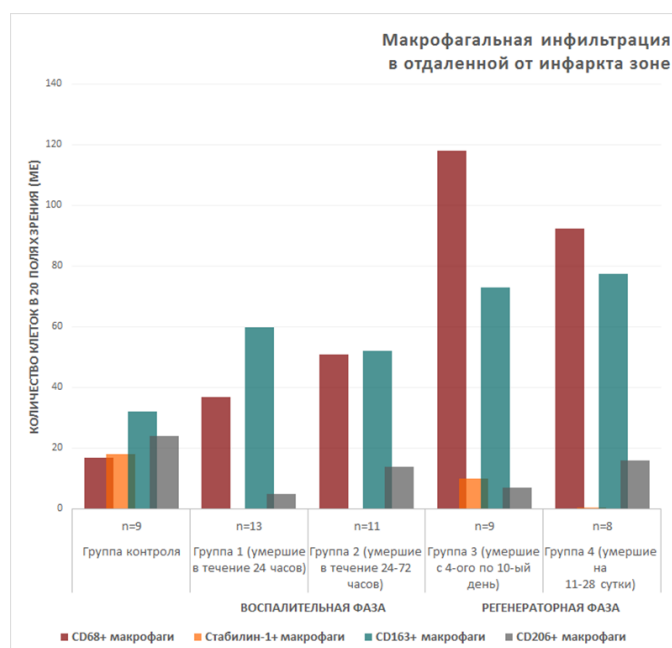


Рисунок 10 – Макрофагальная инфильтрация в зоне, отдаленной от инфаркта

По результатам иммунофлюоресцентного анализа с 1-х по 28-е сутки заболевания количество сердечных $CD163^+/CD206^-$, $CD206^+/CD163^-$ и $CD163^+/CD206^+$ макрофагов в зоне инфаркта статистически значимо не различается, но в зоне, отдаленной от инфаркта, с 1-х по 3-и сутки заболевания преобладающей субпопуляцией являются $CD206^+/CD163^-$ макрофаги.

В миокарде больных фатальным ИМ I типа обнаружены клетки с фенотипом стабилин-1 $^+$ /α-SMA $^+$, экспрессирующие одновременно макрофагальный маркер и маркер миофибробластов.

Таким образом, у больных фатальным ИМ сердечные макрофаги представляют собой фенотипически гетерогенную популяцию клеток. Выявленный фенотип клеток стабилин-1 $^+$ /α-SMA $^+$ является косвенным проявлением пластичности макрофагов, возможности их трансдифференцировки в миофибробласты.

5. Взаимосвязь субпопуляций сердечных макрофагов с клинико-анамнестическими и патоморфологическими характеристиками больных фатальным ИМ I типа на ранних и поздних сроках заболевания.

5.1 У больных фатальным ИМ I типа, умерших с 1-х по 3-и сутки заболевания, отсутствие стабилин-1 $^+$ макрофагов в интактном миокарде ассоциируется с наличием фиброза в соответствующей области (таблица 5). У больных ИМ, умерших на 4-28-е сутки, наличие фиброза в интактном миокарде ассоциируется с большим содержанием CD68 $^+$ в соответствующей области (таблица 5).

Таблица 5 – CD68⁺ и стабилин-1⁺ макрофаги в интактном миокарде у больных ИМ с наличием интерстициального фиброза в интактном миокарде и при его отсутствии

Показатель	Больные ИМ с наличием интерстициального фиброза в интактном миокарде	Больные ИМ в отсутствии интерстициального фиброза в интактном миокарде	p
Воспалительная фаза (первые 72 часа ИМ)			
	n=17	n=7	
Стабилин-1 ⁺ макрофаги в интактном миокарде	0,0 (0,0; 0,0)	2,0 (0,0; 7,0)	0,04
Регенераторная фаза (4-28-е сутки)			
	n=12	n=5	
CD68 ⁺ макрофаги в интактном миокарде	145,5 (101,0; 201,0)	90,0 (41,0; 95,0)	0,03
Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха			

5.2 Принимая во внимание дизайн исследования и ограниченные данные эхокардиографии, дополнительно были проанализированы размеры сердца больных. За определение неблагоприятного ремоделирования сердца было взято отношение размеров сердца «длинник/поперечник» равное 0,8–1,0. У больных ИМ с наличием патоморфологического признака ремоделирования ЛЖ (длинник/поперечник <1,1) было выявлено меньшее содержание стабилин-1⁺/α-SMA⁺ макрофагов в интактном миокарде (таблица 6).

