

УДК 616.127-005.8-003.93:576.3/7.086.83

© С.И. Эстрин, В.Ю. Михайличенко, 2013.

## РОЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

С.И. Эстрин, В.Ю. Михайличенко

ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины» (директор – академик НАМН Украины – В.К. Гринь), г. Донецк.

### THE ROLE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN TREATMENT OF EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFRACTION

S.I. Estrin, V.Yu. Mikhailichenko

#### SUMMARY

In an experiment carried out on 90 adult rats, we have shown that autologous mesenchymal stem cells (MSC) used in an acute myocardial damage play the role of inductors of regenerative processes in remodeling of damaged myocardium, providing reparative morphogenesis and enhancing the adaptive reserves of surviving, i.e. viable, myocardium. Transplantation leads to a significant improvement in vascularization in the infarcted area, which may lead to a reduction of ischemia around the infarct zone and thus to a reduction of this zone. The efficiency of angiogenesis has been validated by improved gas transportation functions: we observed a significant increase of the  $PO_2$  level against a decrease of  $PCO_2$  and severity of lactic acidosis. The ejection fraction in the group of animals with transplanted MSC was equal to  $65 \pm 4\%$  against  $48 \pm 5\%$  in the group of animals that did not receive any treatment, the norm value being  $78 \pm 6\%$ . Morphofunctional adaptation of the myocardium after myocardial cellular cardiomyoplasty is a reason to recommend it for the using at the clinic.

### РОЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІНФАРКТУ МІОКАРДА

С.І. Естрін, В.Ю. Михайличенко

#### РЕЗЮМЕ

В експериментальній роботі проведеної на 90 дорослих щурах продемонстроване, що аутологічні мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), використовувані при гострім ушкодженні міокарда, виступають у ролі індукторів процесів регенерації при ремоделюванні ушкодженого міокарда, забезпечуючи репаративний морфогенез і підвищення адаптаційних резервів збереженого, тобто життєздатного міокарда. Трансплантація приводить до значного поліпшення васкуляризації у зоні інфаркту, що, можливо, приводить до зменшення ішемії в прикордонні з інфарктом зонах, а значить і зменшенню площі інфаркту. Ефективність ангіогенезу була підтверджена поліпшенням газотранспортної функції: показано достовірне підвищення рівня  $PO_2$  на тлі зниження  $PCO_2$  і ступені виразності лактатацидоза. При дослідженні фракції викиду у тварин у групі із трансплантацією МСК вона рівнялася  $65 \pm 4\%$  проти  $48 \pm 5\%$  (у групі тварин, які не одержували яке-небудь лікування), враховуючи, що в нормі  $78 \pm 6\%$ . Морфофункціональна адаптація міокарда після клітинної кардіоміопластики дозволяє рекомендувати її до використання в клініці.

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

В последние десятилетия появилось много новых данных касающихся регенерации сердца. Следует отметить, что выделяют физиологическую и репаративную регенерацию сердца. Физиологическая регенерация – нормальный процесс обновления тканей, представляющий морфологическое выражение совершающихся в организме функциональных отвлечений. Репаративная регенерация – восстановление функций органа после повреждений, дистрофических процессов, инфекций, перенапряжений, травм, интоксикаций, кислородного голодания. В отличие от большинства прочих тканей млекопитающих, мышечная ткань сердца не может полностью восстановиться после повреждения [1]. Клеточные технологии применяемые в кардиологии и кардиохирургии принято называть термином «клеточная кардиомиопластика», т.к. независимо от того

какую методику применяют, будь это трансплантация эмбриональной, мезенхимальной стволовой клетки, кардиомиоцита, миобласта, фибробласта, нефракционированных клеток костного мозга и т.д. или целенаправленная экспрессия регуляторных генов клеточного цикла кардиомиоцита и другие высокотехнологические методы клеточной терапии, – все они направлены на изменение процессов структурно-функциональной перестройки миокарда с целью улучшения его функции, т.е. на ремоделирование сердца [2,3,4,5,6]. К сожалению несмотря на значительные успехи достигнутые стандартной терапией инфаркта миокарда начиная от медикаментозной и заканчивая различными методами экстренной реперфузии миокарда (различные виды тромболитика, баллонная ангиопластика, коронарное шунтирование) все они направлены на ограничение

размеров некроза и улучшению функции миокарда, что будет уменьшать проявление сердечной недостаточности и ее осложнений, а также электрическую нестабильность сердца, что соответственно улучшить качество жизни больных и уменьшит смертность [7,8,9,10].

