



В. Ю. Михайличенко,  
С. А. Самарин, А. А. Бабанин

*Институт неотложной  
и восстановительной хирургии  
им. В. К. Гусака НАМН  
Украины, г. Донецк*

© Коллектив авторов

## РЕГУЛЯЦИЯ СОСУДИСТОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ В ЗОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА ПУТЕМ КОРРЕКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДИК КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ

**Резюме.** В эксперименте на 90 половозрелых крысах-самках линии Вистар-Кайота с вызванным инфарктом миокарда был проведен сравнительный анализ применения мезенхимальных и комитированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Было показано, что по эффективности наиболее перспективным является применение чистой линии МСК без направленной дифференцировки. На основании инструментального, лабораторного и морфологического исследования был доказан приоритет использования внутривенной трансплантации МСК изогенных доноров. Доказано, что применение МСК является эффективным методом влияния на эндотелиальную дисфункцию. Лечебный эффект достигнут за счет стимуляции неоваскулогенеза, паракринного эффекта, снижение ПОЛ, уменьшение площади рубца. Полученные результаты экспериментальных исследований позволяют рекомендовать их к дальнейшему применению в клинической медицине.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, клеточная кардиомиопластика, эндотелиальная дисфункция, ангиогенез.

### Введение

В настоящее время вопрос изучения эндотелиальной дисфункции прошел основные этапы становления и накопления фактического материала: исследование её маркеров при различных заболеваниях, определение и оценка роли активных медиаторов, а также поиск возможных вариантов устранения дисфункции и её клинических последствий — атеросклероза, тромбоза, спазма и т.д. [2, 4]. С уверенностью можно утверждать, что эндотелиальная дисфункция всегда предшествует повреждению или нарушению функционирования любого сосуда независимо от его органной локализации. Как заявлено в статье Furchgott и Zawadzki опубликованной в журнале «Nature» ещё в 1980 г., эндотелий — это не пассивный барьер, а активный «сердечно-сосудистый эндокринный орган, осуществляющий связь в критических ситуациях между кровью и тканями» [8], дисфункция которого является обязательным компонентом патогенеза практически всех сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Непосредственно участвуя в гомеостазе, гемостазе и процессах воспаления, он является первым органом-мишенью, через который реализуются многие звенья патогенеза разных заболеваний, в том числе инфаркта миокарда, а так же основным участником ангиогенеза на всех этапах формирования но-

вых сосудов. Особенно многогранное участие в проангиогенной функции эндотелия играют NO — триггер и трандуктор роста и дифференциации клеток, участвующих в ангиогенезе, посредством активации конститутивной NO-синтазы, повышения уровня цГМФ, митогенактивируемой киназы, экспрессии фактора роста фибробластов. В результате повышения уровня NO в поврежденной ткани происходит уменьшение признаков воспаления, повреждения и проявлений сосудистых поражений. Повышение синтеза эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) приводит к усилению процесса формирования новых капилляров и повышению объемной скорости кровотока в ишемизированной области. Кроме того, стимуляция эндотелином-1 (ЭТ-1) киназ рецепторов, сопряженных с G-белками класса 2, приводит к ингибированию фосфорилирования протеинкиназы B (Akt) и гипопродукции NO. Функции эндотелия складываются как баланс противоположно действующих начал, вызывая усиление или ослабление сосудистого тонуса, агрегацию или дезагрегацию клеток крови, увеличение или уменьшение числа сосудистых клеток [3]. В каждом случае результат определяется концентрацией синтезируемых веществ, между которыми существуют строгая зависимость и равновесие. Поиск путей воздействия на их синтез является ключом к



эффективной коррекции эндотелиальной дисфункции, как важного компонента лечения многих заболеваний органов кровообращения.

В последние десятилетия появилось много новых данных касающихся регенерации сердца. В отличие от большинства прочих тканей млекопитающих, мышечная ткань сердца не может полностью восстановиться после повреждения [1, 7, 9]. Таким образом, актуальным является постоянное изучение возможных путей воздействия на репаративную регенерацию — восстановление функций органа после повреждений, дистрофических процессов, инфекций, перенапряжений, травм, интоксикаций, кислородного голодания.

### Цель работы

Провести сравнительную оценку эффективности трансплантации стандартных и комитированных мезенхимальных стволовых клеток при системном их введении на эндотелиальную дисфункцию, как важного компонента проангиогенеза и процесса регенерации сердца.

