

© Михайличенко В.Ю., Естрін С.І.

УДК: 616.127-005.8-089.844-092.4/.9

Михайличенко В.Ю., Естрін С.І.

ДУ "Інститут невідкладної і відновної хірургії імені В.К. Гусака НАМН України" (пр. Ленінський, 47, м. Донецьк, Україна, 83045)

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ РІЗНИХ ВИДІВ КЛІТИННОЇ КАРДІОМІОПЛАСТИКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНФАРКТІ МІОКАРДА

Резюме. Дослідження присвячено вирішенню актуальної наукової проблеми - обґрунтуванню ефективності ізогенної клітинної кардіоміопластики при інфаркті міокарда в експерименті на підставі комплексних функціонально - морфологічних досліджень. В експерименті було проведено порівняльний аналіз ефективності застосування ембріональних, мезенхімальних та комотованих мезенхімальних стовбурових клітин, а також введення Г - КСФ. На підставі інструментального, лабораторного й морфологічного дослідження пріоритетним визначено використання внутрішньовенної трансплантації МСК ізогенних донорів. Лікувальний ефект досягнуто за рахунок стимуляції неоваскулогенезу, паракринного ефекту, зниження ПОЛ, зменшення площі рубця, підвищення ФВ й формування стійкості до стрес - навантаження в експерименті, поліпшення скорочувальної здатності серця при гострому ІМ. Одержані результати експериментальних досліджень дозволили обґрунтувати доцільність застосування аутологічної трансплантації МСК у клінічній практиці у хворих на рефрактерну стенокардію.
Ключові слова: ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарда, клітинна кардіоміопластика, ремоделювання серця, ангіогенез.

Вступ

Сучасний розвиток біотехнології, молекулярної і клітинної біології дозволив, поряд із хімічними способами корекції метаболізму в ушкоджених клітинах, перейти до використання біологічних способів, при яких засобом відновлення функції ушкоджених органів при багатьох захворюваннях стають донорські клітини [Мойбенко, 2008].

В останнє десятиліття велика увага приділяється вже не окремим дослідженням в галузі генної і клітинної терапії захворювань, а новому напрямку, мета якого полягає у використанні природних механізмів відновлення тканин і органів - регенеративній медицині. Найважливіше завдання, що складає цей напрямок, - розробка методів відновлення кровопостачання ушкодженої тканин, без якого повноцінна регенерація неможлива [Михайличенко, 2013].

На сьогоднішній день технології дослідження стовбурових клітин (СК) вийшли на якісно новий рівень не тільки експериментальних моделей, але й варіантів їхнього клінічного застосування. Технології переносів генів, нокаутування, клонування, індукції плюрипотентності відкривають широкі можливості перед експериментальною і клінічною медициною, але вимагають уважного підходу й чіткого усвідомлення можливих ризиків [Бутенко та ін., 2011].

Багато з характеристик МСК, у тому числі здатність до диференціювання в різні клітинні типи *in vitro* та *in vivo*, роблять їх досить привабливими з погляду можливого використання для клітинної терапії цілої низки набутих або спадкоємних захворювань. Як при системному, так і при локальному введенні МСК мають здатність до хоумінгу й тривалого існування в різних органах і тканинах реципієнта [Куртова, 2006].

Кількість клінічних досліджень, що офіційно оголошуються в різних країнах миру, неухильно збільшуєть-

ся, так само як і число звітів, що свідчать про ефективність клітинної терапії при різних патологічних станах. Набагато рідше на сторінках наукових і медичних видань можна зустріти повідомлення про ускладнення або побічні ефекти застосування клітинних технологій, що вказує на необхідність подальших досліджень у цій галузі [Бокерія и др., 2006; Гринь, Михайличенко, 2014].

