



ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛДЖЕННЯ

УДК 616.127–001–092.4:576.3/7:618.58–008.8

ЕФЕКТИ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ КРОВІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ УШКОДЖЕНІ МІОКАРДА

Ю. В. Поляченко, А. В. Габріелян, Т. М. Доманський, В. Й. Сморжевський, В. Ф. Оніщенко, А. П. Мазур, С. В. Романова, І. В. Кудлай, А. В. Якушев, П. П. Клименко, О. В. Кучук, В. М. Кирик, М. Д. Кучма, Г. С. Лобинцева, Р. В. Салютін, В. А. Шаблій

Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАН України, м. Київ,
Інститут генетичної та регенеративної медицини НАН України, м. Київ,
Інститут клітинної терапії, м. Київ,
Координаторський центр трансплантації органів, тканин і клітин, м. Київ

EFFECTS OF THE UMBILICAL BLOOD STEM CELLS IN EXPERIMENTAL INJURY OF MYOCARDIUM

Yu. V. Polyachenko, A. V. Gabrielyan, T. M. Domanskiy, V. J. Smorzhevskiy, V. F. Onishchenko, A. P. Mazur, S. V. Romanova, I. V. Kudlay, A. V. Yakushev, P. P. Klymenko, O. V. Kuchuk, V. M. Kyryk, M. D. Kuchma, G. S. Lobintseva, R. V. Salyutin, V. A. Shabliy

РЕФЕРАТ

Проаналізовані морфологічні, функціональні ознаки ураження міокарда та толерантності до фізичного навантаження у тварин за ізопротеренол-індукованого ураження міокарда після трансплантації ядромісних клітин (ЯК) пуповинної крові (ПК) в порівнянні з природним перебігом моделі. Доведено, що трансплантація ЯК ПК сприяє прискоренню процесів регенерації та відновлення ушкодженого міокарда в експериментальних тварин. Оцінені зміни локалізації трансплантованих ЯК в зоні ураження та здатність ЯК ПК за їх трансплантації шляхом внутрішньовенного введення мігрувати в зону пошкодження. Отримані експериментальні дані потребують комплексного аналізу та дозволяють очікувати позитивного ефекту під час клінічних випробувань у пацієнтів при хронічних захворюваннях серця.

Ключові слова: ядромісні клітини пуповинної крові; ізопротеренол-індуковане ураження міокарда; хронічні захворювання серця; трансплантація; експеримент.

SUMMARY

Morphological, functional signs of myocardium affection and tolerance to physical loading in animals with isoproterenol-induced affection of myocardium after transplantation of a nuclear-containing cells (NCC) of umbilical blood were analyzed in comparison with a natural course of the model. There was proved, that a transplantation of a NCC promotes acceleration of processes of regeneration and restoration of the damaged myocardium in experimental animals. There were estimated the changes in localization of the transplanted NCC in the zone of damage, and capacity of the peripheral blood NCC, while they were transplanted, using intravenous injection, to migrate into the damage zone. The experimental data obtained need further complex analysis and permit to wait a positive effect while performing clinical investigations in the patients, suffering chronic diseases of the heart.

Key words: nuclear-containing cells of umbilical blood; isoproterenol-induced affection of myocardium; chronic diseases of the heart; transplantation.

3

За даними світової літератури, різні клінічні форми хвороб системи кровообігу діагностують у 15–20% дорослого населення. У наш час серцево–судинні захворювання спричиняють смерть майже 40% населення більшості розвинутих країн Європи. В Україні вони посідають перше місце в структурі захворюваності та смертності населення. Хвороби системи кровообігу на 66,8% визначають рівень смертності усього населення, а його працездатної частини – на 53,8% [1]. Незважаючи на існуючі досягнення, сучасні методи лікування цих захворювань недостатньо ефективні. Вони не вирішують повною мірою завдань, що стоять перед системою охорони здоров'я, тому пошук нових методів, які сприяють поліпшенню стану здоров'я пацієнта, актуальні.

Дослдження з застосуванням стовбурових клітин (СК) при порушені функції скорочення міокарда розпочаті у 90–х роках минулого століття. Перші експериментальні роботи, в яких продемонстровані перспективи клінічного застосування СК як нового методу лікування, опубліковані понад 10 років тому [2, 3]. Доведено, що СК в ушкодженному міокарді сприяють активній регенерації та поліпшенню його функцій [4–9].

