В. Ю. Михайличенко

ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии имени В.К. Гусака АМН Украины», г. Донецк

© В. Ю. Михайличенко

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИИ СЕРДЦА ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Резюме. В статье проанализирована сократительная функция сердца у крыс с инфарктом миокарда после различных видов кардиомиопластики. Стресс-имитирующая нагрузка изопропилнорадреналином проявлялась в положительном хронотропном эффекте у всех групп животных. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток способствовала восстановлению реакции сердца на стресс, что проявилось в нормализации как хронотропного ответа на введение изопропилнорадреналина, так и времени стабилизации этого показателя. Введение фетальных клеток не было сопряжено в наших исследованиях с нормализацией хронотропной функции сердца.

Ключевые слова: *инфаркт миокарда, клеточная кардиомиопластика, сократительная функция.*

Вступление

В костном мозге и жировой ткани содержатся $CD34^{-}CD45^{-}$ — клетки, которые называются мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Они являются резидентами стромы костного мозга, которые присутствуют в костном мозге в небольших количествах 1 на 10^4—10^5 клеток [6]. МСК экспрессируют CD105, CD 73, CD 166, CD 44 и STRO-1, а также обладают способностью к дифференцировке в хондроциты, остеобласты, адипоциты, фибробласты и могут формировать строму костного мозга, а также другие ткани [2]. МСК обладают минимальной экспрессией молекул гласного комплекса гистосовместимости II класса и недостатком ко-стимулирующей поверхностной молекулы B-7, необходимой для запуска Т-клеточного иммунного ответа [10], что при аллогенной трансплантации не приводит к стимуляции реакции отторжения «трансплантат против хозяина». Трансплантация МСК позволяет значительно улучшить сократительную функцию миокарда у мышей после индуцированного инфаркта [1]. В работе Wang J.S. et al. [7] впервые была выдвинута гипотеза, что при инфаркте миокарда в сердце создаются определенные условия и идут сигналы, под воздействием которых МСК дифференцируются в кардиомиоциты. В работах Rangappa S. et al. [10] было доказано, что человеческие МСК трансплантируемые в мышиный миокард, через 8 недель преобразовывались в кардиомиоциты. Помимо прочего установлено, что трансплантируемые МСК, не культивированные с 5-азацитидином, могут выделять фактор роста стволовых клеток SCF [1]. SCF обладает мощным антиапоптотическим действием, усиливает хоуминг, приживление и функционирование эндотелиальных и других предшественников в области повреждения [7]. SCF является также главным активатором $c\text{-}kit^{+}$ тучных клеток, которые инфильтрируют поврежденную область миокарда и стимулируют пролиферацию и сократительную активность миофибробластов, происходящих из резидентных кардиальных фибробластов, а не из костного мозга [7]. В исследованиях на животных через 2 недели после обработки мышиных строгальных клеток костного мозга 5-азоцитидином было отмечено формирование миотубарных структур внутри клеток, которые экспрессировали миозин, альфа-актин, GATA-4 (специфический кардинальный транскрипторный фактор), MEF-2 (миоцитарный индуцирующий фактор), предсердный натрийуретический фактор и мозговой натрийуретический пептид [9]. Через 3 недели вновь выращенные кардиомиоциты продуцировали уже электрофизиологические потенциалы действия, аналогичные тем, что вырабатывают клетки синусового узла.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнена на 80 самках белых крыс линии Вистар—Кайота массой 280—300 г. До начала эксперимента все животные были разделены на две группы. Животные первой группы были интактными (№ 20), на крысах второй группы моделировали инфаркт миокарда по оригинальной методике. Животные второй группы методом случайных чисел были разделены на три подгруппы (по 20 животных в каждой). Первую подгруппу животных оставляли контрольной, второй внутривенно водили эмбриональную (7—10-суточную) культуру клеток крыс, третьей группе вводили мезенхимальные стволовые клетки внутривенно.

Для дальнейших исследований животные из экспериментальных групп отбирались не ранее, чем через две недели. Перед тестированием крысы наркотизировались внутрибрюшинным введением калипсола. После наступления наркотического

сна, животное крепилось на лабораторном столе брюшной поверхностью вверх. На грудной клетке подкожно крепились электроды кардиографа по схеме 1-го стандартного отведения.

