

УДК 616.127-005.8-003.93:576.3/7.086.83

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ (МСК)
НА ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ИНФАРКТЕ МИОКАРДА**

Михайличенко В.Ю., Самарин С.А.

*ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского»,
Симферополь, e-mail: pancreas1978@mail.ru*

В экспериментальной работе проведенной на 42 взрослых крысах, продемонстрировано, что аутологичные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), используемые при остром экспериментальном инфаркте миокарда, выступают в роли индукторов процессов регенерации при ремоделировании поврежденного миокарда. Степень данного повреждения оценивали по активности кардиоспецифических ферментов креатининкиназы (МВ-КК) и АСТ. На основании изучения биохимических маркеров доказано, что кардиомиопластика МСК вызывает положительный метаболический эффект, что сопровождается снижением активности ферментов АДА, ЛДГ в поврежденном миокарде, а также значительным уменьшением уровня МВ-КК при практически отсутствующем эффекте на показатели АСТ. Это косвенно свидетельствует о повышении энергетического баланса энергообразующих субстратов и снижении степени ишемии миокарда. Напряжение неферментативного звена антиоксидантной защиты и снижение накопления продуктов ПОЛ и является хорошим прогностическим критерием восстановления функциональной активности поврежденного миокарда.

Ключевые слова: клеточная кардиомиопластика, инфаркт миокарда, эксперимент, биохимические маркеры

**IMPACT ASSESSMENT OF CELL CARDIOMYOPLASTY BY MESENCHYMAL
SREM CELLS (MSCS) ON INDICES OF CARDIOMYOCYTES METABOLIC
ACTIVITY IN EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION**

Mikhaylichenko V.Y., Samarin S.A.

*Crimea State Medical University named after S.I. Georgievskiy,
Simferopol, e-mail: pancreas1978@mail.ru*

The article is devoted to the solving of an actual scientific problem which is the justification of the effectiveness of isogenic cell cardiomyoplasty in myocardial infarction during the experiment. Experimental research was carried out on animals of Wistar-Kayota inbred. The total study included 42 animals (14 rats each, respectively), which formed 3 equal in the number of animals groups. In our studies, we have demonstrated the basic pathophysiological mechanisms of myocardial infarction in rats, such changes as decreasing of lactate dehydrogenase, erythrocyte adenosine desaminase and Creatine kinase-MB after using of common MSC's. The myocardial infarction was caused by coronary artery ligation with subsequent application of various kinds of cardiomyoplasty. Further on, according to biochemical research, we studied the dynamics of markers of myocardial damage, lactate metabolism, lipid peroxidation. The common MSC's proved effective in our experiment. Our data are consistent with the world literature that can be recommended to refrain the use of this type of cellular cardiomyoplasty in the future clinic research.

Keywords: ischemic heart disease, cell cardiomyoplasty, myocardial infarction, experiment, biochemical Markers

Ишемическая болезнь сердца является лидирующей причиной смертности в развитых странах. Постоянный интерес к изучению данного вопроса вызван необходимостью улучшения качества оказания медицинских услуг для повышения эффективности лечения данной категории больных. 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, 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 (тромболитис, баллонная ангиопластика, коронарное шунтирование), все они направлены на ограничение размеров некроза, а не на непосредственное улучшение функции миокарда, что, в свою очередь, будет уменьшать проявления сердечной недостаточности и ее осложнений, а также электрическую нестабильность сердца, улучшая качество