Таким чином, у цей час метод клітинної трансплантації розглядається більшістю дослідників як перспективний. Очевидно, у доступному для огляду майбутньому метод почне застосовуватися в клінічній практиці для поліпшення прогнозу у хворих із серцевою недостатністю (СН) різного ґенезу (ішемічна хвороба серця (ІХС), дилатаційна й ішемічна кардіоміопатія та ін.). Однак для цього в експерименті повинні бути отримані переконливі докази позитивної дії трансплантованих клітин на ушкоджений міокард і виявлені переваги дії якого-небудь певного типу клітин (наприклад, МСК) на відновлення скорочувальної функції ушкодженого міокарда. Відсутність таких даних в експерименті дозволила сформулювати мету нашого дослідження,

Мета - провести порівняльний аналіз різних методів клітинної кардіоміопластики у щурів при експериментальному інфаркті міокарда (ІМ).

Матеріали та методи

Для нашої роботи була необхідна модель із чіткою локалізацією та, за можливістю, рівною площею ураження міокарда. Модель електродеструкції міокарда не підійшла з низки причин: безпосередня дія струму спричиняла порушення ритму серця, що найчастіше призводить до летального результату; при однакових параметрах дії струму одержували абсолютні різні за глибиною і площею ділянки ушкодження; у вогнище коагуляції попадали капіляри приграничної зони. Такі ж про-

блеми низка дослідників одержали й при криоушкодженні міокарда. Методика технічно складна, тому що треба швидко й точно нанести криоудар, що практично неможливо. Використовуючи цей метод дослідник не може гарантувати, що криошрам призведе до ішемії, при цьому значні ушкодження міокарда можуть спричинити патофізіологічні побічні ефекти, які не пов'язані з ІМ. Тому необхідним умовам експерименту відповідала модель ІМ шляхом лігювання коронарної артерії.

Метод лігювання полягає в перев'язці лівої передньої низхідної артерії (LAD). LAD лігюють за допомогою одного стібка, спричиняючи ішемію, яку можна побачити практично відразу. При закритті LAD не надходить кровотік у залежну ділянку, у той час як на навколишні тканини міокарда це майже не впливає. Означена хірургічна процедура імітує патофізіологічні й патофізіологічні аспекти, що відбуваються в інфаркт-пов'язаному міокарді у людини.

Експериментальне дослідження виконувалося на тваринах інбредної лінії Вістар-Кайото. Це було пов'язане з тим, що виконувалась алогенна трансплантація клітин, а інбредні тварини характеризуються високим ступенем гомозиготності за більшістю генів, що деякою мірою нівелювало відторгнення клітинного трансплантата й наближало до умов ауто трансплантації, як найбільш перспективного методу в клінічній практиці. Крім того, моделювання ІМ виконувалося на самках, а використовували культуру мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) самців, щоб у подальшому за Y-хромосою верифікувати трансплантовані клітини в організмі реципієнта.

Експериментальні тварини (загальною кількістю 202) утримувалися у звичайних умовах віварію ДУ "ІНВХ ім. В.К. Гусака НАМН України". Дослідження на тваринах та клінічна частина виконувалися при дотриманні міжнародних правил біоетики, запропонованих міжнародними організаціями й асоціаціями, протокол експериментального і клінічного дослідження був схвалений локальним етичним комітетом (протокол № 2 від 06.04.2012р.) і відповідає Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації 2010р. перегляду.

Експериментальне дослідження виконувалося на 122 самках - щурах і 20 самцях. Самці використовувалися нами як донори кісткового мозку трубчастих кісток, з якого у подальшому одержували клітинний трансплантат і 2 самки - щура з вагітністю до 5 доби - задля одержання ембріонів. Слід зазначити, що групу контролю склали 20 самок, на яких до моделювання ІМ і досліджували всі основні нормальні фізіологічні показники. В дослідження ввійшли 100 тварин, які були розподілені на 5 груп (по 20 щурів у кожній відповідно): 1 група контрольна - тварини, на яких була виконана модель ІМ. Ці тварини не одержували якого-небудь лікування; 2 група - тварини, яким на тлі ІМ виконували трансплантацію ембріональної культури клітин; 3 група - на

тлі ІМ виконували трансплантацію МСК; 4 група - на тлі ІМ виконували трансплантацію комітованих МСК; 5 група - на тлі ІМ виконували ін'єкцію Г-КСФ. Необхідно відзначити, що клітинну кардіоміопластику здійснювали через 1 добу після моделювання ІМ.