Предварительно зарегистрировав ЧСС, моделировали стрессовую нагрузку введением раствора изопропилнорадреналина. После этого регистрацию ЧСС повторяли. В дальнейшем измерения проводили каждые 3 минуты в течение 15 минут. По окончании измерений электроды кардиографа извлекали, возможные повреждения кожных покровов обрабатывали антисептиком. Для выхода из наркоза животное помещали в теплое сухое помещение со свободным доступом к воде.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась на компьютере PIV, при помощи пакета статистических программ Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

В начале наблюдений, до введения изопропилнорадреналина базовые значения ЧСС существенно различались у всех групп животных. У интактных самок этот показатель составил 485 ± 43 уд/мин. У самок после моделирования инфаркта миокарда отмечались более высокие значения — 503 ± 23 уд/мин ($p \geq 0,05$). У животных после внутривенного введения эмбриональной культуры клеток ЧСС было на уровне 500 ± 13 уд/мин ($p \geq 0,05$). Введение мезенхимальных стволовых клеток животным с моделью инфаркта миокарда приводило к снижению базовых значений ЧСС до 489 ± 14 уд/мин ($p \geq 0,05$).

Стресс-имитирующая нагрузка изопропилнорадреналином проявлялась в положительном хронотропном эффекте у всех групп животных. Для интактных самок максимальные значения ЧСС составили 518 ± 35 уд/мин ($p \leq 0,05$). У самок после моделирования инфаркта миокарда отмечались более высокие значения — 525 ± 15 уд/мин ($p \leq 0,05$). У группы животных после введения эмбриональной культуры клеток ЧСС было на уровне 515 ± 13 уд/мин ($p \leq 0,05$). У животных с моделью инфаркта миокарда после введения мезенхимальных стволовых клеток стрессовая нагрузка сопровождалась увеличением ЧСС до 528 ± 9 уд/мин ($p \leq 0,05$).

Помимо максимальных значений ЧСС, хронотропный эффект удобно оценивать по величине абсолютного прироста. Так, для группы интактных животных он составил 33 уд/мин ($p \leq 0,05$). Развитие инфаркта миокарда сопровождается снижением величины стресс-индуцирующего увеличения ЧСС до 22 уд/мин ($p \leq 0,05$). Введение эмбриональной культуры клеток животным после инфаркта миокарда сопровождалось дальнейшим снижением величины абсолютного прироста ЧСС до 15 уд/мин ($p \geq 0,05$). Введение мезенхимальных стволовых клеток приводило к значительному увеличению реакции сердца на стресс-моделирующую нагрузку. У этой группы животных абсолютный прирост составил 39 уд/мин ($p \leq 0,05$).

К окончанию наблюдения у всех групп животных отмечалось снижение ЧСС, при этом его выраженность была различна. Так, у интактных крыс величина ЧСС составила 488 ± 23 уд/мин ($p \leq 0,05$). У самок после моделирования инфаркта миокарда значения оставались более высокими — 495 ± 15 уд/мин ($p \geq 0,05$). У животных после внутривенного введения эмбриональной культуры клеток конечная ЧСС было на уровне 490 ± 17 уд/мин ($p \geq 0,05$). После введение мезенхимальных стволовых клеток конечные значения ЧСС составили 503 ± 15 уд/мин ($p \geq 0,05$).

В целом, анализируя полученные данные, необходимо отметить, что развитие реакции на введение изопропилнорадреналина у интактных животных характеризуется двумя фазами — быстрым (в течение одной-трех минут) увеличением ЧСС и ее медленной стабилизацией с последующим снижением до окончания наблюдения. Как правило, у здоровых животных значения ЧСС, наблюдаемые к окончанию эксперимента, несколько выше базовых. Иная тенденция прослеживается у животных с моделью инфаркта миокарда. У них конечные значения ЧСС ниже базовых, что, по нашему мнению, связано с нестабильной деятельностью сердца.

Использование эмбриональной культуры клеток крыс для коррекции инфаркта миокарда в наших исследованиях не способствовало нормализации ответа сердца на стресс. Процессы, наблюдавшиеся у животных с моделью инфаркта, у этой группы более выражены — отмечено дальнейшее снижение реакции сердца на стресс и еще более раннее истощение, проявляющееся в снижении ЧСС значительно ниже исходных. Наши данные подтверждают работы авторов, показавших, что при трансплантации эмбриональная культура клеток вызывает различные виды аритмий, а также способна инициировать рост нетипичной для данного органа ткани (костной и хрящеподобной).

В наших исследованиях использование мезенхимальных стволовых клеток способствовало восстановлению реакции сердца на стресс, проявлявшееся в нормализации как хронотропного ответа на введение изопропилнорадреналина, так и времени стабилизации этого показателя. Трансплантация МСК приводит к значительному улучшению васкуляризации в зоне инфаркта, что способствует уменьшению ишемии в пограничных с инфарктом зонах, снижению ишемического повреждения кардиомиоцитов в этих зонах, что в итоге уменьшает площади рубца и предотвращает формирование аневризмы сердца. Доказано, что трансплантированные клетки активно участвуют в формировании сосудов и соединительной ткани в зоне рубцевания.