У пошкодженному міокарді виявлені трансдиференціювання СК [4, 5] та активація неоангіогенезу [6]. Відзначенні також інші механізми регенерації серця [7–9]. Проте, механізми впливу на ушкоджений

міокард, шляхи введення та вибір типу СК недостатньо вивчені [10]. У зв'язку з цим нами проведені експериментальні дослідження з застосування ЯК ПК на моделі ушкодження міокарда.

Мета роботи – вивчення впливу ЯК ПК у мишей під час моделювання пошкодження міокарда. Досліджували вплив ЯК ПК на зміни морфології у тварин за ураження міокарда; функцію збудження та проведення міокарда у тварин, яким моделювали ураження міокарда; толерантність до фізичного навантаження в експериментальних тварин; локалізацію та динаміку кількості СК після їх трансплантації тварині при ураженні міокарда.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні дослідження проведені на самках лабораторних мишей лінії FVB віком 6 міс, масою тіла 25–30 г з дотриманням принципів біоетики та норм біологічної безпеки. Для моделювання ураження міокарда тваринам підшкірно вводили розчин ізо-протеренолу в дозі 100 мг/кг протягом 5 діб. В групі спостереження ("Модель + ЯК ПК") через 3 тиж після моделювання внутрішньовенно вводили суспензію, що містила ЯК ПК людини. Як групу порівняння ("Модель") використовували тварин, яким вводили розчин –носій ЯК ПК.

ПК збирали під час пологів за інформованої згоди жінок. Всі жінки обстежені на гепатит В, гепатит С, ВІЛ-1/2, цитомегаловірус та сифіліс. ЯК ПК отримували шляхом спонтанної седиментації. Як седиментаційний розчин використовували фармакопейний 4% розчин желатину. До збідненої еритроцитами суспензії ЯК ПК повільно додавали 10% розчин ДМСО з 10% розчином декстрану 40 (мол. маса 40 000 Да) у співвідношенні 1:1. Кріоконсервування здійснювали у програмному заморожувачі. Процес охолодження починали з температури 20°C з швидкістю 1°C/хв до температури –6°C. За такої температури зразки витримували протягом 10 хв, після чого ініціювали кристалізацію. По завершенні кристалізації кріоконтеїнери охолоджували з швидкістю 0,3°C/хв до –35°C, потім – 5°C/хв до –50°C та 10°C/хв до –140°C. За температури –140°C процес охолодження в заморожувачі припиняли, матеріал переносили у рідкий азот (–196°C) для тривалого зберігання. Для трансплантації препарати кріоконсервованих ЯК ПК, які не містять трансмісивних інфекційних агентів, бактерійної та грибкової флори, розморожували на водяній бані при температурі 38–40°C до появи рідкої фази у подальшому – при кімнатній температурі. До суспензії ЯК ПК після розморожування повільно додавали ізотонічний розчин натрію хлориду до кінцевої концентрації ДМСО 2,5%, після чого 1×10^6 ЯК ПК вводили в об'ємі 100 мкл в хвостову вену тварин. Тваринам контрольної групи вводили роз-

чин, що містив компоненти кріопротектора та седиментаційного розчину – 0,5% желатину, 2,5% декстрану 40, 2,5% ДМСО. Для оцінки життєздатності клітин підраховували кількість клітин, які не погинали 7–AAD, за допомогою проточного цитофлуориметра – сортера BD FACSaria (Becton Dickinson, США) та визначали колонієутворювальну активність гемопоетичних прогеніторних/СК в напіврідкому комерційному середовищі Methocult H4435 (StemCellTechnologies, США) до і після кріоконсервування.