Надалі, за даними біохімічних досліджень, ми вивчали динаміку маркерів ушкодження міокарда, лактатного обміну, ПОЛ, вазодилаторів і вазоконстрикторів, ендотеліального фактора росту судин. За допомогою інструментальних методів дослідження вивчали скорочувальну функцію серця як за допомогою інвазивних методик, так і за допомогою УЗД. Проводили ЕКГ моніторингу шурів у спокої і при проведенні стрес-навантажень. При виведенні тварин з експерименту проводили макрометричну й мікроскопічну оцінку серцець.

Один з головних ресурсів клітин для лікування серцево - судинних захворювань - ембріональні стовбурові клітини (ЕСК), які можуть бути направлені диференційовано в клітини-попередники кардіоміоцитів і в зрілі кардіоміоцити. Однак поки ще не з'ясовано, який саме тип клітин або стадія їх диференціювання найкраще підходять для використання в терапевтичних цілях. Розв'язання цього питання ускладнюється відсутністю методів, що дозволяють оцінити безліч параметрів, що впливають на ефективність клітинної трансплантації.

Тому, у першу чергу експериментальному дослідженню підлягала культура ЕСК, які ми одержували з 5 ембріонів щурів. У другу чергу ми використовували культуру МСК, отриманих з кісткового мозку трубчастих кісток щурів-самців. Третя культура була представлена комітованими МСК (комітацію ми спричиняли застосуванням 5-азациитидіна). Отже, схема клітинної терапії виглядала таким чином: забір клітин у самців, виділення клітин, їхнє культивування, експансія (збільшення біомаси й/або спрямоване диференціювання) і трансплантація в організм реципієнта. Четверта група була представлена Г-КСФ, що є біологічним стимулятором вироблення власних СК кістковим мозком тварини.

Результати. Обговорення

Перед тим, як ми вводили трансплантат МСК, ми повинні були з'ясувати, які саме клітини одержані в результаті культивування. Першим етапом було визначення життєздатності отриманої клітинної суспензії, що досягалося шляхом застосування 0,5% розчину трипанового синього, та за 5 хвилин суспензію ретельно піпетризували, заповнювали камеру Горяєва та підраховували кількість забарвлених і незабарвлених клітин. При ушкодженні цитоплазми, тобто мертвій клітині, барвник проникав усередину. Потім ми повинні були довести, що клітини здатні ділитися й не перебувають у стані гібернації, задля чого ми використовували забарвлення РСН, специфічним барвником для клітини, що ділиться. Наступним питанням була ідентифікація МСК. За даними Jiang Y. et al. [2002] для ідентифікації щурячих МСК достатньо, щоб виконувалися наступні

вимоги: негативно - CD 45, CD 34, c-kit (CD117) і позитивно - CD 90, SSEA-1, Thy-1. При підтвердженні того, що в нас культура саме МСК, ми приступали до масштабування культури, тобто збільшення числа клітин. Потім у кількості 1млн. клітин на одну тварину виконували трансплантацію тією чи іншою методикою. При комітуванні клітинної культури МСК 5-азацитидіном ми повинні були переконатися, що одержуємо культуру диференціювання у кардіоміоцитарному напрямку, тому при довгому культивуванні ми одержали клітини, які спонтанно скорочуються, що підтверджувало правильність виконання методики.

У різний термін експерименту ми проводили динамічне УЗД серця щурів, при якому виявляли: наявність систолічного стовщення ураженого сегмента міокарда при ІМ у систолу або стоншення, або взагалі відсутність. У термін від 1 місяця відзначається стоншення ураженого сегмента міокарда. Стоншений сегмент має підвищену ехогенність у порівнянні з прилягаючими сегментами внаслідок великої кількості сполучної тканини. Візуалізується порушення рухливості стінки: гіпокінезія, акінезія або дискінезія, тобто рух ураженого сегмента у систолу всередину частково знижений, відсутній або парадоксально спрямований назовні. Сегменти стінки протилежної ураженій при гострому ІМ, як правило, компенсаторно гіперкінетичні. У низки тварин з ІМ візуалізувалась аневризма лівого шлуночка (ЛШ), у вигляді випинання "мовчазної" стінки. Також відбувається значне пригнічення функції лівого шлуночка у вигляді зменшення серцевого викиду, ударного й хвильового об'єму (ХО). Причому є позитивний кореляційний зв'язок між ударним обсягом і фракція скорочення (ФС) ЛШ. За даними УЗД визначалася дилатація порожнин серця, що полягає у збільшенні кінцевого діастолічного та кінцевого систолічного внутрішніх діаметрів ЛШ, що свідчило про патофізіологічні зрушення, наявні при постінфарктному ремоделюванні серця. За даними УЗД найбільш близькою до нормальних показників була група тварин із внутрішньовенним введенням культури МСК.