жизни больных и уменьшая смертность [7, 8, 9, 10]. Применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) открывает новые возможности по стимуляции неоваскулогенеза путем улучшения показателей эндотелиальной дисфункции, неизбежно возникающей при остром инфаркте миокарда (ИМ). Оценка потенциальных возможностей применения стволовых клеток путем исследования показателей метаболической активности кардиомиоцитов вызывает большой интерес. Ранней диагностике ИМ помогает исследование кардиоспецифических биохимических маркеров, которые позволяют разграничить острый коронарный синдром с некрозом – инфаркт миокарда и без некроза – нестабильная стенокардия. При ИМ в результате гибели клеток сердечной мышцы в кровеносное русло попадают содержащиеся в них ферменты и белки. По их наличию, времени появления и концентрации в плазме крови можно оценить ущерб, нанесенный сердцу, и своевременно избрать правильную тактику лечения. Фермент креатинфосфокиназа (КФК) обратимо переносит фосфатную группу с креатинфосфата, эндогенной резервной формы макроэргических фосфатов, на АДФ, образуя таким образом АТФ. Поскольку креатинфосфокиназа содержится в сердце, скелетных мышцах, мозге и многих других органах, ее концентрация в сыворотке может повышаться после повреждения любой из этих тканей. Золотым стандартом ферментной диагностики ИМ является оценка динамики изофермента КФК-МВ в сыворотке крови, который отображает именно результат повреждения сердечной мышцы. Так же для экспериментального исследования интересен анализ определения активности аденозиндезаминазы эритроцитов (АДА), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ).

Цель исследования – провести оценку эффективности применения системного введения трансплантата мезенхимальных стволовых клеток на показатели метаболической активности кардиомиоцитов при экспериментальном инфаркте миокарда.

Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование выполняли на 42 крысах-самках инбредной линии Вистар – Кайота. Это было связано с тем, что использовалась аллогенная трансплантация клеток, а инбредные животные характеризуются высокой степенью гомозиготности по большинству генов, что в определенной степени нивелирует отторжение клеточного трансплантата и приближает к условиям ауто трансплантации как наиболее перспективного метода в клинической практике. Помимо прочего моделирование ИМ мы выполняли на самках, а использовали для трансплантации культуру МСК самцов, чтобы в дальнейшем по Y-хромосоме верифицировать трансплантируемые клетки в организме реципиента. Было выделено 3 группы животных (14 крыс в каждой группе). 1 – группа контроля (здоровые животные), 2 – группа с экспериментальным ИМ, не получавшая специфического лечения, и 3 – группа с экспериментальным ИМ, получавшая внутривенное введение клеточной культуры МСК.

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.) (рисунок). 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 ушивали мышцы на трахее. Во время выполнения оперативного вмешательства выполняли мониторинг сердечной деятельности аппаратом для холтеровского исследования Getemed HL5 (Германия).



Прошивание передней межжелудочковой артерии

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 антибиотики. Костный мозг трубчатых костей крыс обрабатывали механически и ферментативно. Затем помещали в термостат при 37°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 1,5–2,0·10⁶ кл/мл помещали в культуральный флакон и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C с 5% содержанием CO₂ 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 Mg²⁺ и Ca²⁺ (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.

Активность АДА определяли по убыли аденозина в инкубационной среде, которую регистрировали спектрофотометрически при λ = 265 нм. Измерения проводили на спектрофотометре Genesys 10UV фирмы Thermo Spectronic (США); Активность фермента рассчитывали по формуле ([А] = нмоль/мин·л):

Определение активности ферментов аспаратаминотрансферазы (АСТ), МВ-фракции креатинкиназы (МВ-КК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) плазмы крови и белков плазмы гаптоглобина и церулоплазмينا определяли на приборе Cobas Integra 400 + с использованием стандартных оригинальных наборов фирмы Roche-Diagnostics (Швейцария).

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась на компьютере Pentium V при помощи лицензионного пакета статистических программ Excel (Microsoft office XP) и Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Степень повреждения миокарда при ИМ оценивали по активности кардиоспецифических ферментов креатининкиназы (МВ-КК) и АСТ (таблица). Так, при моделировании ИМ уже через сутки возникает значительное повышение МВ-КК с 5125 ± 123 до 7700 ± 140 Е/л (при $t = 13,8$; $p < 0,001$), что свидетельствует об крупноочаговом ИМ у крыс. Существует различие в данных этого показателя между группами ИМ и ИМ + трансплантация МСК, в группе с трансплантацией МСК уровень МВ-КК равняется 5855,5 ± 129 Е/л, что значительно меньше, чем при ИМ у нелеченных животных (при $t = 9,7$; $p < 0,001$) и не отличается от показателей здоровых животных (при $t = 0,62$; $p > 0,05$). Менее специфическим для объема ИМ оказался показатель АСТ, так в группе с ИМ она повысилась с 150 ± 22 до 273 ± 15 Е/л (при $t = 4,6$; $p < 0,001$). В группе с трансплантацией МСК данный показатель равнялся 262 ± 28 Е/л, что не отличалось от группы с ИМ (при $t = 0,35$; $p > 0,05$) и было значительно выше, чем в норме (при $t = 3,1$; $p < 0,01$).

