

УДК 616.127-005.8-089.844

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА У КРЫС И ХРОНОТРОПНОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА НА ФОНЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Самарин С.А.

ФГАОУ ВПО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» Министерства образования и науки РФ, Симферополь, e-mail: samarinmd@gmail.com

Исследование посвящено решению актуальной научной проблемы – обоснованию эффективности изогенной клеточной кардиомиопластики при инфаркте миокарда в эксперименте. Некоторые исследования последних лет доказывают эффективность применения стволовых клеток и их положительное влияние на комплекс адаптационных механизмов. Нами выполнялось экспериментальное моделирование обширного инфаркта миокарда у крыс самок линии Wistar-Kayoto, после чего проводилась кардиомиопластика путем внутривенной инфузии ММСК. Результаты оценивали по данным ЭКГ и контролю хронотропных показателей как в покое, так и при выполнении стресс нагрузки изопропилнорадреналином. Введение мезенхимальных стволовых клеток способствовало восстановлению реакции сердца на стресс, проявлявшееся в нормализации как хронотропного ответа, на введение изопропилнорадреналина, так и времени стабилизации этого показателя.

Ключевые слова: стволовые клетки, инфаркт миокарда, хронотропная функция

EXPERIMENTAL STUDY MYOCARDIAL INFARCTION AND CHRONOTROPIC CARDIAC FUNCTION WITH TREATMENT OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS

Samarin S.A.

Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Simferopol, e-mail: samarinmd@gmail.com

The research is devoted to solving one of the actual scientific problems – the experimental justification of the effectiveness of isogenic cell cardiomyoplasty in myocardial infarction. Some recent studies have proven the efficacy of stem cells and their positive impact on the set of adaptive mechanisms. We have performed extensive experimental simulation of myocardial infarction in female Wistar-Kayoto rats, then cardiomyoplasty was performed by intravenous infusion of MSCs. The results were evaluated according to ECG monitoring and chronotropic indicators both during rest and Isopropilnoradrenalin Stress load. Transplantation of mesenchymal stem cells contributed to the recovery of the reaction of the heart to stress, led to normalization of chronotropic response to the introduction of isopropilnoradrenalin and stabilization time for this indicator. The provided data conforms with the latest tested methods and practices described in scientific literature worldwide that can be recommended for the use of this type of cellular cardiomyoplasty in the future clinic research.

Keywords: myocardial infarction, transplantation, multipotent mesenchymal stem cells

Направление использования стволовых клеток в кардиологии интенсивно разрабатывается в последние 5-10 лет благодаря тому, что в 1999 году появились работы, в которых описывается культивирование кардиомиоцитов (КМЦ) из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК) [8,9]. В результате экспериментальных работ было доказано, что МСК костного мозга человека обладают способностью усиливать перфузию ишемизированных участков миокарда. Однако является ли этот эффект прямым действием МСК или опосредованным, через продукцию цитокинов и ростовых факторов – остается спорным.

Концепция регенеративной медицины, базирующаяся на использовании собственных стволовых клеток для восстановления поврежденных тканей, сосудов и органов, в последние годы широко внедряется

в практическую медицину [1]. Клеточная терапия на основе стволовых клеток (СК) является одним из наиболее перспективных и инновационных направлений развития медицины и уже сегодня позволяет получить качественно новые клинические результаты в различных областях [2,6].

Стремление восполнить недостаток сократительных элементов в поврежденном миокарде кажется очевидным направлением лечения сердечной недостаточности. Неудивительно, что первые исследования возможностей клеточной терапии были посвящены трансплантации в миокард клеток, способных к сокращению: кардиомиоцитов, скелетных миофибрилл, гладкомышечных клеток [7]. В дальнейшем произошел эволюционный пересмотр используемых культур клеток при сердечной патологии и был введен термин «клеточная кардиомио-

пластика» призванный изменить процессы структурно-функциональной перестройки миокарда (ремоделирование сердца) и в конечном счете улучшить его функцию [3].