До початку експерименту та на етапах спостереження 3,3, 7 та 11 тиж після моделювання (2–га доба, 4 та 8 тиж після трансплантації ЯК ПК) проводили різні дослідження. Морфологічні дослідження препаратів міокарда здійснювали з використанням світло-оптичного мікроскопа після забарвлення їх гематоксиліном та еозином за стандартною методикою. ЕКГ реєстрували за допомогою електрокардіографа у стандартних відведеннях I, II, III, aVR, aVL, aVF. Для визначення динаміки змін толерантності до фізичного навантаження застосовували модифікований тест примусового плавання (Порсолт, 1977). Для кількісної оцінки донорських ЯК в міокарді використовували методи проточної цитометрії за допомогою лазерного проточного цитофлуориметра – сортера BD FACSaria (Becton Dickinson, США). Фенотипування клітин з міокарда миши для виявлення донорських клітин проводили за імуногістохімічним методом з використанням первинних моноклональних антитіл до мембраних антигенів HLA людини та вторинних антитіл, мічених флуорохромом PerCP, за рекомендаціями фірм – виробників. Для визначення локалізації ЯК в міокарді проводили флуоресцентну мікроскопію та дослідження в фазовому контрасті на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі Olympus FV 1000–BX61 Wi (Японія) з використанням прикладного програмного забезпечення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Через 2 доби після трансплантації ЯК ПК в міокарді тварин за даними проточної цитометрії виявлені донорські клітини у відносній кількості 0,0032% (n=2). Через 4 тиж після трансплантації (7 тиж після моделювання ураження) відносна кількість трансплантованих клітин людини в міокарді миши становила 0,0048% (n=3). Таким чином, суттєва різниця у динаміці змін кількості клітин в ураженому міокарді не встановлена. Натомість, відзначені зміни локалізації трансплантованих ЯК ПК. Через 2 доби після трансплантації вони локалізувалися переважно у просвіті кровоносних капілярів міокарда, а також у периваскулярному просторі і зоні набряку інтерстицію міокарда. Така локалізація клітин може свідчити про початок міграції ЯК ПК з мікроциркуляторного русла у периваскулярний простір та інтер-

стицій ушкодженого міокарда. На 7-му тижні спостереження (4 тиж після трансплантації) ЯК ПК спостерігали в інтерстиційному просторі. Вони щільно прилягали до плазматичної мембрани кардіоміоцитів (КМЦ). Ймовірно, міграція є проявом так званого "феномену роумінгу" трансплантованих ЯК до зони ураження. Таким чином, внутрішньовенне введення ЯК, з одного боку, є мінінвазивним втручанням, що не потребує виконання травматичної операції, з іншого – забезпечує надходження трансплантованих ЯК ПК в тканину міокарда.

За даними гістологічних досліджень в групі порівняння "Модель" виявляли чіткі ознаки ураження: набряк ядер, цитоплазми КМЦ, гетерохроматизацію та гіпертрофію їх ядер, розриви та звивистість ланцюжків КМЦ, контрактуру КМЦ, набряк периваскулярного простору, кровонаповнення капілярів, артеріол і венул.

Найбільш виражені ознаки ураження відзначали через 3,3 тиж спостереження. Через 7 і 11 тиж спостерігали зменшення вираженості ураження, що є наслідком процесів регенерації. Проте, через 11 тиж значущими були набряк ядер КМЦ, периваскулярного простору та кровонаповнення судин. Слабо виражені набряк цитоплазми КМЦ, звивистість ланцюжків КМЦ та міграція фіробластів і лімфоцитів до периваскулярного простору.

В групі спостереження ("Модель + ЯК ПК") через 3,3 тиж (через 2 доби після трансплантації) суттєві відмінності від групи порівняння не спостерігали. Через 7 тиж (через 4 тиж після трансплантації) за даними мікроскопічного дослідження встановлені деякі відмінності від групи порівняння: значно зменшився набряк периваскулярного простору, міграція в нього клітин. Через 11 тиж розбіжності між групами "Модель" та "Модель + ЯК ПК" були суттєві. Після трансплантації виявляли лише незначний набряк цитоплазми КМЦ та периваскулярного простору, деяке відхилення від вихідного стану кровонаповнення капілярів, артеріол і венул.

Таким чином, трансплантація ЯК ПК сприяла суттєвій активізації процесів нормальної регенерації в ізопротеренол–індукованій моделі ураження міокарда.

За даними ЕКГ в усіх тварин виявлений неправильний синусовий ритм. Збільшення частоти скорочень серця характерне для всіх тварин групи "Модель" на всіх етапах спостереження. У тварин, яким трансплантовані ЯК ПК, тахікардію відзначали лише через 2 доби після втручання. Порушення ритму у вигляді частих екстрасистол спостерігали в групі "Модель" через 3,3 тиж спостереження, воно поступово зникало до 11-го тижня. У групі "Модель + ЯК ПК" поодинокі екстрасистоли виявляли через 3,3 тиж, вони зникали через 7 та 11 тиж спостереження. Таким чином,

трансплантація ЯК ПК прискорювала процеси відновлення порушеної функції збудження в серцевому м'язі.

Значне розширення комплексу QRS на 4-му тижні дещо зменшувалось до 11-го тижня у тварин групи "Модель". Розщеплення комплексу QRS у групі "Модель" реєстрували на всіх етапах спостереження. В групі "Модель + ЯК ПК" ці ознаки на 11-му тижні дослідження були менш виражені, ніж в групі "Модель". Це свідчило, що трансплантація ЯК ПК сприяла прискоренню відновлення функції внутрішньошлункового проведення.

