

УДК 616.127-005.8-018

© В.К. Гринь, В.Ю. Михайличенко, 2012.

## ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

**В.К. Гринь, В.Ю. Михайличенко***ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины» (директор – академик НАМН Украины В.К. Гринь), г. Донецк.***PATHOPHYSIOLOGIST ASPECT OF CELLS CARDIOMYOPLASTICS IN HEART WITH EXPERIMENTAL  
MYOCARDIAL INFARCT****V.K. Gryn, V.Yu. Mikhailichenko****SUMMARY**

In experience on 40 rats learning a morphological pattern of heart and its physiological data after a transplantation MSC, on a background of an acute myocardial infarction is conducted. The morphological data correspond to function research techniques, that allows to state, that the transplantation MSC increases fatigue life of heart to an exercise stress. The fraction of ejection and fraction of truncation of a left ventricle under the data MSC is considerably enlarged. With the help morphological and immunohistochemical researches is demonstrated neovasculogenesis in a zone of an infarct with involvement angiodylatory matters.

## ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КЛІТИННОЇ КАРДІОМІОПЛАСТИКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНФАРКТІ МІОКАРДУ

**В.К. Гринь, В.Ю. Михайличенко****РЕЗЮМЕ**

У досвіді на 40 щурах проведено вивчення морфологічної картини серця і його фізіологічні дані після трансплантації МСК, на фоні гострого інфаркту міокарда. Морфологічні дані відповідають функціональним методам дослідження, що дозволяє затверджувати, що трансплантація МСК підвищує витривалість серця до фізичного навантаження. Значно збільшується фракція викиду й фракція вкорочення лівого шлуночка по даним УЗД. За допомогою морфологічних та імуногістохімічних досліджень доказано неоваскулогенез у зоні інфаркту за участю ангіоділятируючих речовин.

**Ключевые слова: клеточная кардиомиопластика, инфаркт миокарда, эксперимент.**

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении и профилактике ишемического поражения миокарда, данная патология занимает второе место в общей смертности (по данным ВОЗ и НАМНУ 2009, 2010, 2011, 2012), независимо от социально – экономического состояния населения. К сожалению, современная фармакотерапия и хирургические методы лечения инфаркта миокарда исчерпывают свой лечебный потенциал, поэтому внимание большинства ученых всего мира направлено на возможность применения альтернативных методов реваскуляризации миокарда, в частности к клеточной терапии, а именно: трансплантации стволовых или эмбриональных клеток и как вариант – мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Таким образом, современное развитие биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии позволило, наряду с химическими способами коррекции метаболизма в поврежденных клетках, перейти к использованию биологических способов, при которых средством восстановления функции поврежденных органов при многих заболеваниях становятся донорские клетки [2, 3].

В настоящее время метод клеточной трансплантации рассматривается большинством

исследователей как перспективный. По-видимому, в обозримом будущем метод начнет применяться в клинической практике для улучшения прогноза у больных с сердечной недостаточностью (СН) различного генеза (ИБС, дилатационная и ишемическая кардиомиопатии и др.). Однако для этого в эксперименте должны быть получены убедительные доказательства позитивного влияния трансплантированных клеток на поврежденный миокард и выявлены преимущества влияния какого-либо определенного типа клеток (эмбриональных стволовых клеток, МСК, гемопоэтических стволовых клеток и др.) на восстановление сократительной функции поврежденного миокарда [1, 4].

Итак, изучение эффектов трансплантации культуры мезенхимальных стволовых клеток является малоизученным и перспективным направлением в современной медицине, а в частности в кардиологии и кардиохирургии, как метод альтернативной регенерации миокарда [5, 6].

Целью работы было изучить патофизиологические аспекты сердца при остром инфаркте миокарда и после трансплантации мезенхимальных стволовых клеток изогенных доноров в эксперименте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментального животного нами были избраны крысы инбредной линии Вистар-Кайото, это было связано с тем, что мы выполняли аллогенную трансплантацию клеток, а инбредные животные характеризуются высокой степенью гомозиготности по большинству генов, т.е. чистая линия, что в определенной степени нивелировало отторжение клеточного трансплантата и приближало до условий ауто трансплантации, как наиболее перспективного метода в клинической практике.