Таблица 6 – Стабилин-1⁺/α-SMA⁺ макрофаги в интактном миокарде у больных ИМ с наличием патоморфологического признака ремоделирования ЛЖ и при его отсутствии

Показатель	Больные ИМ с наличием патоморфологического признака ремоделирования ЛЖ (длинник/поперечник <1,1), n=8	Больные ИМ в отсутствии патоморфологического признака ремоделирования ЛЖ (длинник/поперечник ≥1,1), n=11	p
Стабилин-1 ⁺ /α-SMA ⁺ макрофаги в интактном миокарде	18,0 (10,0; 18,0)	50,0 (26,0; 58,0)	0,02
Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха			

По результатам ROC-анализа получено, что при количестве стабилин-1-позитивных/α-SMA-негативных макрофагов 0–18/мм², у больных диагностируется неблагоприятное ремоделирование сердца, ассоциирующееся с низкоинтенсивным постинфарктным воспалением в миокарде (рисунок 11). Чувствительность способа составила 100%, а специфичность – 88,9%. Площадь под ROC-кривой составила 0,96, а значение p-уровня значимости – менее 0,0001, что свидетельствует о высоком

качестве классификатора. Таким образом, низкое содержание стабилин-1⁺/α-SMA⁺ в интактном миокарде у больных ИМ ассоциируется с патоморфологическими признаками ремоделирования сердца.

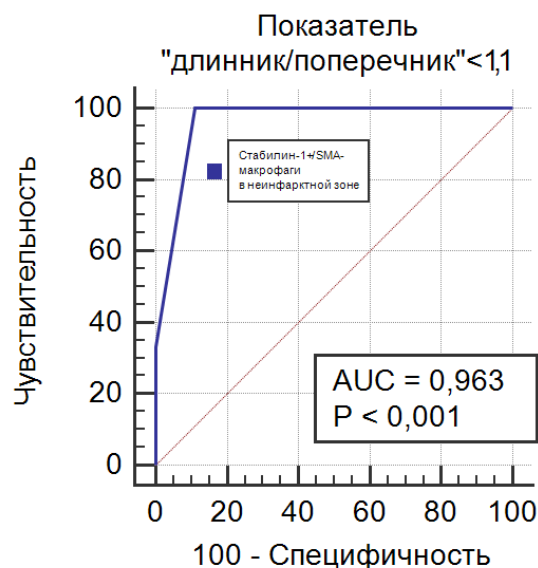


Рис. 11 – Чувствительность и специфичность показателя длинник/поперечник сердца <1,1 в стратификации риска развития неблагоприятного ремоделирования сердца

5.3 Из 24 пациентов с ИМ, умерших на ранних сроках заболевания (в первые 72 часа), у 6 (25%) больных причиной смерти явился разрыв свободной стенки ЛЖ. Пациенты с разрывом миокарда и при его отсутствии были сопоставимы по возрасту, наличию факторов риска, наличию фоновых заболеваний и риску госпитальной летальности, согласно шкале GRACE.

У больных ИМ, течение которого осложнялось разрывом миокарда, наблюдалось более высокое содержание CD68⁺ макрофагов в зоне инфаркта и периинфарктной зоне, а также более высокое содержание CD163⁺ макрофагов в периинфарктной области (таблица 7). Количество моноцитов периферической крови не отличалось в группе пациентов с разрывом миокарда и при его отсутствии. Также у пациентов с разрывом миокарда не было выявлено взаимосвязи между содержанием сердечных макрофагов и моноцитов периферической крови.

Таблица 7 – CD68⁺ и CD163⁺ макрофаги в зоне инфаркта и периинфарктной зоне у больных ИМ с разрывом миокарда и при его отсутствии

Показатель	Больные ИМ с разрывом миокарда, n=6	Больные ИМ без разрыва миокарда, n=18	p
CD68 ⁺ макрофаги в зоне инфаркта	179,0 (109,0; 380,0)	54,0 (50,0; 65,0)	0,001
CD68 ⁺ макрофаги в периинфарктной зоне	83,0 (71,0; 98,0)	46,5 (36,0; 83,0)	0,03
CD163 ⁺ макрофаги в периинфарктной зоне	135,0 (82,0; 182,0)	51,0 (38,0; 72,0)	0,01
Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха			

5.4 Из 41 пациента с ИМ, умерших на ранних (первые 72 часа) и на поздних сроках (4–28-е сутки) заболевания, у 12 (29%) больных имела место аневризма левого ЛЖ. Пациенты с аневризмой ЛЖ и при ее отсутствии были сопоставимы по возрасту, наличию факторов риска, наличию фоновых заболеваний и риску госпитальной летальности, согласно шкале GRACE.