При проведенні макроморфометричного дослідження ми одержали наступні дані: за місяць після застосування різних способів кардіоміопластики, маса серця (HW) у групі тварин із трансплантованими МСК не відрізняється від норми й не існує відмінності у групах тварин із внутрішньовенним введенням ЕСК і підшкірним Г-КСФ. При вивченні маси ЛШ (LW), спостерігається збереження даного показника в групі із трансплантованими МСК, найбільш близький показник до норми є в групі із трансплантованими комітованими МСК, а в групах із трансплантацією ЕСК, введенням Г-КСФ і у тварин з ІМ без якого-небудь лікування відмінності в LW немає. Цікавим є той факт, що при вивченні інтегрального показника відносини LW до маси тіла (BW) тварини, ми бачимо подібну картину, у групі із трансплантацією МСК і нормою. Найбільш близьким

показником до норми є група із трансплантацією комітованих МСК, причому в групах ІМ без лікування, трансплантацією ЕСК і підшкірним введенням Г-КСФ відмінності не було ($p > 0,05$). Цікавим є також той факт, що при вивченні інтегрального показника відносини HW до BW тварин відмінності між групами не було. Це можна пояснити тим, що зменшення LW відбувається за рахунок заміни нормального міокарда рубцевою тканиною і його розтягуванням, що призводить до зниження насосної функції серця. Далі процес ремоделювання призводить до мітральної регургітації крові й збільшення обсягу лівого передсердя, а це, у свою чергу, до збільшення тиску в малому колі кровообігу. Даний патофізіологічний процес супроводжується гіпертрофією правих відділів серця, за рахунок чого HW/BW залишається незмінним (табл. 1).

Таким чином, дані макроморфометрії підтвердили результати УЗД (табл. 2), що при інфарктному ремоделюванні відбувається дилатація порожнин серця, причому спочатку лівих відділів, а потім правих, що призводило до декомпенсації серцевої недостатності й смерті тварин.

Якщо гіпертрофія ЛШ пов'язана зі збільшенням механічного навантаження на збережений міокард, то гіпертрофія правого шлуночка обумовлена легеневою гіпертензією, характерною для серцевої недостатності. Встановлено, що при ІМ, крім інших систем, відбувається активація системи ендотелін-1 (ЕТ-1). Причому, джерелом ЕТ-1 є легенева судинна система, в якій виявлене збільшення експресії ферменту і активація ЕТ-перетворюючого ензиму.

З перших годин моделювання ІМ проводились ЕКГ моніторування, що демонструвало всі ознаки ІМ у патофізіологічному розвитку: за 30 хвилин після перев'язки лівої коронарної артерії рееструвалась елевація сегмента ST-крива Парді, що свідчило про ушкодження міокарда при найгострішій стадії ІМ.

Протягом перших 2 годин формувався патологічний зубець Q, що свідчило про наявність некрозу міокарда при гострій стадії ІМ. Через 10 - 14 днів формувався негативний зубець T, а збережена елевація сегмента ST свідчила про формування гострої аневризми. Через 1 місяць після моделювання гострого ІМ на ЕКГ рееструвалося збільшення амплітуди негативного зубця T і "розширення" зубця Q, що відповідає стадії рубцювання. Слід зазначити, що за добу після моделювання ІМ, у щурів спостерігалася брадикардія, формування зубця Q і зберігалася елевація сегмента ST, що свідчило про наявність некрозу при розповсюдженому трансмуральному ІМ. Надалі при ЕКГ моніторуванні відзначалися різні порушення ритму у вигляді: шлуночкових монотопних екстрасистолій, шлуночкових і надшлуночкових екстрасистолій з наступним розвитком АВ-блокад типу Мобіц 1.