Удельное количества сосудов на единицу объема приблизительно в 6 раз больше у животных после трансплантации.

Выводы

В результате проделанной работы мы видим, что трансплантация мезенхимальных стволовых клеток изогенных доноров, полученных из костного мозга взрослых животных, позволяет улучшить функциональные и морфологические показатели поврежденного миокарда. Использование эмбриональной культуры клеток связано с рядом негативных сторон, в частности, в 15% случаев возникли различного вида аритмии, в 5% случаев в области инфаркта миокарда появились очаги хрящевидной и костноподобной тканей. Таким образом, применение МСК при инфаркте миокарда может быть рекомендовано к использованию в клинических условиях, применение эмбриональной культуры клеток в целях клеточной кардиомиопластики требует дальнейших экспериментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cell* transplantation presrves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor / S. Fazel, R. Chen, R.D. Wiesel [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2005. — Vol. 130, №5. — P. 1310—1315.

2. *Fukuda K.* Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells / K. Fukuda // Congenital Anomalies. — 2002. — Vol. 42. — №1. — P.1—9.

3. *Engineering* mesenchymal stem cells for immunotherapy / C. Jorgensen, F. Djouad, F. Apparailly, D. Noel // Gene Ther. — 2003. — № 10. — P. 928—931.

4. *In* vivo cardiovasculogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells / S. Gojo, N. Gojo, Y. Takeda [et al.] // Exp. Cell. Res. — 2003. — Vol. 288. — P. 51—59.

5. *Intracardiac* fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibrodlasts in myocardial infarct repair / T. Yano, T. Miura, Y. Ikeda [et al.] // Cardiovasc. Pathol. — 2005. — Vol.14. — P. 241—246.

6. *Kan I.* Integral ttherapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells / I. Kan, E. Melamed, E. Offen // Curr. Drug. Targ. — 2005. — N6. — P. 31—41.

7. *Marrow* stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages / J.S. Wang, D. Shum-Tim, J. Galipeau [et al.] // J. Thorac. Cardiovascular. Surg. — 2000. — Vol. 120. — P.999—1006.

8. *Mesenchymal* progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enchance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model / S. Davani, A. Marandin, N. Mersin [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 108. — P. 253—258.

9. *Recruitment* of stem cells from bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand / B. Heissig, K. Hattori, S. Dias [et al.] // Cell. — 2002. — Vol. 109. — P. 625—637.

10. *Transformation* of the adult human mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells in vivo / S. Rangappa, V.G. Reddy, A. Bongso [et al.] // Cardiovasc. Engineering. Int. J. — 2002. — Vol. 2. — P. 7—14.

ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СКОРОЧУВАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ СЕРЦЯ ПІСЛЯ РІЗНИХ ВАРІАНТІВ КЛІТИННОЇ КАРДІОМІОПЛАСТИКИ ПРИ ІНФАРКТІ МІОКАРДА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

В. Ю. Михайліченко

Резюме. У статті проаналізована скорочувальна функція серця у щурів з інфарктом міокарда після різних видів кардіоміопластики. Стрес-імітуюче навантаження ізопропілнорадреналіном виявлялося в позитивному хронотропному ефекті у всіх груп тварин. Трансплантація мезенхімальних стовбурних клітин сприяла відновленню реакції серця на стрес, що виявилося в нормалізації як хронотропної відповіді на введення ізопропілнорадреналіна, так і часу стабілізації цього показника. Уведення ембріональних клітин не приводило до нормалізації хронотропної функції серця.

Ключові слова: *інфаркт міокарда, клітинна кардіоміопластика, скорочувальна функція.*

ELECTROPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF HEART AFTER DIFFERENT VARIANTS OF CELL FUNCTION CARDIOMYOPLASTIC AT A MYOCARDIAL INFARCTION IN EXPERIMENT

V. Yu. Mikhailichenko

Summary. In paper the function of rats hear with a myocardial infarction, after different sorts cardiomyoplastic is parsed cutting. A stress — imitating load isopropilnoradrenaliny appeared in positive chronotropic effect for all groups animal. The transplantation mesenchymal stem cells promoted restoring of response heart on a stress appearing in normalization as of the chronotropic answer to introduction isopropilnoradrenaliny, and settling time of this metric. The introduction embryonic cells is not conjugated in our researches with normalization of the chronotropic function heart.

Key words: *myocardial infarction, cell cardiomyoplastic, contractile function.*