Елевацію або депресію сегмента ST в групі "Модель" відзначали на всіх етапах спостереження. Електрична альтернація комплексу QRS проявлялась через 3,3 та 7 тиж, дещо менше – через 11 тиж спостереження. Зниження вольтажу зубців ЕКГ, характерне через 3,3 тиж спостереження, до 11-го тижня зникало. Це може свідчити про поступове часткове відновлення порушених процесів метаболізму в міокарді. В групі "Модель + ЯК ПК" ці розлади зникали швидше.

Таким чином, трансплантація ЯК ПК сприяє прискоренню процесів відновлення порушених функцій збудження, проведення та метаболізму в ураженому серці.

Для аналізу змін толерантності до фізичного навантаження використовували тест примусового плавання. Під час його проведення реєстрували тривалість першого періоду активного плавання, до вимушеної зупинки для відпочинку та загальну тривалість плавання. Слід відзначити, що тривалість першого періоду активного плавання зумовлена не лише фізичною втомою, а й реакціями поведінки тварин. На загальну тривалість плавання (здатність триматись на поверхні) в основному вливає фізична втома тварин. На всіх етапах спостереження достовірні відмінності між групами не встановлені. Через 3,3 тиж (через 2 доби після трансплантації) в групі "Модель + ЯК ПК" спостерігали деяке зменшення толерантності до фізичного навантаження. Це може бути зумовлене реакцією на трансплантацію ЯК ПК. Після цього відзначали чітку тенденцію до збільшення толерантності до фізичного навантаження (збільшення тривалості як першого періоду активного плавання, так і загальної тривалості плавання). Відновлення толерантності до фізичного навантаження в групі "Модель + ЯК ПК" дещо випереджalo таке в групі "Модель".

При аналізі загальної тривалості плавання через 11 тиж в групі "Модель" достовірні розбіжності у порівнянні з вихідним станом зберігалися ($P=0,033$). В групі "Модель + ЯК ПК" вірогідної різниці загальної тривалості плавання не було. Таким чином, трансплантація ЯК ПК зумовлює нормалізацію порушеної толерантності до фізичного навантаження у тварин.

Динаміка змін ознак ураження

Ознаки	Величина показника в групах							
	«Модель + ЯК ПК»				«Модель»			
Етап спостереження після моделювання ураження, тиж	0	3,3	7	11	0	3,3	7	11
Сроки після трансплантації ЯК ПК або введення середовища ЯК ПК, тиж	–	0,3	4	8	–	0,3	4	8
Сума балів морфологічних ознак ураження	0	13,5	10,0	2,5	0	13,0	12,0	6,5
Сума балів електрофізіологічних ознак ураження	0	7,5	2,5	2,5	0	11,0	6,5	4,5
Зменшення загальної тривалості плавання, % від вихідного	0	33,0	25,7	15,6	0	24,9	21,4	18,7

Для проведення порівняльного аналізу природного перебігу ураження серця та впливу трансплантації ЯК ПК на процеси відновлення за даними морфологічного та електрофізіологічного досліджень кожну ознаку умовно позначали балами (0 балів – ознака не виражена, 0,5 бала – поодинок чи слабо виражена ознака, 1 бал – ознака виражена, 2 бали – значні прояви ознаки). За даними гістологічного дослідження реєстрували набряк, гетерохроматизацію, гіпертрофію ядер КМЦ; набряк цитоплазми КМЦ; розриви та звивистість ланцюжків КМЦ; контрактуру КМЦ; набряк периваскулярного простору; міграцію клітин (лімфоцитів, фібробластів) до периваскулярного простору; кровонаповнення капілярів, артеріол і венул; фіброз. За даними ЕКГ виявляли: тахікардію, екстрасистолію, електричну альтернацію, розширення та розщеплення комплексу QRS; елевацію та депресію сегмента ST; негативний зубець Т; зниження вольтажу зубців. Динаміку змін толерантності до фізичного навантаження визначали за загальною тривалістю плавання під час навантажувального тесту. Результати дослідження узагальнені у таблиці.

Як свідчать дані таблиці, за природного перебігу процесу після максимального ураження спостерігали природну регенерацію. В групі "Модель + ЯК ПК" через 2 доби після трансплантації спостерігали більш виражене у порівнянні з таким за природного перебігу ураження, погіршення морфологічних ознак ураження та зниження толерантності до фізичного навантаження. В подальшому, через 7 та 11 тиж (4 та 8 тиж після трансплантації) в групі "Модель + ЯК ПК" спостерігали суттєве прискорення процесів регенерації і відновлення толерантності до фізичного навантаження.