Цікавим є факт про аритмогенність культури ЕСК. У літературі зустрічаються абсолютно протилежні думки,

Таблиця 1. Морфометричні показники серця щура.

Показник	Група					
	Контроль	1	2	3	4	5
BW (г)	302,4±13,2	301,5±12,8	299±15,9	300±14,2	303,9±14,6	303,2±12,4
HW (г)	1,064±0,025	1,029±0,012	1,039±0,015	1,054±0,02	1,045±0,02	1,039±0,013
LW (г)	0,62±0,05	0,48±0,018	0,49±0,017	0,6±0,05	0,56±0,024	0,49±0,019
HW/BW (г/г)	0,354±0,019	0,345±0,021	0,354±0,02	0,355±0,02	0,354±0,019	0,349±0,018
LW/BW (г/г)	0,2±0,02	0,16±0,01	0,16±0,01	0,2±0,02	0,18±0,01	0,16±0,01

Таблиця 2. Ультразвукові показники функціонування серця у щурів.

Показник	Група					
	Контроль	1	2	3	4	5
LVIDd, mm	6,16±0,12	7,19±0,16	6,68±0,18	6,18±0,11	6,29±0,15	6,79±0,16
LVIDs, mm	2,82±0,18	3,82±0,11	3,53±0,14	2,85±0,14	2,91±0,12	3,51±0,14
FS, %	45,3±1,7	26,8±0,8	27,7±0,6	45,0±0,9	43,7±0,11	28,8±0,8
EF, %	76,9±2,5	55,3±3,4	56,4±4,6	75,8±3,2	71,9±2,7	56,7±4,1
SV, ml	0,25±0,08	0,13±0,03	0,14±0,04	0,24±0,07	0,23±0,03	0,14±0,03

Примітки: статистична вірогідність показників наведена у тексті. LVIDd - end-diastolic left ventricular internal dimensions (кінцевий діастолічний внутрішній діаметр лівого шлуночка); LVIDs - end-systolic left ventricular internal dimensions (кінцевий систолічний внутрішній діаметр лівого шлуночка); FS - fractional shortening (ФС - фракція скорочення); EF - ejection fraction (ФВ - фракція викиду); SV - stroke volume (УО - ударний обсяг).

хоча більшість авторів дотримується точки зору щодо аритмогенності культури. У наших дослідженнях у щурів із трансплантацією ЕСК у низки тварин ми одержали пароксизм нестійкої шлуночкової тахікардії, поєднання шлуночкових і надшлуночкових екстрасистол, пароксизм надшлуночкової екстрасистоїї, що не спостерігалось в групах із трансплантацією інших культур. У групі із введенням Г-КСФ майже у всіх тварин відзначався пароксизм фібриляцій передсердь. При вивченні хронотропної функції серця у спокої та при застосуванні стрес-навантаження ізопропілнорадреналіном, ми продемонстрували, що найбільш швидке відновлення реакції серця на стрес, що виявлялося в нормалізації як хронотропної відповіді на введення ізопропілнорадреналіну, так і часу стабілізації, було у групі із трансплантацією МСК.

При морфологічному дослідженні ми досліджували 4 найбільш популярних варіанти клітинної кардіоміопластики, а саме: трансплантація ЕСК, МСК, комітованих МСК, а також введення Г-КСФ. Найгірші результати ми одержали при трансплантації ЕСК і введення Г-КСФ. Несподіваним результатом від ЕСК був очевидно через відсутність цілеспрямованої дії клітин, тобто відсутність або слабку виразність роумінг - ефекту. Незважаючи на те, що в порівнянні із МСК, вони менш диференційовані, проте ми не одержали від їхнього застосування позитивного результату. У порівнянні з моделлю ІМ, площа інфаркту трохи зменшилася, так само незначно було менше питомого обсягу сполучної тканини, хоча була вищою кількість судин, що не відбилося на відсотку збережених м'язових волокон. Застосування Г-КСФ привело до зменшення зони інфаркту й питомого об-