У больных ИМ, течение которого осложнялось образованием аневризмы ЛЖ, наблюдалось более высокое содержание CD68+ макрофагов в зоне инфаркта, CD163+ макрофагов в перинфарктной области и стабилин-1⁺/α-SMA⁺ макрофагов в зоне инфаркта (таблица 8). Количество моноцитов периферической крови не отличалось в группе пациентов с аневризмой ЛЖ и при ее отсутствии. Также у пациентов с аневризмой ЛЖ не было выявлено взаимосвязи между содержанием сердечных макрофагов и моноцитов периферической крови.

Таким образом, клинико-anamнестический и патоморфологический портрет пациента с ИМ I типа отличается количественными и фенотипическими характеристиками макрофагальной инфильтрации миокарда.

Таблица 8 – CD68+, CD163+ и стабилин-1⁺/α-SMA⁺ макрофаги у больных ИМ с аневризмой ЛЖ и при ее отсутствии

Показатель	Больные ИМ с аневризмой ЛЖ, n=12	Больные ИМ без аневризмы ЛЖ, n=29	p
CD68+ макрофаги в зоне инфаркта	372,5 (81,5; 808,0)	106,5 (53,0; 308,5)	0,02
CD163+ макрофаги в перинфарктной зоне	182,0 (82,0; 221,0)	73,0 (48,0; 132,5)	0,04
Стабилин-1 ⁺ /α-SMA ⁺ макрофаги в зоне инфаркта	12,0 (6,0; 22,0)	2,0 (0,0; 6,0)	0,04
Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха			

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе были получены результаты, которые свидетельствуют о наличии различных субпопуляций сердечных макрофагов у больных инфарктом миокарда I типа, о разном пространственно-временном паттерне аккумуляции сердечных макрофагов, о наличии ассоциаций макрофагальной инфильтрации в миокарде с клинико-anamнестическим и патоморфологическим портретом пациента с инфарктом. Так, у больных ИМ, течение, которого осложнялось разрывом миокарда в ранние сроки заболевания, наблюдалось более высокое содержание CD68+ макрофагов в зоне инфаркта и перинфарктной зоне, а также более высокое содержание CD163+ макрофагов в перинфарктной области. У больных ИМ, течение, которого осложнялось образованием аневризмы ЛЖ, наблюдалось более высокое содержание CD68+ макрофагов в зоне инфаркта, CD163+ макрофагов в перинфарктной области и стабилин-1⁺/α-SMA⁺ макрофагов в зоне инфаркта.

В ходе выполнения работы был разработан и апробирован протокол иммуногистохимического и иммунофлюоресцентного анализа макрофагальной инфильтрации у больных инфарктом миокарда. У больных с фатальным течением ИМ

I типа была выявлена пролонгированная CD68+, CD163+, CD206+ и стабилин-1+ макрофагальная инфильтрация миокарда. Показано, что у пациентов с ИМ I типа в ответ на острую ишемию интенсивность макрофагальной инфильтрации изменяется как в зоне инфаркта и перинфарктной зоне, так и в отдаленных от инфаркта участках миокарда. Результаты, полученные в ходе использования данного протокола, обосновывают перспективность неинвазивной визуализации постинфарктной воспаления миокарда при помощи сцинтиграфии миокарда с ^{99m}Tc -аналогом соматостатина. Неинвазивная визуализация постинфарктного воспаления в миокарде является потенциальным инструментом для персонализированного отбора пациентов в рандомизированные клинические исследования противовоспалительных стратегий по предотвращению неблагоприятного ремоделирования миокарда, а в случае их успеха – инструментом для персонализированного назначения противовоспалительных агентов и контроля эффективности проводимого ими лечения.

