

УДК 611.018:2/6:616.127-005.8-06-092.4

С. Жумагаликызы^{1*}, М.З. Кауламбаева¹, Н.Н. Ахметсадыков¹,
А.Б. Нурмухамбетова¹, М.К. Амиргазиева¹, М.Б. Озбеков¹, К.С. Бименов¹,
А.Н. Кожаев¹, Г.В. Федотовских², Г.М. Шаймарданова²

Применение мононуклеарной фракции аутологичных клеток костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при лечении постинфарктного кардиосклероза в эксперименте[#]

UDC 611.018:2/6:616.127-005.8-06-092.4

S. Zhumagalikyzy^{1*}, M.Z. Kaulambaeva¹, N. Ahmetsadykov¹,
A.B. Nurmuhambetova¹, M.K. Amirgazieva¹, M.B. Ozbekov¹, K.S. Bimеноv¹,
A.N. Kozhaev¹, G.V. Fedotovskih², G.M. Shaymardanova²

Application of Autologous Bone Marrow Cell Mononuclears and Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment of Experimental Myocardial Infarction[#]

Ключевые слова: кардиосклероз, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, мононуклеарная фракция аутологичных клеток костного мозга, трансплантация.

Ключові слова: кардіосклероз, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, мононуклеарна фракція аутологічних клітин кісткового мозку, трансплантація.

Key words: myocardial infarction, cardiac fibrosis, multipotent mesenchymal stromal cells, autologic bone marrow mononuclears, transplantation.

Несмотря на значительные успехи современной медицины, сердечно-сосудистые заболевания, в частности инфаркт миокарда с развивающимся затем кардиосклерозом, по-прежнему остаются главной причиной смертности и инвалидности населения [1].

В связи с тем, что существующие консервативные и оперативные методы лечения ишемии миокарда малоэффективны, разрабатываются новые способы регенерации тканей сердца, в частности, на основе использования клеток костного мозга [2, 3, 5].

Данный подход основан на способности клеток костного мозга участвовать в регенерации поврежденного миокарда [4, 7]. В терапии инфаркта миокарда используют различные клетки костного мозга: гемопоэтические стволовые [10], эндотелиальные прогениторные [8], мезенхимальные стромальные [12], а также ядродержащие клетки костного мозга [13]. Наибольшее распространение получила аутотрансплантация мезенхимальных стромальных и ядродержащих клеток костного мозга. Многие экспериментальные работы демонстрируют положительный эффект трансплантации этих клеток на регенерацию

Despite advances in contemporary medicine, cardiovascular diseases, in particular, myocardial infarction with following cardiac fibrosis, still remains a major cause of death and disability among the population [1].

Due to the fact that existing conservative and surgical treatments of myocardial ischemia are ineffective, the new methods to regenerate heart tissue are developed, particularly those involving bone marrow cells [2, 3, 5].

This approach is based on the ability of bone marrow cells to participate in the regeneration of injured myocardium [4, 7]. The treatment of myocardial infarction involved a variety of bone marrow cells: hematopoietic stem cells [10], endothelial progenitors [8], mesenchymal stromal cells [12], as well as bone marrow nucleated cells [13]. The autologous transplantation of mesenchymal stromal cells and bone marrow nucleated cells became the most widespread. A number of reported experiments demonstrated the positive effect of transplantation of these cells in regeneration of injured myocardium [6, 9, 11]. However, the issue of the most efficient cell type and optimal administration of cells for myocardial recovery remains unclear and requires further study.

¹ТОО Научно-производственное предприятие «Антиген», г. Алматы, Казахстан

²Национальный научный медицинский центр, г. Астана, Казахстан

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Азербайева, 4, Карасайский район, с. Абай, Алматинская область, Казахстан 040905; электронная почта: saule_zh_88@mail.ru

[#]Данное исследование было представлено на минисимпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 24 мая 2013 года в г. Киеве.

Поступила 15.06.2013

Принята в печать 30.08.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №3. – С. 271–274. © 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Antigen LLP, Almaty, Kazakhstan

²National Scientific Medical Reserch Center, Astana, Kazakhstan

*To whom correspondence should be addressed: 4, Azerbayeva str., Abay, Almaty region, Kazakhstan 040905 e-mail: saule_zh_88@mail.ru

[#]This reseach was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24th of May, 2012.