Одним из наиболее обсуждаемых направлений клеточной кардиомиопластики сегодня является пересадка собственных стволовых клеток костного мозга. Будучи мультипотентными, постнатальные СК составляют существенный восстановительный резерв в организме и способствуют замедлению развития дефектов, возникающих в силу тех или иных обстоятельств. За счет неоваскулогенеза, уменьшения площади рубца, повышения фракции выброса и формирования резистивности к стресс-нагрузке в эксперименте, было решено улучшить сократительную способность сердца при остром инфаркте миокарда путем трансплантации клеточных культур изогенных доноров.

Цель исследования. Изучить хронотропную функцию сердца при экспериментальном инфаркте миокарда, а так же динамику ЧСС на проведение стресс-теста изопропилнорадреналином после терапевтической кардиомиопластики мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками.

Материалы и методы исследования

В эксперименте использовались самки крыс линии Вистар-Кайото в количестве 90 особей, которые были разделены на 3 группы и 7 самцов: I группа – контрольная – интактные животные которым не проводилось каких-либо манипуляций ($n=30$); II группа – животные, которым моделировался ИМ, но никакого терапевтического воздействия не проводилось ($n=30$); III – животные, которым на фоне ИМ выполняли трансплантацию ММСК ($n=30$); Кроме этого 7 здоровых крыс самцов были донорами стволовых клеток. Выполняли изогенную трансплантацию клеток у инбредных животных характеризующихся высокой степенью гомозиготности по большинству генов, что в определенной степени нивелировало отторжение клеточного трансплантата и приближало эксперимент к условиям ауто трансплантации, как наиболее перспективного метода в клинической практике. для получения культуры мезенхимальных стволовых клеток мы использовали костный мозг здоровых животных крыс-самцов, для того чтобы потом по реакции гибридизации с Y-хромосомой идентифицировать трансплантат в организме реципиента. Клеточную кардиомиопластику осуществляли непосредственно после моделирования ИМ. Выделяли бедренную вену, пунктировали и вводили трансплантат. После выполнения манипуляции иглу извлекали из просвета бедренной вены, кровотечение останавливали путем прижатия выходного отверстия в течении 2 минут.

Всем животным входящих в исследования моделировали ИМ по классической методике [4,5]. Оперативные вмешательства проводили в условиях общего обезболивания, путем интраперитонеально-

го введения калипсола и ксилазина в дозах 60 мг/кг и 7,5 мг/кг соответственно. Выполняли левостороннюю торакотомию в 5 межреберье, продольно вскрывали перикард. Инфаркт моделировали путем прошивания передней левожелудочковой артерии на уроне нижнего ушка левого предсердия, после первого деления, нитью Prolene 7/0 (фирмы Ethicon, Inc.).

Исследование электрической активности миокарда крысы и показателей ЧСС производилось в условиях медикаментозного сна, животных фиксировали в положении на спине. Выполняли электрокардиографию в стандартном I отведении с помощью ЭКГ аппарата ЭК01Т. Импульс 1 мВ, амплитуда 20 мм, скорость протяжки ленты 50 мм/с. Стресс нагрузку моделировали внутримышечным введением изопропилнорадреналина в дозе 3 мкг/кг, после чего регистрировали ЧСС каждые 3 минуты на протяжении последующего четверти часа. Таким образом у нас был 5 контрольных точек изучения реакции сердца на стресс-имитирующие условия.

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.