### Материалы и методы исследований

Исследования проводились на 90 половозрелых крысах-самках линии Вистар-Кайота массой 280–300 г. Животные были разделены на 3 группы (по 30 животных в каждой): 1 группа — животные с ИМ не получали какого-либо лечения, 2 группа — животные, которым, после моделирования ИМ, выполняли трансплантацию МСК путем внутривенного введения. Ещё 30 животных составили группу, получавших, при тех же условиях, внутривенное введение комитированных МСК (комитация в кардиомиоцитарном направлении проводилась путем использования 5-азациитидина по стандартной методике). Крысам было проведено оператив-

ное вмешательство в условиях общего обезболивания, путем интраперитонеального введения калипсола и ксилазина в дозах 60 и 7,5 мг/кг соответственно. Моделирование инфаркта миокарда у крыс проводили по разработанной нами методике [5, 6], которая имела подтверждение, как морфологически (рис. 1), так и электрокардиографически (рис. 2). Во время выполнения оперативного вмешательства выполняли мониторинг сердечной деятельности аппаратом для Холтеровского исследования Getemed HL5 (Германия).

Культуру мезенхимальных стволовых клеток крысы изготавливали в Лаборатории клеточного и тканевого культивирования ГУ «ИНВХ им. В.К. Гусака НАМН Украины» по стандартной методике из костного мозга трубчатых костей. Культуру клеток вводили крысам в бедренную вену из расчета 1 000 000 на 1 животное. При комитации клеточной культуры МСК 5-азациитидином мы должны были убедиться, что получаем культуру дифференцировки в кардиомиоцитарном направлении. Поэтому при долгом культивировании мы получали клетки, которые спонтанно сокращаются, что подтверждало правильность выполнения методики.

NO (суммарную концентрацию нитрат и нитрит ионов) определяли в сыворотке крови колориметрическим методом с реагентом Грисса и предварительным восстановлением нитрат-ионов в нитрит хлорида 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.,

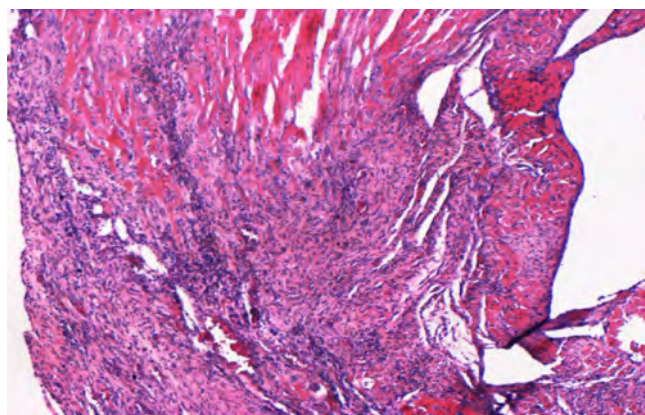


Рис. 1. Участок миокарда, который рубцуется, на 30 сутки эксперимента у крыс без лечения. Определяется большой рубец на месте трансмурального инфаркта с формированием аневризмы. Окраска гематоксилином и эозином, х 30



Рис. 2. ЭКГ динамика острого инфаркта миокарда (А — здоровое животное II стандартное отведение; В — 1 сутки ОИМ)

Тайвань). Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) плазмы крови определяли на приборе Cobas Integra 400+ с использованием стандартных оригинальных наборов фирмы Roche-Diagnostics (Швейцария). Так же изучали показатели перекисного окисления липидов, аденозиндезаминазу эритроцитов. Изучена газотранспортная функция крови. Определен удельный объем участка ИМ.

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

### Результаты исследований и их обсуждение

После трансплантации мезенхимальных стволовых клеток изогенных доноров, в сроки от 1 часа до 7 суток, идет значительное увеличение концентрации оксида азота в сыворотке крови животных по сравнению с нормой и группой животных, не получавших какого-либо лечения (табл.). 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. Чуть менее значимые, но также явственные результаты получены при использовании комитованных МСК в 3-й группе. Противоположная картина наблюдается при изучении содержания антагониста предыдущих биологически активных веществ – эндотелина 1. 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 повышенное содержание эндотелина 1 до конца 1 суток после ИМ и оно значительно выше до конца опыта по сравнению как со 2-й так и 3-й группами.