ВЫВОДЫ

1. У больных фатальным ИМ содержание сердечных CD68+ и CD163+ макрофагов в зоне инфаркта увеличивается, начиная с 1-х суток заболевания, и не снижается к 28-у дню, содержание стабилин-1+ и CD206+ макрофагов в зоне инфаркта увеличивается, начиная с 4-х и 11-х суток заболевания, соответственно, и не снижается к 28-у дню.

2. У больных фатальным ИМ с 1-х по 28-е сутки заболевания содержание сердечных CD68+ и CD163+ макрофагов превышает таковое у больных из группы контроля. С 1-х по 10-е сутки заболевания содержание сердечных CD206+ макрофагов у больных фатальным ИМ не отличается от такового у больных из группы контроля, но увеличивается в зоне инфаркта на 11-е сутки заболевания. С 1-х по 3-и сутки заболевания у больных фатальным ИМ определяется более низкое содержание сердечных стабилин-1+ макрофагов относительно такового у больных из группы контроля, но оно увеличивается в зоне инфаркта, начиная с 4-х суток заболевания.

3. У больных фатальным ИМ в зоне инфаркта наиболее высокое содержание сердечных CD68+ макрофагов наблюдается в первые сутки ИМ и на 4-е-28-е сутки заболевания, CD206+ макрофагов на 11-е-28-е сутки, CD163+ и стабилин-1+ макрофагов на 4-28-е сутки инфаркта. С 1-х по 28-е сутки заболевания содержание сердечных CD68+ макрофагов в зоне, отдаленной от инфаркта, превышает таковое у группы контроля. С 4-х по 28-е сутки заболевания содержание сердечных CD163+ макрофагов в зоне, отдаленной от инфаркта, превышает таковое у группы контроля. С 1-х по 3-и и с 11-х по 28-е сутки ИМ определяется более низкое содержание сердечных стабилин-1+ макрофагов в зоне, отдаленной от инфаркта, относительно такового у группы контроля.

4. У больных фатальным ИМ сердечные макрофаги представляют собой фенотипически гетерогенную популяцию клеток. По результатам иммуногистохимического исследования с 1-х по 28-е сутки заболевания в зоне инфаркта, перинфарктной зоне и зоне, отдаленной от инфаркта, преобладает количество CD68+ и CD163+ макрофагов. По результатам иммунофлюоресцентного анализа с 1-х по 28-е сутки заболевания количество сердечных CD163⁺/CD206⁻, CD206⁺/CD163⁻ и CD163⁺/CD206⁺ макрофагов в зоне инфаркта статистически значимо

не различается, но в зоне, отдаленной от инфаркта, с 1-х по 3-и сутки заболевания преобладающей субпопуляцией являются $CD206^+/CD163^-$ макрофаги. Также в миокарде больных фатальным ИМ I типа присутствуют клетки с фенотипом $стабилин-1^+/\alpha-SMA^+$.