Received June, 15, 2013

Accepted August, 30, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 3. – P. 271–274. © 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

поврежденного миокарда [6, 9, 11]. Однако вопрос о наиболее эффективном типе клеток и оптимальном способе введения клеток для восстановления миокарда остается нерешенным и требует дальнейшего исследования.

Целью данной работы было сравнить эффективность применения мононуклеарной фракции аутологичных клеток костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для лечения постинфарктного кардиосклероза. Работа была выполнена в рамках научно-технической программы «Инновационные технологии в развитии клеточных трансплантаций и восстановлении функциональной активности органов и тканей» Национального научно-медицинского центра Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

Эксперименты выполняли на 18 кроликах массой 3–5 кг приблизительно одного возраста. Для моделирования постинфарктного кардиосклероза кроликам была проведена левосторонняя торакотомия в области 5–6-го межреберья с перевязкой левой коронарной артерии. Через 2–3 суток у животных регистрировали электрокардиограммы (ЭКГ) и анализировали содержание ферментов печени (аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы).

Аутологичные мононуклеарные клетки (МНК) и культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) получали из костного мозга (КМ) экспериментальных животных, извлеченного из гребней подвздошной кости. Эритроциты из суспензии клеток КМ удаляли с помощью лизирующего раствора. Для получения ММСК клетки КМ культивировали с использованием среды «MesenCult» («Stem Cell Technologies», США) в течение 7 суток до формирования монослоя, после чего клетки снимали и готовили суспензию ММСК с концентрацией 1–1,2 млн клеток/см³.

После моделирования инфаркта миокарда животные были разделены на три группы: 1) контрольная (без лечения); 2) внутривенное введение 5 см³ МНК аутологичного КМ; 3) внутривенное введение 5 см³ суспензии культивированных ММСК КМ кролика. Введение МНК КМ осуществляли двукратно через 7 и 14 суток, ММСК – через 14 и 21 суток после моделирования постинфарктного кардиосклероза.

Морфологические изменения в миокарде изучали через 7 суток после операции (перед введением клеток) и на 30-е сутки после введения клеток. Животных выводили из опыта, материал фиксировали в 10%-м растворе формалина и получали гистологические препараты. Препараты окрашивали гематоксилином-эозином и по методу ван Гизон.

Данные электрокардиограмм, полученных на 2–3-е сутки после торакотомии и перевязки, позволили сделать заключение о наличии субкардиального

The aim of this study was to compare the efficiency of administration of autologous bone marrow mononuclears and multipotent mesenchymal stromal cells for the treatment of cardiac fibrosis resulted from myocardial infarction. The investigation was performed as part of the R&D project ‘Innovative Technologies in the Development of Cell Transplantation and Restoration of Functional Activity of Organs and Tissues’ at the National Scientific Medical Center of the Ministry of Health Care of the Republic of Kazakhstan.

The experiments were performed in 18 rabbits, which were of 3–5 kg weight and approximately of the same age. Experimental myocardial infarction (MI) was induced by thoracotomy in 5–6th intercostal space from the left side and ligation of the left coronary artery. After 2–3 days electrocardiography was performed, and liver enzymes (aspartate aminotransferase and alanin aminotransferase) were assessed.

Autologous mononuclear cells (MCs) and cultured multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) were derived from bone marrow (BM) of experimental animals, which was aspirated from the iliac crest. Erythrocytes were removed from BM cell suspension using lysing solution. To obtain MMSC the BM cells were cultured in MesenCult medium (Stem Cell Technologies, USA) during 7–8 days until monolayer formation, the cells were detached and MMSC suspension was made with concentration of 1–1.2 million cells per cm³.

Post-MI animals were divided into three groups: 1) control (no treatment), 2) intravenous administration of 5 cm³ of autologous BM MCs, and 3) intravenous administration of 5 cm³ of cultured rabbit BM MMSCs suspension. The cells were introduced twice: BM MCs in 7 and 14 days, MMSCs in 14 and 21 days after MI modeling.

Morphological changes in the myocardium were assessed 7 days following the MI induction (before the introduction of cells), and in 30 days after cell introduction. Animals were sacrificed, the tissue was fixed in 10% formalin solution and histologic sections were prepared. The sections were stained with hematoxylin-eosin and according to van Gieson.

ECG data obtained at 2th–3rd day after thoracotomy and ligation allowed to reveal the presence of subcardial myocard injury, violation of intraventricular conduction, tachycardia, wandering pacemaker, subcardial ischemia, and left ventricular hypertrophic cardiomyopathy. Liver enzymes activity was increased. These observations indicated the developed acute coronary syndrome in experimental animals. Analysis of the ECG in the animals of group 1 on day 30 of the experiment revealed the presence of post-MI cardiac fibrosis.