Кардиомиопластика стволовыми клетками поврежденного миокарда сопровождалась снижением активности ферментов аденозиндезаминазы эритроцитов и ЛДГ крови, а, следовательно, повышением энергетического баланса энергоголодающих субстратов и снижением степени ишемии миокарда. Торможение перекисидации мембранных липидов и напряжение не ферментативного звена антиоксидантной защиты является хорошим прогностическим критерием восстановления функциональной активности поврежденного миокарда. Следует отметить, что удельный объем участка ИМ в 1 группе составил (65,89±8,21) %, во 2 группе – (24,02±1,04) %, в 3-й группе – (29,65±2,55) %, т.е. площадь инфаркта миокарда уменьшилась во 2 группе почти в 3 раза, а в 3-й – в 2 раза. Благоприятная динамика со стороны сосудов, наиболее наглядно отразившаяся во 2 группе, сопровождалась существенным улучшением показателей: уменьшением объема соединительной ткани в зоне ИМ с 33,78 до 17,73 % (в 1,9 раза), увеличение процента сохраненных мышечных волокон с 15,9 до 45,04 % (в 2,8 раза). Эффективность ангиогенеза была подтверждена улучшением газотранспортной функции в обеих экспериментальных группах: показано достоверное повышение уровня PO<sub>2</sub> на фоне снижения PCO<sub>2</sub> и степени выраженности лактатацидоза.

Таким образом, мы видим, что трансплантация МСК приводит к повышенной выработке эндотелиального фактора роста сосудов, что, в свою очередь, значительно стимулирует ангиогенез. Это подтверждается морфометрическими исследованиями в виде увеличения количества молодых сосудов на единицу площади миокарда, уменьшения площади инфаркта и сохранения мышечных волокон. Параллельно с этим осуществляется длительная и интенсивная выработка оксида азота, угнетение образования эндотелина-1, что приводит к вазодилатации и улучшению кровоснабжения миокарда.

Таблица

Динамика изменения концентрации показателей ангиогенеза в сыворотке крови крысы

Показатель	Контроль	Группа	Срок после ИМ				
			1 час	6 часов	1 сутки	7 сутки	1 месяц
Оксид азота (мкг/мл) n= 10	0.58±0.03	1	0,86±0,04***	0,92±0,03	1,12±0,05***	0,99±0,04*	0,88±0,03*
		2	0,89±0,05***	1,04±0,04*	1,26±0,03***	1,24±0,04	0,96±0,05***
		3	0,86±0,06***	1,01±0,03*	1,16±0,04***	1,17±0,03	0,92±0,04***
VEGF (пг/мл) n= 10	66,98±12,47	1	70,21±11,36	126,72±24,05*	220,45±22,13*	134,89±25,24	89,74±21,38
		2	71,42±13,45	134,86±28,11*	288,22±23,46***	189,57±28,47*	132,74±19,87
		3	70,92±12,24	131,26±15,12*	262,41±19,53***	168,31±24,77*	111,57±17,72
Эндотелин 1 (моль/мл) n= 10	5.2±0.4	1	10,6±0,7***	12,8±0,5*	12,9±0,4	8,8±0,3***	5,3±0,4***
		2	10,4±0,5***	12,8±0,6**	9,1±0,3***	6,9±0,4***	5,1±0,2***
		3	10,4±0,6***	12,9±0,7**	9,4±0,4***	7,2±0,3***	5,4±0,3***

Примечание. При сравнении с предыдущим показателем: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001; 1 – группа крыс с ИМ без лечения; 2 – ИМ+трансплантация МСК; 3 – ИМ+трансплантация комитированных МСК.



### Выводы

Трансплантация МСК при ИМ приводит к стабилизации развития рубцовой деформации миоцитов. Эффективность ангиогенеза подтверждена возрастанием концентрации оксида азота (NO) и VEGF, а также снижением содержания эндотелиина 1. Морфо-функциональная адаптация миокарда после клеточной кардиомиопластики, позволяет рекомендовать