В исследовании вошли 40 животных, которые были разделены на 2 группы (по 20 крыс в каждой соответственно): 1 группа – контрольная – животные на которых была выполнена модель инфаркта миокарда и они не получали какого-либо лечения; 2 группа – на фоне инфаркта миокарда (ИМ) выполняли трансплантацию мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Необходимо отметить, что в исследовании клеточную кардиомиопластику осуществляли через 1 сутки после моделирования ИМ.

Всем животным моделировали ИМ по разработанной нами методике в условиях общего обезболивания (Патент України №39599; зареєстр. 14.04.08р. опубл.10.03.09р. Бюл.№5), путем интраперитонеального введения калипсола и ксилазина в дозах 60мг/кг и 7,5 мг/кг соответственно. Медикаментозный сон при правильном введении наступал через 2-3 минуты после введения и продолжался 110±5 минут.

Во время выполнения оперативного вмешательства и послеоперационном периоде выполняли мониторинг сердечной деятельности аппаратом для Холтеровского исследования Getemed HL5 (Германия). УЗИ сердца крыс выполняли в условиях общего обезболивания по вышеописанной методике на аппарате GE Vivid (США) с датчиком 12МГц.

NO (суммарную концентрацию нитрат и нитрит ионов) определяли в сыворотке крови колориметрическим методом с реагентом Грисса и предварительным восстановлением нитрат-ионов в нитрит хлоридом ванадия. Определение уровня эндотелина 1 (ЭТ-1) в плазме крови у крыс проводили иммуноферментным методом с использованием набора Endotelin (1-21), фирмы «Biomedica» (Австрия). Концентрацию VEGF определяли методом ИФА с использованием анти-VEGF кроличьих поликлональных антител (Genesis Biotech. Inc., Тайвань).

Помимо стандартных гистологических исследований, проводилось окрашивание ткани миокарда иммуногистохимическими методами для выявления актина, тропинина, пролиферирующих клеток. Нами были использованы первичные антитела к актину (клон ННF35, DAKO, Дания), тропинину Т

(клон JLT-12, Sigma-Aldrich, Германия), PCNA (клон PC10, DAKO, Дания). Для их визуализации использовали системы детекции DAKO Advance и краситель DAB+. Методика окрашивания соответствовала рекомендациям изготовителя. Перед окрашиванием срезов, выполняли регенерацию антипепных возможностей ткани в растворе Antigen Retrieval Solution (DAKO, Дания) с использованием микроволновой печи Samsung 430 (Корея). Докрашивание препаратов выполняли гематоксилином Майера. Для детекции введенных клеток взятых от самца, использовали гибридизацию in situ с определением Y-хромосомы.

Исследование препаратов с помощью световой микроскопии выполняли на микроскопе Axiostar (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографирование и морфометрическое исследование проводили на исследовательском микроскопе Olympus AX70 (Япония) с использованием программы AnalySis Pro 3.2 (фирма Softimaging, Германия) согласно рекомендациям производителя программного обеспечения.

Культуру мезенхимальных стволовых клеток крысы получали из костного мозга бедренной кости самца и изготавливали в Лаборатории клеточного и тканевого культивирования ГУ «ИНВХ им. В.К. Гусака НАМН Украины». Культуру клеток вводили крысам в бедренную вену из расчета 1 000 000 на 1 животное.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась на компьютере Pentium V, при помощи лицензионного пакета статистических программ Excel (Microsoft office XP).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При остром ИМ отмечается накопление ТБК-активных продуктов и компенсаторное повышение содержания церулоплазмينا и гаптоглобина свидетельствует о срыве компенсаторных механизмов. Соответственно при образовании обширного инфаркта миокарда, происходит разрушение мембран кардиомиоцитов и активация ПОЛ, что отражается в повышении ТБК-активных продуктов, интересен тот факт, что трансплантация МСК значительно снижает концентрацию ТБК-активных продуктов. При изучении антиоксидантной системы при ИМ, значительно повышается гаптоглобин, хотя в группе с трансплантацией МСК менее выражено, возможно с уменьшением альтерации миокарда вызванного ишемией. Тем не менее значительное повышение церулоплазмينا во 2 группе, свидетельствует об стимуляции трансплантированными МСК факторов естественной антиоксидантной системы.