5. У больных фатальным ИМ I типа, умерших с 1-х по 3-и сутки заболевания, отсутствие $стабилин-1^+$ макрофагов в интактном миокарде ассоциируется с наличием фиброза в соответствующей области. У больных ИМ, умерших на 4-28-е сутки, наличие фиброза в интактном миокарде ассоциируется с большим содержанием $CD68^+$ в соответствующей области. Низкое содержание $стабилин-1^+/\alpha-SMA^-$ в интактном миокарде у больных ИМ ассоциируется с патоморфологическими признаками ремоделирования сердца. Разрыв миокарда ассоциируется с повышенным содержанием сердечных $CD68^+$ макрофагов в зоне инфаркта и перинфарктной области, а также 163^+ макрофагов в перинфарктной области. Наличие аневризмы ЛЖ ассоциируется с повышенным содержанием $CD68^+$ макрофагов в зоне инфаркта и $CD163^+$ макрофагов в перинфарктной области, а также повышенным содержанием $стабилин-1^+/\alpha-SMA^+$ клеток в зоне инфаркта.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендовано использовать разработанный протокол иммуногистохимического и иммунофлюоресцентного исследования для изучения постинфарктной пространственно-временной аккумуляции сердечных макрофагов. Рекомендовано продолжить использование неинвазивной визуализации постинфарктного воспаления миокарда при помощи сцинтиграфии миокарда с ^{99m}Tc -аналогом соматостатина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гомбожапова А.Э. Стабилин-1-позитивные макрофаги в миокарде пациентов с фатальным исходом инфаркта миокарда / **А.Э. Гомбожапова**, Ю.В. Роговская, М.С. Ребенкова, В.В. Шурупов, Ю.Г. Кжышковская, В.В. Рябов // Сибирский медицинский журнал. – 2016. – Т. 31, №2. – С. 100-103.
2. Рябов В. В. Функциональная пластичность моноцитов / макрофагов в процессах восстановительной регенерации и постинфарктного ремоделирования сердца / В. В. Рябов, **А. Э. Гомбожапова**, Ю. В. Роговская, Е. Э. Иванюк, Ю. Г. Кжышковская, Р. С. Карпов // Иммунология. – 2016. – Т. 37, № 6. – С. 305–311.
3. Гомбожапова А. Э. $CD68$ и $стабилин-1$ позитивные макрофаги в постинфарктной регенерации миокарда / **А. Э. Гомбожапова**, Ю. В. Роговская, М. С. Ребенкова, Ю. Г. Кжышковская, В. В. Рябов // Российский кардиологический журнал. – 2017. – № 11. – С. 56–61.
4. Gombozhapova A. Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling [Electronic resource] / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, V. Shurupov, M. Rebenkova, J. Kzhyszkowska, S. V. Popov, R. S. Karpov, V. Ryabov // Journal of Biomedical Science. – 2017. – Vol. 24. – Article number 13. – 11 p. – URL: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12929-017-0322-3.pdf> (access date: 03.07.2021). – DOI: 10.1186/s12929-017-0322-3.
5. Гомбожапова А. Э. Фенотипическая гетерогенность сердечных макрофагов в постинфарктной регенерации миокарда: перспективы клинических исследований / **А. Э. Гомбожапова**, Ю. В. Роговская, М. С. Ребенкова,

Ю. Г. Кжышковская, В. В. Рябов // Сибирский медицинский журнал. – 2018. – № 2 (33). – С. 70–76.

6. Ребенкова М. С. Изменение количества макрофагов и их stabilin-1+ M2-субпопуляции в миокарде у пациентов в раннем постинфарктном периоде / М. С. Ребенкова, **А. Э. Гомбожапова**, Ю. В. Роговская, В. В. Рябов, Е. Г. Чурина, Ю. Г. Кжышковская // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13, № 3. – С. 56–62.

7. Ryabov V. Cardiac CD68+ and stabilin-1+ macrophages in wound healing following myocardial infarction: From experiment to clinic / V. Ryabov, **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, J. Kzhyshkowska, M. Rebenkova, R. Karpov // Immunobiology. – 2018. – Vol. 223, is. 4-5. – P. 413–421.

8. Рябов В. В. Воспаление как универсальное патогенетическое звено повреждения, репарации и регенерации при остром коронарном синдроме. От эксперимента к клинике / В. В. Рябов, **А. Э. Гомбожапова**, Ю. В. Роговская, М. С. Ребенкова, Я. В. Алексеева, Ю. Г. Кжышковская // Кардиология. – 2019. – Т. 59, № 8S. – С. 15–23.

Материалы конференций

1. Gombozhapova A. Cardiac CD68+ and stabilin-1+ positive macrophages in wound healing following myocardial infarction / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // European Journal of Heart Failure. – 2017. – Vol. 19, Suppl. 1 : Abstracts of the Heart Failure Congress 2017. Paris, France, April 29 – May 02, 2017. – P. 128.

2. Gombozhapova A. Cardiac CD163 and stabilin-1 positive macrophages in wound healing following myocardial infarction / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // European Heart Journal. – 2017. – Vol. 38, is. Suppl. 1 : Abstracts of the ESC Congress 2017. Barcelona, Spain, August 26–30, 2017. – P. 394.

3. Ребенкова М. С. Апробация и применение метода выделения моноцитов из периферической крови у пациентов с инфарктом миокарда / М. С. Ребенкова, М. Р. Патышева, **А. Э. Гомбожапова**, В. Б. Рябов, В. В. Рябов, Ю. Г. Кжышковская // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12, № 3 : III Национальный конгресс по регенеративной медицине: Гены и клетки, материалы. Москва, 15–18 сентября 2017 г.