её к использованию в клинике. Комитированные МСК во многом уступают простым МСК, что можно объяснить их дифференцировкой в кардиомиоцитарном направлении, а учитывая их более дорогостоящее получение и длительному по времени процессу приготовления клеточной культуры, предпочтение следует отдавать дальнейшему изучению не комитированных МСК.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов Ю. Б. Эндотелиальная дисфункция как причина атеросклеротического поражения артерий при артериальной гипертензии. Методы коррекции / Ю. Б. Белоусов, Ж. Н. Намсараев // Фармотека. — № 6(84). — С. 62-72
2. Головченко Ю. И. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции / Ю. И. Головченко, М. А. Трещинская // Consilium medicum Ukraina. — № 11. — С. 38-40.
3. Гомазков О. А. Эндотелий — «эндокринное дерево» / О. А. Гомазков // Природа. — 2000. — № 5. — С. 38-46.
4. Коркушко О. В. Эндотелиальная дисфункция / О. В. Коркушко, В. Ю. Лишневецкая // Кровообіг та гемостаз. — 2003. — № 2. — С. 4-15.
5. Михайличенко В. Ю. Индукция репаративного морфогенеза и адаптационных резервов в поврежденном миокарде при использовании стромальных стволовых клеток костного мозга различного фенотипа / В. Ю. Михайличенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. — 2011. — Т. 12, № 2. — С. 216-223.
6. Применение аутологических мезенхимальных стволовых клеток в кардиологии и травматологии / В. К. Гринь, А. А. Штутин, В. Ю. Михайличенко [и др.] // Журнал НАМН Украины. — 2011. — Т. 17, № 1. — С. 67-75.
7. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective / B. J. Gersh, R. D. Simari, A. Behfar [et al.] // Mayo Clinic Proceedings. — 2009. — Vol. 84. — N10. — P. 876-892.
8. Furchgott R. F. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki // Nature. — 1980. — Vol. 288. — P. 373-376.
9. Mendis S. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control / S. Mendis, P. Puska, B. Norrving // World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011, — 356 p.



РЕГУЛЯЦІЯ СУДИННОЇ  
ПРОЛІФЕРАЦІЇ В ЗОНІ  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО  
ІНФАРКТУ МІОКАРДА  
ШЛЯХОМ КОРЕКЦІЇ  
ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ  
ДИСФУНКЦІЇ  
ЗАСТОСУВАННЯМ РІЗНИХ  
МЕТОДИК КЛІТИННОЇ  
КАРДІОМІОПЛАСТИКИ

*В. Ю. Михайличенко,  
С. А. Самарін, А. А. Бабанін*

**Резюме.** В експерименті на 90 статевозрілих щурах-самках лінії Вістар-Кайот з викликаним інфарктом міокарда був проведений порівняльний аналіз застосування мезенхімальних і комітірованих мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Було показано, що за ефективністю найбільш перспективним є застосування чистої лінії МСК без спрямованої диференціювання. На підставі інструментального, лабораторного та морфологічного дослідження був доведений пріоритет використання внутрішньовенної трансплантації МСК ізогенних донорів. Доведено, що застосування МСК є ефективним методом впливу на ендотеліальну дисфункцію. Лікувальний ефект досягнутий за рахунок стимуляції неоваскулогенеза, паракрінно ефекту, зниження ПОЛ, зменшення площі рубця. Отримані результати експериментальних досліджень дозволяють рекомендувати їх до подальшого застосування в клінічній медицині.

**Ключові слова:** ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда, клітинна кардіоміопластика, ендотеліальна дисфункція, ангіогенез.

THE  
VASCULARPROLIFERATION  
REGULATION IN  
EXPERIMENTAL  
MYOCARDIAL INFARCTION  
ZONE BY MEANS  
OF ENDOTHELIAL  
DYSFUNCTION CORRECTION  
TO DEMONSTRATE THE  
VARIOUS TECHNIQUES OF  
CELL CARDIOMYOPLASTY

*V. Yu. Mikhailichenko,  
S. A. Samarín, A. A. Babanin*

**Summary.** In the experiment on myocardial infarction, the comparative analysis of the application of mesenchymal and committed mesenchymal stem cells was carried out. It was shown that the most promising is the application of mesenchymal stem cells. According to morphological researches it is shown that the intravenous way of introduction is the best way of delivery of a cellular transplant. It has been shown that the use of MSCs is an effective method of influence on endothelial dysfunction. Therapeutic effect is achieved due to the stimulation of neoangiogenesis, paracrine effect, reduction of lipid peroxidation, and the diminishment of the area of the scar. The obtained experimental results allow us to recommend them for a further usage in clinical medicine .

**Key words:** ischemic heart disease , myocardial infarction , cell cardiomyoplasty , endothelial dysfunction, angiogenesis.