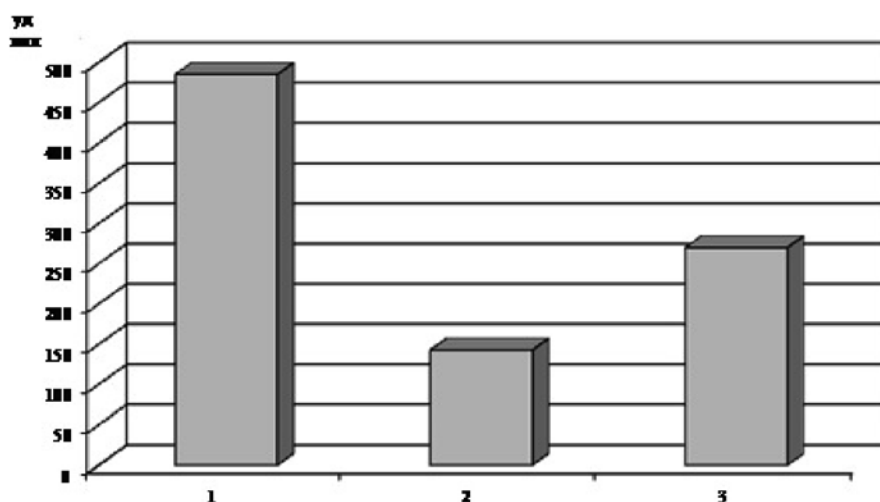
Эксперимент на животных и клиническая часть выполнялись при строгом соблюдении международных правил биоэтики, предложенных международными организациями и ассоциациями, протокол экспериментального и клинического исследования был одобрен локальным этическим комитетом (протокол № 2 от 06.06.2014г.). Он соответствует Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2010 г. просмотра.

Статистическую обработку выполняли с помощью пакета программ Statistica 6.0 фирмы StatSoft (USA).

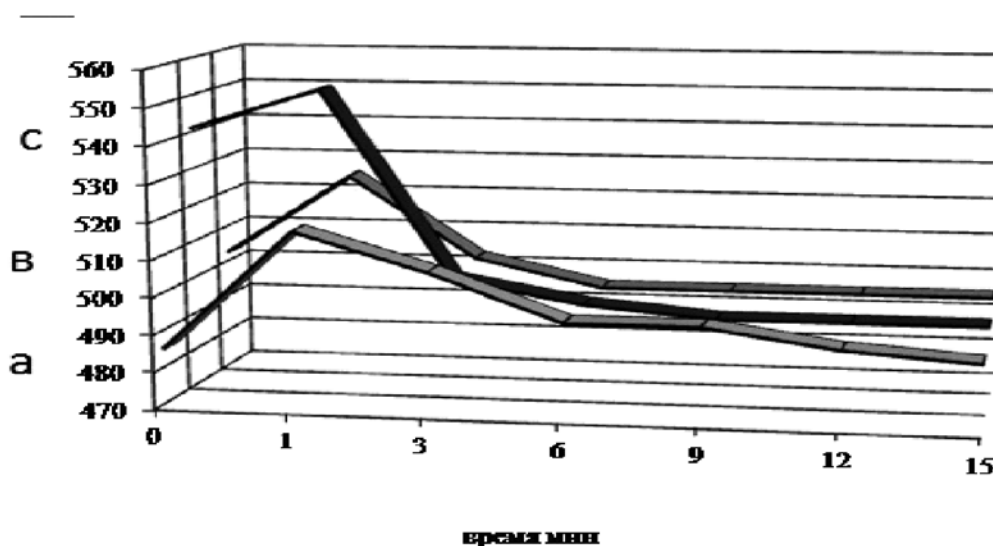
Результаты исследования и их обсуждение

У интактных животных ЧСС в стандартных условиях составляла 485 ± 43 уд/мин. При моделировании поражения миокарда этот показатель снижался до $142,5 \pm 78,9$ уд/мин. А уже через два часа соответствовал $270 \pm 100,25$ уд/мин (рис. 1.). Через неделю, у группы животных с ИМ аналогичный показатель деятельности сердечно – сосудистой системы был значительно выше – 541 ± 19 уд/мин. Тогда как исследования базового уровня ЧСС через две недели статистически достоверных ($p < 0,05$) различий с показателями интактных животных не выявили – 503 ± 23 уд/мин (рис. 2.).

В наших исследованиях, экспериментальный ИМ был сопряжен с выраженным снижением сократительной функции сердца. Тенденция к восстановлению, впрочем, наметилась уже в первые часы после указанной операции, что позволяет предположить наличие мощных компенсаторных механизмов, как в самом миокарде, так и в сердечно – сосудистой системе в целом. Это положение подтверждается, на наш взгляд, реакцией сердца на стрессовую нагрузку.