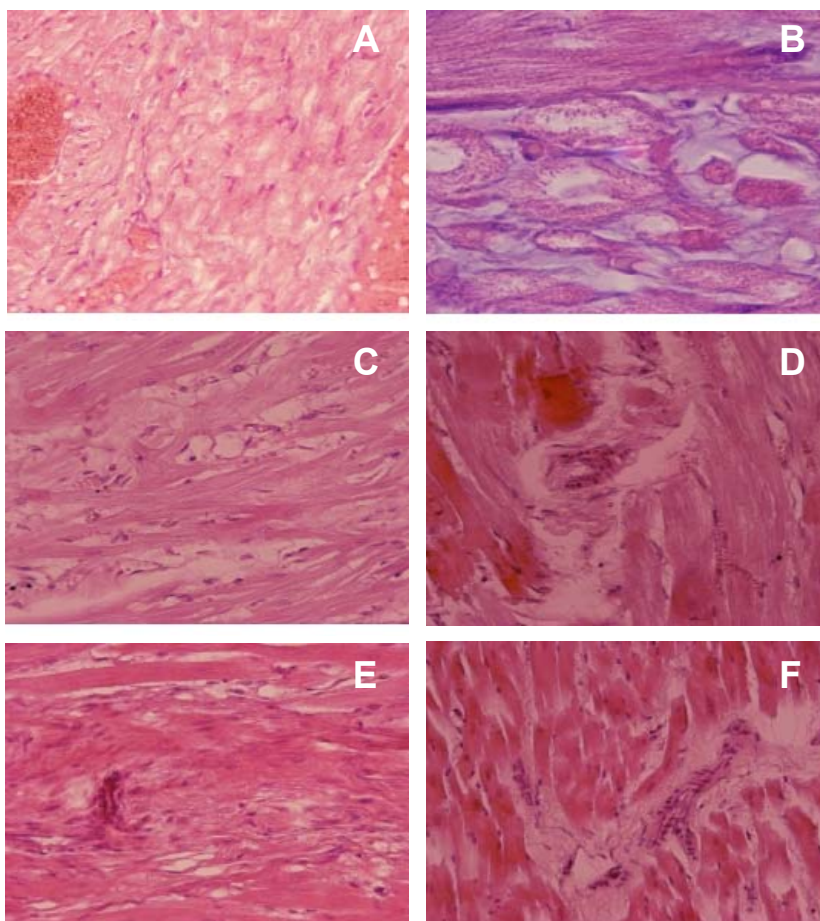
Morphological study of myocardial tissue of the animals in group 1 in 7 days after anterior intraventricular artery ligation revealed the presence in sub-epithelial zone of necrotic lesions of muscle fibers, swelling of nuclei and



повреждения миокарда, нарушении внутрижелудочковой проводимости, тахикардии, миграции водителя ритма, субкардиальной ишемии, гипертрофической кардиомиопатии левого желудка. Установлено повышение уровня печеночных ферментов. Такие наблюдения свидетельствовали о наличии острого коронарного синдрома у экспериментальных животных. Анализ ЭКГ у животных группы 1 на 30-е сутки эксперимента выявил наличие постинфарктного кардиосклероза.

Морфологическое исследование ткани миокарда животных группы 1 на 7-е сутки перевязки передней межжелудочковой артерии выявило наличие в субэпителиальной зоне очагов некротизированных мышечных волокон с набуханием лизосом и ядер, потерей поперечно-полосатой исчерченности, исчезновением клеточных границ. Кровеносные сосуды были полнокровными; клеточная реакция – незначительной. Отмечены пролиферация фибробластов и формирование узких прослоек соединительной ткани; мышечные волокна, окружающие зону инфаркта, были гипертрофированы (рисунок А). На 30-е сутки перевязки передней межжелудочковой артерии наблюдали диффузную и мелкоочаговую рубцовую ткань, заместившую некротизированные мышечные клетки. Характерными особенностями соединительнотканых рубцов были облитерация просветов сосудов гиперплазированными клетками интимы, замещение мышечных волокон жировой тканью, отек и очаговая лимфоцитарная инфильтрация. По периферии зоны некроза располагалась грануляционная ткань с очаговыми лимфоцитарными инфильтратами (рисунок В).