Таким чином, ЯК ПК, трансплантовані шляхом внутрішньовенного введення, з часом змінюють локалізацію: через 2 доби – 4 тиж після трансплантації спостерігали їх переміщення, що, можливо, свідчить про хемотаксичний механізм руху ЯК ПК в зону ураження, та, ймовірно, може бути основою для трансплантації ЯК ПК шляхом внутрішньовенного введення їх сусpenзії. Трансплантація ЯК ПК зумовлює тимчасове погіршення морфофункціональних ознак, що імовірно, може бути наслідком реакції організму на

ксенотрансплантацію. Проте, у подальшому, вірогідно, трансплантовані ЯК ПК активують процеси природної регенерації, що сприяє більш швидкому відновленню у групі "Модель+ЯК ПК", ніж у групі "Модель". Зважаючи на незначну відносну кількість донорських ЯК у міокарді дослідних тварин, найбільш вірогідним шляхом активації процесів регенерації є реалізація паракринного механізму.

ВИСНОВКИ

1. В експериментальному дослідженні на лабораторних тваринах з ізопротеренол–індукованою моделлю ураження міокарда встановлено, що трансплантація ЯК ПК прискорює процеси регенерації.

2. Внутрішньовенне введення сусpenзії ЯК ПК моделям при ушкодженні міокарда виявилось ефективним, про що свідчила позитивна динаміка за даними електрофізіологічних, морфологічних досліджень та функціональних тестів.

3. Отримані в експерименті результати можуть бути підґрунттям для проведення подальших клінічних випробувань у пацієнтів при хронічних захворюваннях серця.

4. ЯК ПК можуть мати перспективу клінічного застосування у пацієнтів при хронічних захворюваннях серця.

ЛІТЕРАТУРА

- Горбась І. М. Ішемічна хвороба серця: епідеміологія і статистика / І. М. Горбась // Здоров'я України. – 2009. – №3/1. – С. 35 – 39.
- Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach / D. Marelli, C. Desrosiers, M. el-Alfy [et al.] // Cell Transplant. – 1992. – Vol. 1. – P. 383 – 390.
- Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast graft in heart / G. Y. Koh, M. G. Klug, M. H. Soonpaa, L. J. Field // J. Clin. Invest. – 1993. – Vol. 92. – P. 1548 – 1554.
- Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodelling and improves cardiac function / A. A. Kocher, M. D. Schuster, M. J. Szabolcs [et al.] // Nat. Med. – 2001. – Vol. 7. – P. 430 – 436.
- Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti [et al.] // Nature. – 2001. – Vol. 410. – P. 701 – 705.
- Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration / M. D. Schuster, A. A. Kocher, T. Seki [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – Vol. 287. – P. 525

- 532.
7. Cell transplantation to prevent heart failure: a comparison of cell types / T. Fujii, T. M. Yau, R. D. Weisel [et al.] // Ann. Thorac. Surg. – 2003. – Vol. 76. – P. 2062 – 2070.
 8. Moore K. A. Stem cells and their niches / K. A. Moore, I. R. Lemischka // Science. – 2006. – Vol. 311. – P. 1880 – 1885.
 9. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation / J. M. Nygren, S. Jovinge, M. Breitbach [et al.] // Nat. Med. – 2004. – Vol. 10. – P. 494 – 501.
 10. Chien K. R. Stem cells: lost in translation / K. R. Chien // Nature. –



**НАУКОВО-МЕДИЧНЕ ВИДАВНИЦТВО
“ЛІГА - ІНФОРМ”**

Медичне видавництво «ЛІГА-ІНФОРМ» (м. Київ) запрошує до співпраці авторів медичної літератури.
Ми беремо на себе всі турботи про Вашу монографію: від редактування та створення оригінал-макету до поліграфічного виконання.

Видавництво, створене на базі журналу «Клінічна хірургія», допоможе видати книги з медицини, підручники, атласи, монографії.

Медичне видавництво «ЛІГА-ІНФОРМ» запрошує до взаємовигідної співпраці також фармацевтичні компанії, які займаються виробництвом, розповсюдженням і просуванням на ринок України лікарських засобів, медичного устаткування, компаній фармацевтичної промисловості (організації та представництва).



ТОВ “Ліга-Інформ”, 03680, м. Київ, вул. Героїв Севастополя, 30.
Свідоцтво про внесення до Державного реєстру суб’єктів видавничої справи
ДК № 1678 від 04.02.04.