*Рис. 1. Изменения частоты сердечных сокращений у животных при моделировании инфаркта миокарда:
 1 – частота сердечных сокращений у животных до моделирования инфаркта миокарда;
 2 – частота сердечных сокращений у животных при моделировании инфаркта миокарда;
 3 – частота сердечных сокращений у животных через два часа после моделирования инфаркта миокарда*



*Рис. 2. Динамика изменений частоты сердечных сокращений у экспериментальных животных при моделировании стрессовой нагрузки:
 А – intactные животные; В – животные через 14 дней после моделирования инфаркта миокарда; С – животные через 7 дней после моделирования инфаркта миокарда*

В начале наблюдений, до введения изо-пропилнорадреналина, на 14 день эксперимента, базовые значения ЧСС существенно различались у всех групп животных. Так в первой группе этот показатель составил 485 ± 43 уд/мин. У крыс после моделирования инфаркта миокарда отмечались более высокие значения – 503 ± 23 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 крыс максимальные значения ЧСС составили 517 ± 35 уд/мин ($p \leq 0,05$). У крыс после моделирования инфаркта миокарда отмечались более высокие значения – 525 ± 15 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 ($p \leq 0,05$). К окончанию наблюдения (после 15 минут) у всех групп животных отмечалось снижение ЧСС, при этом его выраженность была различна. Так, у интактных крыс величина ЧСС составила 490 ± 23 уд/мин ($p \leq 0,05$). У крыс после моделирования инфаркта миокарда значения оставались более высокими – 495 ± 15 уд/мин ($p \geq 0,05$). У животных после введения 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 течении одной – трех минут, увеличением ЧСС и её 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.

Выводы

В наших исследованиях, использование мезенхимальных стволовых клеток способствовало восстановлению реакции сердца на стресс, проявлявшееся в нормализации как хронотропного ответа на введение изо-пропилнорадреналина, так и времени стабилизации этого показателя. Данный факт подтверждает теорию о регенераторных способностях миокарда и стимуляции неоваскулогенеза за счет непосредственного участия МСК в ангиогенезе, а также паракринного эффекта, что существенно улучшает адаптационные способности сердца в постинфарктном периоде.

Список литературы

1. Бутенко Г.М., Кирик В.М. Регенеративная медицина и стволовые клетки – проблемы и решения // Журнал НАМН Украины. – 2011. – Т.17. – №1. – С.62-66.
2. Гринь В.К., Шгутин А.А., Михайличенко В.Ю. и др. Применение аутологических мезенхимальных стволовых клеток в кардиологии и травматологии // Журнал НАМН Украины. – 2011. – Т.17. – №1. – С.67-75.
3. Марков В.А., Рябов В.В., Сулова Т.Е. и др. Клеточная кардиомиопластика: состояние вопроса и результаты собственного исследования // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – №4. – С.174-182.
4. 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.
5. Применение аутологических мезенхимальных стволовых клеток в кардиологии и травматологии / В.К. Гринь, А.А. Шгутин, В.Ю. Михайличенко, А.Г. Попандуполо, 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.
6. Щепотин И.Б. Стволовые клетки: достижения, проблемы, перспективы // Журнал НАМН Украины. – 2011. – Т.17. – №1. – С.54-61.
7. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. Биологические резервы костного мозга и коррекция органических дисфункций. – монография, Москва, 2009, 308с.
8. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., Hata J.I., Umezawa A., Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro // J. Clin. Invest. – 1999. – Vol.103. – P.697-705.
9. Intissar N. Waheed, Intidhar M. Mnati, Abdul Hussain H. Kadhim In vitro study of adult bone marrow mesenchymal stem cells derived from albino rats and their cardiomyogenic differentiation // Jordan journal of biological sciences. – 2010. – Vol.3. – N4. – P.185-192.