Целью нашей работы было провести сравнительную оценку эффективности применения трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при системном введении механического микроповреждения миокарда на процессы регенерации сердца.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на 90 половозрелых крысах-самках линии Вистар-Кайота массой 280-300 г. Животные были разделены на 2 группы (по 30 животных в каждой): первая группа – животные с ИМ не получали какого-либо лечения, вторая группа – животные, которым после моделирования ИМ выполняли трансплантацию МСК; третья группа – животные, которым после моделирования ИМ проводили микроповреждение зоны ишемии миокарда и гибернирующий миокард инсулиновой иглой. Оперативные вмешательства проводили в условиях общего обезболивания, путём интраперитонеального введения калипсола и ксилазина в дозах 60 мг/кг и 7,5 мг/кг соответственно. Медикаментозный сон при правильном введении наступал через 2-3 минуты после введения и продолжался  $110 \pm 5$  минут. После достижения 3 ст хирургического наркоза, выполняли трахеостому: линейным разрезом до 1 см по средней линии рассекали кожу животных и тупо зажимом раздвигали мышцы на передней поверхности шей. Трахею брали на зажим, поперечно в межколючевом промежутке на 3 мм ниже перстневидного хряща рассекали трахею и в ее просвет вводили пластиковый катетер 14G (диаметр до 2 мм). После чего катетер подсоединяли с аппаратом искусственной вентиляции легких. Вентиляцию проводили с частотой 50-60 в минуту и объемом 1,5 мл на 100 г веса животного. Адекватность вентиляции оценивали по сердечной деятельности и состоянию кровоснабжения слизистой оболочки ротовой полости.

При моделировании инфаркта миокарда выполняли левостороннюю торакотомию в 5 межреберье, продольно вскрывали перикард. Инфаркт моделировали путем прошивания передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии, после первого деления, нитью Prolene 7/0 (фирмы Ethicon, Inc.). После чего грудную полость ушивали послойно и во втором межреберье по среднеключичной линии пунктировали плевральную полость и эвакуировали воздух. Далее отключали аппарат искусственной вентиляции от катетера, при правильно выполненной методике у крысы восстанавливаются адекватные дыхательные движения. Затем убирали катетер из трахеи и ушивали ее проленом 7/0, путем наложения узловых швов. После чего послойно ушива-

ли мышцы на трахеи. 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». Для получения культуры мезенхимальных стволовых клеток использовали костный мозг здоровых животных. Для предотвращения бактериальной контаминации их промывали физиологическим раствором, содержащим антибиотиками. Костный мозг трубчатых костей крыс обрабатывали механически и ферментативно. Затем помещали в термостат при  $37^\circ\text{C}$  на 10-15 минут. Через 10-15 минут заингибированную клеточную суспензию центрифугировали и сливали супернатант. Клеточный осадок заливали ростовой средой, содержащей 10 % ЭТС (Биолот, Санкт-Петербург) и помещали в культуральный матрас. Клеточный осадок ресуспендировали в ростовой среде Игла (Биолот, Санкт-Петербург), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург). Клетки, в количестве  $1,5-2,0 \times 10^6$  кл/мл, помещали в культуральный флакон и культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$  с 5% содержанием  $\text{CO}_2$  и 95% влажности. Среду заменяли через каждые три дня во всех культурах. Перед трансплантацией конфлюэнтную культуру клеток промывали буферным раствором и переводили в суспензию, используя стандартный раствор трипсина (2,5 г) на Хэнксе без  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  (Sigma, USA). Ингибировали суспензию клеток добавлением сыворотки, затем центрифугировали, супернатант удаляли и суспензию клеток в физиологическом растворе отдавали на трансплантацию. Культуру клеток вводили крысам в бедренную вену из расчета 1 000 000 на 1 животное.

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 (GenesisBiotech, Inc., Тайвань). УЗИ сердца крыс выполняли в условиях общего обезболивания по вышеописанной методике на аппарате GE Vivid (США) с датчиком 12МГц. Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) плазмы крови определяли на приборе CobasIntegra 400+ с использованием стандартных оригинальных наборов фирмы Roche-Diagnostics (Швейцария). Так же изучали показатели перекисного окисления липидов, аденозиндезаминазу эритроцитов.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась на компьютере PentiumV, при помощи лицензионного пакета статистических программ Excel (MicrosoftofficeXP).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После трансплантации мезенхимальных стволовых клеток изогенных доноров, отмечалось значительное улучшение морфологической картины, изменения с уменьшением зоны инфаркта, его глубины, визуальное улучшение «мышцеляризации» по сравнению с группой немеченых животных. Трансплантация обеспечивает значительное улучшение 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. Наилучшие результаты достигнуты при трансплантации в ранние сроки (первые сутки), после моделирования инфаркта миокарда. Чем больше пролонгация сроков трансплантации, тем менее выражен эффект данной процедуры. Следует отметить, что в сроки от одного часа до семи суток происходит значительное увеличение концентрации оксида азота в сыворотке крови животных по сравнению с нормой и группой животных, не получавших какое-либо лечение (табл.1).

Таблица 1

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 ***
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
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 ***

Примечание: при сравнении с предыдущим показателем: \*- p<0,05; \*\* - p<0,01; \*\*\* - p<0,001;  
1 – группа крыс с ИМ без лечения; 2 – ИМ плюс трансплантация МСК.