Патогистологическое исследование миокарда в группе животных через 30 суток после трансплантации аутологичных МНК показало сохранение зоны мелкоочаговой рубцовой ткани с умеренной воспалительной реакцией и крупными полнокровными сосудами по периферии. В грануляционной ткани перирубцовой зоны, а также в соединительнотканых (прослойках) тяжах рубцовой ткани располагались диффузно и очагами мелкие и крупные кровеносные сосуды (рисунок С, D). Наблюдались ярко выраженные явления отека интерстиция. Морфологическая картина миокарда после трансплантации ММСК



Ткань миокарда животных после моделирования постинфарктного кардиосклероза (А, В), а также введения МНК КМ (С, D) и ММСК (Е, F) на фоне смоделированной патологии: **А** – контроль (группа 1), 7-е сутки после операции, $\times 200$; **В** – контроль (группа 1), 30-е сутки после операции, $\times 200$; **С, D** – введение МНК КМ (группа 2), 30-е сутки после первого введения, $\times 200$; **Е, F** – введение ММСК (группа 3), 30-е сутки после первого введения, $\times 200$ (Е), $\times 400$ (F). Окраска гематоксилином-эозином.

Animal myocardial tissue after initiation of myocardial infarction (A, B), as well as after introduction of BM MCs (C, D) and MMSCs (E, F) after initiation of pathology: **A** – control (group 1), 7th day after initiation, $\times 200$; **B** – control (group 1), 30th day after initiation, $\times 200$; **C, D** – introduction of BM MCs (group 2), 30th day after the first introduction, $\times 200$; **E, F** – MMSCs introduction (group 3), 30th day after the first introduction, $\times 200$ (E), $\times 400$ (F). Staining by hematoxylin-eosin.

lysosomes, loss of cross striation, disappearance of the cell boundaries. Blood vessels were full-blooded; cell response was insignificant. Signs of fibroblasts proliferation and formation of narrow layers of connective tissue were revealed; muscle fibers surrounding the infarction were hypertrophied (Figure A). In 30 days after anterior intraventricular artery ligation we observed diffuse and small focal scar tissue, that replaced the necrotic muscle cells. The features of connective tissue scars were obliteration of the vessel lumen by hyperplastic intimal cells, substitution of muscle fibers by adipose tissue, edema, and focal lymphocytic infiltration. Necrotic area was surrounded by granulation tissue with focal lymphocytic infiltrates (Figure B).

Pathological examination of the myocardium in the group of animals 30 days following introduction of auto-

отличалась более выраженным процессом неоангиогенеза, низкой степенью воспалительной инфильтрации и меньшей выраженностью отека (рисунок Е, F).

Таким образом, наиболее эффективными трансплантируемыми клетками костного мозга для реваскуляризации миокарда с постинфарктным кардиосклерозом в эксперименте были мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о наименьшей коммитированности и наибольшей способности к превращению ММСК в другие типы клеток, в том числе и в кардиомиоциты, и в эндотелиальные клетки. Кроме того, ММСК обладают иммуномодулирующим эффектом на организм реципиента, что в целом делает их востребованными для клеточной терапии.

Литература

1. Кузовахо В.В., Богомолова Н.В. Регенерационная терапия ишемической болезни сердца путем применения стволовых клеток костного мозга человека // Совр. проблемы науки и образования. – 2005. – № 2. – [веб-сайт] <http://www.science-education.ru/39-1492> (01.03.2013).
2. Потапов И.В., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. Клеточная кардиомиопластика (аналитический обзор) // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2001. – №2. – С. 46–53.
3. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. – М.: БЭБиМ, 1998. – 250 с.
4. Шахов В.П., Попов С.В. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии. – Томск: СТТ, 2004. – 170 с.
5. Шевченко Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. – СПб.: Наука, 2006. – 288 с.
6. Aceves J.L., Archundia A., Diaz G. et al. Stem cell perspectives in myocardial infarctions // Rev. Invest. Clin. – 2005. – Vol. 57, №2. – P. 156–162.
7. Chachques J.S., Salanson-Lajos C., Lajos C. et al. Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration // Asian Cardiovasc. Thorac. Ann. – 2005. – Vol.13, №3. – P. 287–296.
8. Katritsis D.G., Sotiropoulou P.A., Karvouni E. et al. Transcatheter transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium // Catheter Cardiovasc. Interv. – 2005. – Vol. 65, №3. – P. 321–329.
9. Krausgrill B., Schwinger R.H., Muller-Ehmsen J. Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration // Med. Klin. (Munich). – 2006. – Vol. 101, №22 (Suppl. 1). – P. 202–206.
10. Limbourg F.P., Ringes-Lichtenberg S., Schaefer A. et al. Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment // Eur. J. Heart Fail. – 2005. – №7. – P. 722–729.
11. Piao H., Youn T.J., Kwon J.S. et al. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium // Eur. J. Heart Fail. – 2005. – №7. – P. 730–738.
12. Tang Y.L. Autologous mesenchymal stem cells for post-ischemic myocardial repair // Meth. Mol. Med. – 2005. – Vol. 112. – P. 183–192.
13. Zhang S., Guo J., Zhang P. et al. Long-term effects of bone marrow mononuclear cell transplantation on left ventricular function and remodeling in rats // Life Sci. – 2004. – Vol. 74, №23. – P. 2853–2864.