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток сопровождается снижением активности ферментов АДА, ЛДГ в поврежденном миокарде,

который посредственно подтверждает повышение энергетического баланса энергообразующих субстратов и снижения степени ишемии миокарда. Снижение накопления продуктов ПОЛ и напряжение неферментативного звена антиоксидантной защиты является хорошим прогностическим критерием восстановления функциональной активности поврежденного миокарда. Подтверждается положительная динамика метаболических изменений после трансплантации МСК.

Таким образом, мы видим, что трансплантация МСК значительно нивелирует повреждение кардиомиоцитов, что сопровождается снижением первичных и вторичных продуктов ПОЛ в цитоплазме кардиомиоцитов, хотя и выше чем в норме. Данный факт свидетельствует о цитопротекторном действии МСК за счет различных механизмов, приводящих к сохранению большего числа пулов клеток, чем в группе животных не получавших какое-либо лечение.

После трансплантации мезенхимальных стволовых клеток изогенных доноров, отмечалось значительное улучшение морфологической картины, изменения с уменьшением зоны инфаркта, его глубины, визуальное улучшение «мускуляризации» по сравнению с группой немеченых животных

(табл.1). Трансплантация приводит до значительного улучшения васкуляризации в зоне инфаркта, что, возможно, приводит к уменьшению ишемии в пограничных с инфарктом зонах, а значит и уменьшению площади инфаркта. Отмечалась положительная динамика в виде уменьшения объема соединительной ткани в зоне инфаркта и увеличения числа мышечных волокон. Из полученных данных видно, что наилучшие результаты получены при трансплантации в ранние сроки (первые сутки), после моделирования инфаркта миокарда. Чем больше пролонгация сроков трансплантации, тем менее выражен эффект данной процедуры. При этом, следует отметить, что в сроки от 1 часа до 7 суток идет значительное увеличение концентрации оксида азота в сыворотки крови животных по сравнению с нормой и группой животных не получавших какое-либо лечение. Причем повышенное содержание оксида азота наблюдается до конца опыта. Такая же тенденция наблюдается и при изучении содержания VEGF. Интересен факт, что его концентрация в сыворотке крови значительно выше во 2 группе по сравнению с 1 до 7 суток и остается выше до конца опыта. Противоположная картина наблюдается при изучении содержания антагониста предыдущих

Таблица 1

Морфометрические данные исследования

Средние по группам	Без лечения (1 группа)	Трансплантация МСК (2 группа)
Удельный объем участка инфаркта от исходной ткани	24,02%	54,41%**
SD	1,04%	8,21%
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды	33,78%	17,73%**
SD	1,72%	5,69%
Удельный объем сосудов	6,32%	9,42%*
SD	0,16%	3,33%
Среднее кол-во сосудов на 100000 мкм <sup>2</sup>	10,21	68,20***
SD	1,26	4,64
% сохранившихся мышечных волокон (от исходного)	15,90%	45,04%**
SD	0,28%	9,81%

Примечание: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

биологически активных веществ – эндотелиина 1 (табл.2). Концентрация последнего возрастает до 6 часов после моделирования ИМ во 2 группе исследования и затем постепенно снижается и нормализуется к 1 месяцу. В 1 группе наблюдается его значительное повышенное содержание до конца 1 суток после ИМ и значительно выше до конца опыта по сравнению со 2 группой. Эффективность ангиогенеза была подтверждена улучшением газотранспортной функции: показано достоверное