Повышенное содержание оксида азота наблюдается до конца опыта. Такая же тенденция наблюдается и при изучении содержания VEGF. Интересен тот факт, что его концентрация в сыворотке крови значительно выше во второй группе по сравнению с первой до семи суток и остаётся выше до конца опыта. Противоположная картина наблюдается при изучении содержания антагониста предыдущих биологически активных веществ – эндотелина 1. Концентрация последнего возрастает до 6 часов после моделирования ИМ во второй группе исследования и затем постепенно снижается и нормализуется к одному месяцу. В первой группе наблюдается значительное повышенное содержание эндоте-

лина 1 до конца первых суток после ИМ и значительно выше до конца опыта по сравнению со второй группой. Эффективность ангиогенеза подтверждена улучшением газотранспортной функции: наблюдалось достоверное повышение уровня  $PO_2$  на фоне снижения  $PCO_2$  и степени выраженности лактатацидоза. 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 неферментативного 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 она равна  $78 \pm 6\%$ . При изучении показателей работы сердца по данным УЗИ, мы подчеркнули, что диастолический объем сердца на прямую отражает изменение основных функций сердца. Следует учитывать минутный объем сердца, т.е. объем крови, выбрасываемый сердцем в сосудистую сеть в течение одной минуты. Мы изучили изменение МО при стресс-имитируемой нагрузке с изопропилнорадреналином. При сравнении показателей у животных интактных, модель ИМ, и животных, которым на фоне ИМ пересадили МСК, установлено, что у крыс с ИМ МО существенно снизился по сравнению с нормой с  $121,25 \pm 2,49$  до  $65,39 \pm 1,12$  мл/мин при  $t=20,26$ ;  $p < 0,001$  и был гораздо меньше, чем в группе с трансплантацией МСК ( $117,36 \pm 2,15$  мл/мин при  $t=21,43$ ;  $p < 0,001$ ). Интересен тот факт, что МО при максимальной нагрузке изопропилнорадреналином достоверно увеличивался у здоровых животных с  $121,25 \pm 2,49$  до  $129,25 \pm 3,2$  мл/мин при  $t=1,97$ ;  $p < 0,05$  и у группе ИМ+МСК с  $117,36 \pm 2,15$  до  $126,72 \pm 3,06$  мл/мин при  $t=2,5$ ;  $p < 0,05$ . В конце опыта МО равнялся начальному показателю, т.е.  $122,25 \pm 2,04$  (при  $t=0,62$ ;  $p > 0,05$ ) и  $120,72 \pm 2,33$  мл/мин (при  $t=1,06$ ;  $p > 0,05$ ). В группе крыс с ИМ без лечения не было изменения МО на протяжении всего опыта, исходя из математической зависимости  $МО = УО \times ЧСС / 1000$ , мы видим, что при учащении сердечных сокращений, уменьшался ударный объем сердца. При исследовании добутаминовой стресс-нагрузки под динамическим мониторингом, мы отмечали значительное уменьшение угнетения ST в группе животных, которые получили лечение МСК. Следует отметить, что все показатели в 3 группе с микроповреждением миокарда достоверно не отличались от показателей 1 группы, что опровергло теорию о том, что механический раздражитель в должной дозе обеспечивает ангиогенез в ишемизированных тканях.

#### ВЫВОДЫ

Таким образом, трансплантация МСК при ИМ приводит к стабилизации развития рубцовой дефор-

мации миоцитов. Механическое микроповреждение миокарда не повлияло на процессы ангиогенеза и регенерации миокарда. Данные гистологических исследований показали прямо пропорциональную зависимость при изучении функциональных характеристик миокарда в отношении фракции выброса, фракции укорочения левого желудочка, а также стабильности перенесения стресс-нагрузок. Эффективность ангиогенеза подтверждена возрастанием концентрации оксида азота и VEGF, а также снижением содержания эндотелина 1. Морфофункциональная адаптация миокарда после клеточной кардиомиопластики позволяет рекомендовать её для использования в клинике.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Маслов Л.Н. Регенерация миокарда / Л.Н. Маслов, В.В. Рябов, С.И. Сазонова // Успехи физиологических наук. - 2004. - №3. - С. 50-60.
2. 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.
3. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в кардиологии и травматологии / В. К. Гринь, А. А. Штутин, В. Ю. Михайличенко, А. Г. Попандопуло, С. И. Эстрин, Е. М. Денисова, В. М. Оксимец, Т. В. Кравченко, В. Г. Климовицкий // Журнал НАМН Украины. - 2011. - Т. 17, № 1. - С. 67-75.
4. Фундаментальные и прикладные аспекты клеточных технологий в кардиологии и кардиохирургии / Попов С.В., Рябов В.В., Сулова Т.Е. и др. // Бюллетень СО РАМН. - 2008. - №4. - С. 5-15.
5. Cell therapy to repair air broken hearts / Li R.K., Yau T.M., Sakai T. et al. // Can. J. Cardiol. - 1998. - N14. - P. 735-744.
6. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. // Cell. - 2007. - Vol. 131. - N5. - P. 861-872.
7. Lange R.A. Reperfusion Therapy in acute myocardial infarction / R.A. Lange, L.D. Hillis // N. Eng. J. Med. - 2003. - Vol. 346. - P. 954-955.
8. Strategies for myocardial repair / Koh G.Y., Soonpaa M.H., Klug M.G. et al. // J. Interv. Cardiol. - 1995. - N8. - P. 387-393.