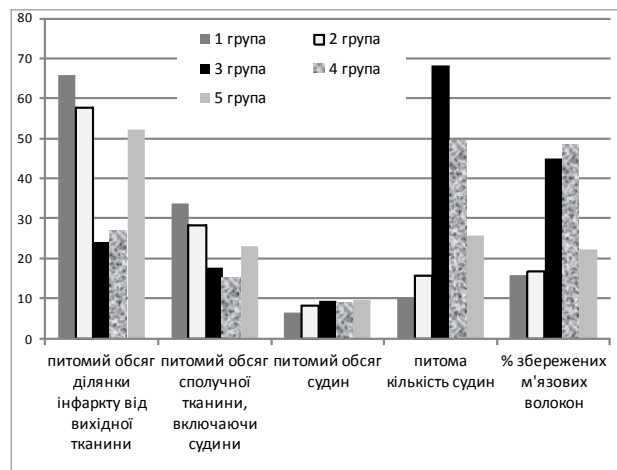
сягу сполучнотканинного компонента рубця, що формується, значно збільшилася середня кількість судин, що привело до незначного збільшення відсотка збережених м'язових волокон. Значний позитивний ефект трансплантації клітин був від МСК і комітованих МСК. В обох випадках відзначалося значне зменшення обсягу інфарктованої ділянки міокарда, питомого обсягу сполучнотканинного компонента, значно збільшилась середня кількість судин і відсоток збережених міоцитів, по перерахованих параметрах немає достовірної відмінності між двома видами. Однак середня кількість судин на 100 000 мкм² продемонструвала значну перевагу трансплантації МСК - 68,2 проти 49,35 (p<0,01). Це можливо пов'язане із переддиференціюванням МСК у кардіоміоцитарному напрямку, що менш ефективно стимулює неоангіогенез, у порівнянні з некомітованими МСК (табл. 3, рис. 1).

Виходячи з викладеного вище, стає очевидним, що застосування МСК при гострому ІМ є перспективним напрямком сучасної медицини. МСК кісткового мозку виступають у ролі індукторів процесів регенерації при ремоделюванні ушкодженого міокарда, забезпечуючи репаративний морфогенез і підвищення адаптаційних резервів збереженого міокарда. Роль МСК полягає не тільки в стимуляції ангіогенезу, тому що в групі із введенням Г-КСФ останній був також присутній, однак значних морфологічних змін у порівнянні із групою ІМ без лікування не було. Таким чином, підвищенню ефективності репаративного морфогенезу міокарда сприяє продукція МСК неспецифічних і тканиннотспецифічних регуляторних пептидів, дія яких спрямована на оптимізацію функціонування збереженого життєздатного міо-

Таблиця 3. Морфометричний аналіз результатів трансплантації МСК.

Середнє по групах	ІМ	Трансплантація МСК
Питомий обсяг ділянки інфаркту від вихідної тканини, %	65,83	24,02***
SD	8,21	1,04
Питомий обсяг сполучної тканини, включаючи судини, %	33,78	17,73**
SD	1,72	5,69
Питомий обсяг судин, %	6,32	9,42*
SD	0,16	3,33
Питома кількість судин на 100000 мкм ²	10,21	68,20***
SD	1,26	4,64
% збережених м'язових волокон (від вихідного)	15,90	45,04**
SD	0,28	9,81

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

**Рис. 1.** Зведена таблиця морфометричних показників в 1 частині дослідження.

карда й на зменшення обсягів вторинного ураження міокарда. Прекультивовані естромальні фракції МСК кісткового мозку для індукування репаративної регенерації міокарда вимагають матеріальних і часових витрат, а також з огляду на незначну відмінність постреплантацийного ефекту в порівнянні із трансплантацією МСК, доцільність комітації є сумнівною.