Таким образом, можно сделать выводы, что при обширном ИМ происходит повышение МВ-КК и АСТ, но по чувствительности относительно размеров некроза МВ-КК является более прогностическим, чем АСТ, которая только подтверждает наличие ИМ.

Об уровне кислородного снабжения кардиомиоцитов судили по активности ферментов АДА эритроцитов и ЛДГ плазмы крови. Защитные эффекты аденозина при ишемии показаны в многочисленных работах. Установлено, что АДА играет важную роль при гипоксическом типе метаболизма. Гораздо меньше информации об изменении активности АДА в эритроцитах. Так, при ИМ не установлено достоверных различий активности АДА между группами здоровых животных и крыс с ИМ, 102 ± 32 и 170 ± 48 нмоль/мин·л соответственно при $t = 1,17$; $p > 0,05$. Также не наблюдалась разница в группах ИМ и ИМ + трансплантация МСК – 83 ± 31 нмоль/мин·л при $t = 1,5$; $p > 0,05$.

Условия эксперимента	Активность ферментов			
	МВ-КК, Е/л	АСТ, Е/л	АДА, нмоль/мин·л	ЛДГ, Е/л
Контроль $n = 14$	5125 ± 123	150 ± 22	102 ± 32	780 ± 101
ИМ $n = 14$	7700 ± 140*	273 ± 15*	170 ± 48	1071 ± 215*
ИМ + МСК $n = 14$	5855,5 ± 129 [€]	262 ± 28	83 ± 31	671 ± 150 [€]

Примечания:

1. Различие между нормой и группой с ИМ достоверно ($p < 0,05$) – *.
2. Различие между группами ИМ и ИМ с трансплантацией МСК достоверно ($p < 0,05$) – €.
3. Различие между группами норма и ИМ + МСК достоверно ($p < 0,05$) – £.

Значения ЛДГ в группе с ИМ значительно выше, чем в группе здоровых животных, 1071 ± 215 и 780 ± 101 Е/л соответственно (при $t = 1,97$; $p < 0,05$). В группе с трансплантацией МСК он равнялся 671 ± 150 Е/л, что не отличалось от нормальных показателей (при $t = 0,6$; $p > 0,05$) и было гораздо ниже, чем в группе животных с ИМ (при $t = 2,1$; $p < 0,05$).

Снижение активности ЛДГ косвенно свидетельствует об увеличении оксигенации миокарда и активации аэробных путей окисления энергодающих субстратов.

Вовлеченный в катаболизм пуриновых нуклеозидов фермент АДА локализован в цитоплазме клеток всех тканей и катализирует дезаминирование аденозина и превращение его в инозин, а дезоксиаденозина – в дезоксиаденозин. Увеличение скорости дезаминирования аденозина препятствует аденозинкиназной реакции, что усугубляет энергодефицит. Накопление гипоксантина, в который превращается аденозин после дезаминирования, усиливает реакции свободнорадикального окисления при участии ксантиноксидазы.

Стимуляция аденозином постсинаптических А1-аденозиновых рецепторов, локализованных в пуринергических синапсах, расположенных на клеточных мембранах сократительных кардиомиоцитов предсердий и желудочков сердца, вызывает уменьшение содержания в них цАМФ и, следовательно, понижение сократимости сердечной мышцы, т.е. реализуется отрицательное инотропное действие аденозина. Помимо специфического действия на А1-аденозиновые рецепторы аденозин уменьшает активирующее действие на сердце катехоламинов. Источником аденозина эритроцитов является катаболизм АМФ. Можно предположить, что торможение некомпенсированного распада АТФ в эритроцитах уменьшает уровень субстрата для АДА. Снижение активности фермента после трансплантации МСК сохраняет пул аденозина и является хорошим прогностическим признаком.