logous MCs revealed small focal scar tissue areas with mild inflammatory response and full-blooded large vessels at the periphery. Granulation tissue of peri-scar zone, as well as the connective tissue bands of scar tissue contained diffuse of focally located small and large blood vessels (Figure C, D). Significant interstitial edema was found. Morphology of the myocardium after MMSCs introduction was marked by more pronounced neoangiogenesis, as well as by low inflammatory infiltration and less severe edema (Figure E, F).

Thus, the multipotent mesenchymal stem cells were shown as most effective bone marrow cells for revascularization of myocardium with experimental post-infarction cardiac fibrosis. Our results were consistent with the reported data about low committing of MMSCs and their high ability to develop into other types of cells, including cardiomyocytes and endothelial cells. Furthermore, MMSCs possessed immunomodulatory effect on the recipient organism, that would make them prospective for cell based therapy.

References

1. Kuzovakho V.V., Bogomolova N.V. Regeneration therapy of heart ischemic disease after administration of human bone marrow stem cells // Sovr. Problemy Nauki i Obrazovaniya. – 2005. – N2. – [web-site] <http://www.science-education.ru/39-1492> (accessed on 01.03.2013).
2. Potapov I.V., Onischenko N.A., Krashenninnikov M.E. Cell cardiomyoplastics (Analytical Review) // Vestnik Transplantologii i Iskustvennykh Organov. – 2001. – N2. – P. 46–53.
3. Repin V.S., Sukhikh G.T. Medical cell biology. – Moscow, 1998. – 250 p.
4. Shakhov V.P., Popov S.V. Stem cells and cardiomyogenesis in norm and pathology. – Tomsk, 2004. – 170 p.
5. Shevchenko Yu.L. Medicobiological and physiological bases of cell technologies in cardiovascular surgery. – St-Petersburg: Nauka, 2006. – 288 p.
6. Aceves J.L., Archundia A., Diaz G. et al. Stem cell perspectives in myocardial infarctions // Rev. Invest. Clin. – 2005. – Vol. 57, N2. – P. 156–162.
7. Chachques J.S., Salanson-Lajos C., Lajos C. et al. Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration // Asian Cardiovasc. Thorac. Ann. – 2005. – Vol. 13, N3. – P. 287–296.
8. Katritsis D.G., Sotiropoulou P.A., Karvouni E. et al. Transcatheter transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium // Catheter Cardiovasc. Interv. – 2005. – Vol. 65, N3. – P. 321–329.
9. Krausgrill B., Schwinger R.H., Muller-Ehmsen J. Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration // Med. Klin. (Munich). – 2006. – Vol. 101, N22 (Suppl. 1). – P. 202–206.
10. Limbourg F.P., Ringes-Lichtenberg S., Schaefer A. et al. Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment // Eur. J. Heart Fail. – 2005. – N7. – P. 722–729.
11. Piao H., Youn T.J., Kwon J.S. et al. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium // Eur. J. Heart Fail. – 2005. – N7. – P. 730–738.
12. Tang Y.L. Autologous mesenchymal stem cells for post-ischemic myocardial repair // Meth. Mol. Med. – 2005. – Vol. 112. – P. 183–192.
13. Zhang S., Guo J., Zhang P. et al. Long-term effects of bone marrow mononuclear cell transplantation on left ventricular function and remodeling in rats // Life Sci. – 2004. – Vol. 74, N23. – P. 2853–2864.