При утворенні великого ІМ, відбувається руйнування мембран кардіоміоцитів й активація ПОЛ, що позначається у підвищенні ТБК-активних продуктів. Ми досліджували первинні й вторинні продукти ПОЛ у цитоплазмі та мітохондрії кардіоміоцитів і продемонстрували високу інтенсифікацію кардіоміоцитарного ПОЛ в групі з ІМ і мінімально виражену в групі із трансплантацією МСК. Таким чином, трансплантація МСК значно знижує концентрацію ТБК-активних продуктів. При вивченні антиоксидантної системи, ми бачимо, що при ІМ значно підвищується гаптоглобін, хоча в групі із трансплантацією МСК це менш виражено, можливо, через змен-

шення альтерації міокарда, спричиненої ішемією. Проте значне підвищення церулоплазміну в групі ІМ+трансплантація МСК свідчить про стимуляцію трансплантованими МСК факторів природної антиоксидантної системи.

Нами була вивчена зміна концентрації АСТ, МВ-КК і лактатдегідрогеназа (ЛДГ) і ми одержали наступні дані. При великому ІМ відбувається підвищення МВ-КК і АСТ, але за чутливістю щодо розмірів КК-МВ є більше прогностичним, ніж АСТ, що просто підтверджує наявність ІМ. Кардіоміопластика МСК надає позитивний метаболічний ефект у вигляді підвищення активності ЛДГ і аденозиндезаміназа (АДА) при ІМ, що побічно свідчить про підвищення рівня енергостворюючих фосфатів у клітині.

Далі ми вивчили концентрацію вазодилатора - оксиду азоту й вазоконстриктора - ЕТ-1, а також рівень ендотеліального фактора росту судин. Установили, що в термін від 1 години до 7 днів йде значне збільшення концентрації оксиду азоту в сироватці крові тварин з ІМ у порівнянні з нормою. Причому підвищений вміст оксиду азоту спостерігається до 6 місяців. Така ж тенденція спостерігається й при вивченні вмісту VEGF. Цікавим є факт, що його концентрація в сироватці крові значно підвищилася у тварин із трансплантацією МСК у порівнянні з 1 до 7 доби й залишається підвищеною до кінця дослідження. Протилежна картина спостерігається при вивченні вмісту антагоніста попередніх біологічно активних речовин - ЕТ-1. Концентрація останнього зростає до 6 годин після моделювання ІМ з наступною трансплантацією МСК, потім поступово знижується і нормалізується до 1 місяця. При ІМ без лікування спостерігається його значний підвищений вміст до кінця 1 доби після ІМ і значно вищий до кінця дослідження. Таким чином, ми бачимо, що трансплантація МСК спонукує до підвищеного вироблення ендотеліального фактора росту судин, що, у свою чергу, зумовлює значну стимуляцію ангиогенезу. Це підтверджено морфометричними дослідженнями у вигляді збільшення кількості молодих судин на одиницю площі міокарда, зменшення площі інфаркту й збереження м'язових волокон. Паралельно із цим відбувається тривале й інтенсивне вироблення оксиду азоту, пригнічення утворення ЕТ-1, що, у свою чергу, спричиняє вазодилатацію та призводить до поліпшення кровопостачання міокарда.

До того ж, існують експериментальні роботи, присвячені вивченню зв'язку ендотеліальної дисфункції з розвитком шлуночкових аритмій. Насамперед, розглядається гіпотеза про аритмогенний ефект ЕТ-1, що має виразні вазоконстрикторні властивості. Можливо, аритмогенна дія ЕТ-1 заснована на подовженні або збільшенні дисперсії монофазної частини потенціалу дії, подовженні інтервалу QT, розвитку ранніх постдеполяризацій, ацидозу й посиленні клітинного ушкодження.

Трансплантація МСК при експериментальному ІМ у щурів зумовлює зменшення зони ІМ у 3 рази, при цьому сполучнотканинний компонент зони інфаркту змен-

шився у 1,9 разів, за рахунок збільшення кількості судин у 6 разів і збереження м'язових волокон у 2,6 разів більше, ніж у тварин з ІМ без лікування.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Незважаючи на великий арсенал клітинних культур і цитокінів, питання про безпеку й ефективність застосування всіх видів клітинної кардіоміопластики залишається відкритим. У наших дослідженнях ми продемонстрували основні патофізіологічні механізми розвитку інфаркту міокарда у щурів, зміни як у скорочувальній і хронотропній функціях, так і порушення в системі ПОЛ, ангиогенезу. Трансплантація культури ЕСК при ІМ у щурів призвела до низки негативних реакцій у вигляді життєнебезпечних аритмій, відсутності чітких критеріїв ефективності у вигляді поліпшення скорочувальної і хронотропної функції серця, а також утворення кістково-хрящових структур у серці реципієнта після пересаджування. Наші дані збігаються з результатами

світової літератури, що дозволяє рекомендувати утриматися застосування даного виду клітинної кардіоміопластики в клініці.