Закключение

Таким образом, кардиомиопластика МСК вызывает положительный метаболический эффект, что сопровождается снижением активности ферментов АДА, ЛДГ в поврежденном миокарде, а также значительным уменьшением уровня МВ-КК при практически отсутствующем эффекте на показатели АСТ. Это косвенно свидетельствует о повышении энергетического баланса энергообразующих субстратов и снижении степени ишемии миокарда. Напряжение неферментативного звена антиоксидантной защиты и снижение накопления продуктов ПОЛ и является хорошим прогностическим критерием восстановления функциональной активности. Морфологическая адаптация миокарда после клеточной кардиомиопластики МСК позволя-

ет ее рекомендовать к дальнейшему изучению в клинических условиях.

Список литературы

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 // 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. Оксимер, 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., Суслова Т.Е. и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 4. – С. 5–15.
5. Cell therapy to repair broken hearts / Li R.K., Yau T.M., Sakai T. et al. // Can. J. Cardiol. – 1998. – № 14. – 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. – № 5. – P. 861–872.
7. Lincoff A.M. Illusion of reperfusion. Does anyone achieve optimal reperfusion during acute myocardial infarction? / A.M. Lincoff, E.J. Topol // Circulation. – 1993. – Vol. 88. – P. 1361–1374.
8. 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.
9. Strategies for myocardial repair / Koh G.Y., Soonpa M.H., Klug M.G. et al. // J. Interv. Cardiol. – 1995. – № 8. – P. 387–393.
10. Topol E.J. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition: the GUSTO randomized trial // Lancet. – 2001. – Vol. 357. – P. 1905–1914.

References

1. Maslov L.N., Rjabov V.V., Sazonova S.I. *Uspehi fiziologicheskikh nauk*, 2004, no. 3, pp. 50–60.
2. Mihajlichenko V.Ju. *Vestnik neotlozhnoj i vosstanovitel'noj mediciny*, 2011, tom 12, no. 2, pp. 216–223.
3. Grin V.K., Shtutin A.A., Mihajlichenko V.Ju., Popandopulo A.G., Jestrin S.I., Denisova E.M., Oksimer V.M., Kravchenko T.V., Klimovickij V.G. *Zhurnal NAMN Ukrainy*, 2011, tom. 17, no. 1, pp. 67–75.
4. Popov S.V., Rjabov V.V., Suslova T.E. i dr. *Bjulleten' SO RAMN*, 2008, no. 4, pp. 5–15.
5. Cell therapy to repair broken hearts / Li R.K., Yau T.M., Sakai T. et al. // Can. J. Cardiol. 1998, no. 14, pp. 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, no. 5, pp. 861–872.
7. Lincoff A.M. Illusion of reperfusion. Does anyone achieve optimal reperfusion during acute myocardial infarction? / A.M. Lincoff, E.J. Topol // Circulation. 1993, Vol. 88, pp. 1361–1374.
8. Lange R.A. Reperfusion Therapy in acute myocardial infarction / R.A. Lange, L.D. Hillis // N. Eng. J. Med. 2003, Vol. 346, pp. 954–955.
9. Strategies for myocardial repair / Koh G.Y., Soonpa M.H., Klug M.G. et al. // J. Interv. Cardiol. 1995, no. 8, pp. 387–393.
10. Topol E.J. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition: the GUSTO randomized trial // Lancet. 2001, Vol. 357, pp. 1905–1914.

Рецензенты:

Кубышкин А.В., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки и техники АРК, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии, ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», г. Симферополь;

Шаповалова Е.Ю., д.м.н., профессор заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии, ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», г. Симферополь.