4. Gombozhapova A. M2 cardiac macrophages in wound healing following myocardial infarction: translation to clinic / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // Cardiovascular Research. – 2018. – Vol. 114, is. Suppl. 1 : Abstracts of the 5th Congress of the ESC Council on Basic Cardiovascular Science on Frontiers in CardioVascular Biology 2018. Vienna, Austria, April 20–22, 2018. – P. S100.

5. Gombozhapova A. Cardiac macrophages in wound healing following myocardial infarction: from experiment to clinic / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // European Heart Journal. – 2018. – Vol. 7, is. Suppl. 1 : Abstracts of the Acute CardioVascular Care Congress 2018. Milan, Italy, March 03–05, 2018. – P. 178.– 0,06 / 0,01 а.л.

6. Gombozhapova A. Heterogeneity of cardiac macrophages during wound healing following myocardial infarction: clinical data / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // European Journal of Heart Failure. – 2018.

– Vol. 20, is. Suppl. 1 : Abstracts of the Heart Failure Congress 2018. Vienna, Austria, May 26–29, 2018. – P. 563–564.

7. Kim B. CD68+and M2 macrophage infiltration in the human brain following myocardial infarction / B. Kim., **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, Y. Prohorova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // Journal of Heart Failure. – 2019. – Vol. 21, Suppl. 1 : Abstracts of the HFA Winter European Meeting on Translational Heart Failure Research 2019. Les Diablerets, Switzerland, January 23–26, 2019. – P. 147–148.

8. Gombozhapova A. Functional phenotyping of cardiac macrophages in patients with myocardial infarction: prospects for implementation to clinical practice / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // European Journal of Heart Failure. – 2019. – Vol. 21, is. Suppl. 1 : Abstracts of the Heart Failure Congress 2019. Athens, Greece, May 25–28, 2019. – P. 107.

9. Ким Б. Динамика инфильтрации миокарда IL-10⁺/Stabilin-1⁺ макрофагами в процессе постинфарктной репарации миокарда / Б. Ким, М. С. Ребенкова, Ю. В. Роговская, **А. Э. Гомбожапова**, В. В. Рябов // IV Национальный конгресс по регенеративной медицине: Гены и клетки, материалы конгресса. Москва, 20–23 ноября 2019 г. – Т. 14, № S. – С. 109–110.

10. Gombozhapova A. Macrophages as contributors to chronic inflammation and cardiac fibrosis in patients with myocardial infarction / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // European Heart Journal. – 2019. – Vol. 40, is. Suppl. 1 : Abstracts of the ESC Congress 2019. Paris, France, August 31 – September 04, 2019. – P. 3992.

11. Gombozhapova A. Stabilin-1⁺/SMA⁺ macrophages in diagnostics of postinfarction tissue inflammation associated with adverse cardiac remodeling in patients with myocardial infarction / **A. Gombozhapova**, Y. Rogovskaya, M. Rebenkova, J. Kzhyshkowska, V. Ryabov // European Heart Journal. – Vol. 41, is. Suppl. 2 : Abstracts of the ESC Congress 2020 – The Digital Experience. August 29 – September 01, 2020. – P. 917.

Патент на изобретение РФ

Способ диагностики постинфарктного воспаления в миокарде, ассоциирующегося с неблагоприятным ремоделированием сердца // пат. № 2714694С1 Рос. Федерация: МПК G01N 33/53 (2006.01), A61B 10/00 (2006.01) / Рябов В.В., Гомбожапова А.Э., Роговская Ю.В., Ребенкова М.С., Кзышковская Ю.Г. Заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ) (RU) – № 2019118844; заявл. 17.06.2019; опубл. 19.02.2020, Бюл. № 5.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИЗ – инфарктная зона
 ИМ – инфаркт миокарда
 КШ – кардиогенный шок
 ЛЖ – левый желудочек;
 ПЗ – перинфарктная зона
 СД – сахарный диабет
 СН – сердечная недостаточность

Научное издание

Гомбожапова Александра Энхэевна

**ВОССТАНОВИТЕЛЬНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ МИОКАРДА
У БОЛЬНЫХ НА РАННИХ И ПОЗДНИХ СРОКАХ
ИНФАРКТА МИОКАРДА:
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПОЛЯРИЗАЦИЯ МАКРОФАГОВ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать Формат 60×84/16.
Усл. печ. л. 1,92.
Тираж 100 экз. Заказ №