2. Застосування Г-КСФ, на що багато дослідників сподівалися, не дало у нашому експерименті очікуваних результатів. Незважаючи на те, що застосування Г-КСФ у клініці є елементарним (проста ін'єкція), і повинно було б привести до поліпшення морфофункціонального стану серця після інфаркту за рахунок стимуляції власного пула СК організму, воно не спричинило позитивних зрушень у досліджуваних показниках на тлі ІМ.

3. Комітовані МСК і МСК виявилися найефективнішими в нашому експерименті, але, на жаль, перші багато в чому програють простим МСК і необхідно ще враховувати більш коштовне їхнє виготовлення.

Перспектива подальшого вивчення клітинної кардіоміопластики заключається в можливості застосування даної методики регенерації міокарду у клінічній практиці з вивченням оптимальних способів введення клітинного матеріалу.

Михайличенко В.Ю., Эстрин С.И.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Резюме. Исследование посвящено решению актуальной научной проблемы - обоснованию эффективности изогенной клеточной кардиомиопластики при инфаркте миокарда в эксперименте. В эксперименте был проведен сравнительный анализ применения эмбриональных, мезенхимальных и комитированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), а также введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Было показано, что по эффективности наиболее перспективным является применение МСК. На основании инструментального, лабораторного и морфологического исследования приоритетным было доказано использование внутривенной трансплантации МСК изогенных доноров. Лечебный эффект достигнут за счет стимуляции неоваскулогенеза, паракринного эффекта, снижение ПОЛ, уменьшение площади рубца, повышение ФВ и формирование устойчивости до стресс-нагрузочных проб в эксперименте, улучшение сократительной способности сердца при остром ИМ. Полученные результаты экспериментальных исследований позволило обосновать целесообразность применения аутологичной трансплантации МСК в клинической практике у больных с рефрактерной стенокардией.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, клеточная кардиомиопластика, ремоделирование сердца, ангиогенез.

Mikhailichenko V.Y., Estrin S.I.

THE COMPARATIVE ANALYSIS DIFFERENT TYPES OF CELLULAR KARDIOMIOPLASTIKA AT THE EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

Summary. The investigation is devoted to solving the urgent scientific problems - to a substantiation of efficiency of the isogenic cellular cardiomyoplasty with myocardial infarction in the experiment and the possibility of its application in clinical practice. In the experiment was carried out the comparative analysis of the application of the embryonic, mesenchymal and committed mesenchymal stem cells, and also the introduction of the granulocytic colony-stimulating factor. It was shown that the efficiency is the most promising application of mesenchymal stem cells. According to morphological researches it is shown that the best way of delivery of a cellular transplant is the intravenous way of introduction. Subsequently it was carried out a morphofunctional study of the most effective time of the introduction of transplant after the modeling of myocardial infarction. It is proved that the less time has passed from the modeling moment, the more effective the action of transplant on the remodeling of heart. The experimental results allowed substantiating use of autologous stem cells for transplantation in clinical practice in patients with refractory angina pectoris.

Key words: coronary artery disease, myocardial infarction, cellular cardiomyoplasty, remodeling of the heart, angiogenesis.

Стаття надійшла до редакції 29.04.2014 р.

Михайличенко В'ячеслав Юрійович - д. мед. н., с.н.с., вчений секретар ДУ "Інститут невідкладної і відновної хірургії імені В.К. Гусака НАМН України"; +38 050 981-18-00; pancreas1978@mail.ru

Естрин Сергій Ігорович - к. мед. н., с.н.с., лікар-кардіохірург відділу невідкладної і відновної кардіохірургії ДУ "Інститут невідкладної і відновної хірургії імені В.К. Гусака НАМН України"; +38 099 374-25-51; pancreas1978@mail.ru