повышение уровня  $PO_2$  на фоне снижения  $PCO_2$  и степени выраженности лактатацидоза. Кардиомиопластика стволовыми клетками поврежденного миокарда сопровождалась снижением активности ферментов аденозиндеаминазы эритроцитов и ЛДГ крови, а следовательно, повышением энергетического баланса энергоголодающих субстратов и снижением степени ишемии миокарда. Торможение пероксидации мембранных липидов и напряжение

Таблица 2

## Динамика изменения концентрации показателей ангиогенеза в сыворотке крови крысы

Срок ИМ	Показатель	Норма	1 час	6 часов	1 сутки	7 сутки	1 месяц	Группа
	Оксид азота (мкг/мл)	0,58±0,03	0,86±0,04***	0,92±0,03	1,12±0,05***	0,99±0,04*	0,88±0,03*	I
			0,89±0,05***	1,04±0,04*	1,26±0,03***	1,24±0,04	0,96±0,05***	II
	VEGF (пг/мл)	66,98±12,47	70,21±11,36	126,72±24,05*	220,45±22,13*	134,89±25,24	89,74±21,38	I
			71,42±13,45	134,86±28,11*	288,22±23,46***	189,57±28,47*	132,74±19,87	II
	Эндотелин 1 (моль/мл)	5,2±0,4	10,6±0,7***	12,8±0,5*	12,9±0,4	8,8±0,3***	5,3±0,4***	I
			10,4±0,5***	12,8±0,6**	9,1±0,3***	6,9±0,4***	5,1±0,2***	II

Примечание: при сравнении с предыдущим показателем: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

не ферментативного звена антиоксидантной защиты является хорошим прогностическим критерием восстановления функциональной активности поврежденного миокарда. При исследовании фракции выброса у животных в группе с трансплантацией МСК она равнялась  $65 \pm 4\%$  против  $48 \pm 5\%$  (в группе животных, которые не получали какое-либо лечение), учитывая, что в норме  $78 \pm 6\%$ . При исследовании добутаминовой стресс-нагрузки под динамическим мониторингом, мы отмечали значительное уменьшение угнетения ST в группе животных, которые получили лечение МСК.

#### ВЫВОДЫ

Таким образом трансплантация МСК при ИМ приводит к стабилизации развития рубцовой деформации миоцитов. Данные гистологических исследований, нашли прямо пропорциональную зависимость при изучении функциональных характеристик миокарда в виде фракции выброса, фракции укорочения левого желудочка, а также стабильности к переноски стресс-нагрузок. Эффективность ангиогенеза подтверждена возрастанием концентрации оксида азота и VEGF, а также снижением содержания эндотелина I.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беленков Ю.Н. Клеточная терапия в лечении хронической сердечной недостаточности: виды применяемых стволовых клеток, результаты последних клинических исследований / Ю.Н.

Беленков, Е.В. Привалов, И.С. Чекнева // *Kardiolog serdecno-sosud hir.* - 2008. - N 5. - С. 4-18.

2. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда / Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онищенко Н.А. [и др.] // *Рос. кардиол. журн.* - 2003. - Т. 5. - С. 42-50.

3. Потапов И.В. Имеет ли смысл кардиомиопластика нефракционированными клетками костного мозга в постинфарктном периоде? / И.В. Потапов // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* - 2005. - № 2. - С. 31-32.

4. Отдаленные результаты применения интракоронарной инфузии аутологичных мононуклеаров костного мозга / В.М. Седов, А.С. Немков, Б.В. Афанасьев [и др.] // *Бюллетень НИЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания».* - 2007. - Т. 8, № 6. - С. 297.

5. Чернявский А.М. Первые результаты эндокардиальной имплантации аутологичных стволовых клеток у больных с ишемической болезнью сердца / А.М. Чернявский, Е.А. Покушалов, Е.Н. Кливер [и др.] // *Всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов.* - тезисы докладов. - Москва, 2007. - С. 245.

6. Чудиновских Ю.А. Анализ возможности пролиферации клеток в зрелом миокарде / Ю.А. Чудиновских, М.В. Еремеевна, Р.А. Серов [и др.] // *Сердечно-сосудистые заболевания.* - 2009. - Т. 10, № 6. - С. 312.