

ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ КРОВІ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНУ МОДЕЛЬ ПРИ ХРОНІЧНИХ УРАЖЕННЯХ МІОКАРДА

Поляченко Ю.В., Габрієлян А.В., Доманський Т.М., Смержевський В.Й., Оніщенко В.Ф.,
Мазур А.П., Романова С.В., Кудлай І.В., Якушев А.В., Клименко П.П.¹, Цупиков О.М.²,
Кучук О.В.¹, Кирик В.М.¹

ДУ “Національний інститут хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова НАМН” (Київ)

¹ *ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН” (Київ)*

² *Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАМН” (Київ)*

У статті викладено результати експериментальних досліджень, у яких встановлено, що трансплантація стовбурових клітин пуповинної крові (СК ПК) суттєво активізує процеси природної регенерації при ізопротеринол-індукованому ураженні міокарда. В ході роботи оцінено зміни локалізації трансплантованих СК в зоні ураження та продемонстрована здатність СК ПК при трансплантації внутрішньовенним введенням мігрувати в зону ушкодження. Отримані експериментальні дані потребують комплексного аналізу та дозволяють очікувати на позитивний ефект при клінічних випробуваннях у пацієнтів із хронічними захворюваннями серця.

Ключові слова: *стовбурові клітини пуповинної крові, ізопротеринол-індуковане ураження міокарда, хронічні захворювання серця, трансплантація.*

На сьогодні причинами смертності майже 40% дорослого населення країн Європи є серцево-судинні захворювання. В Україні в структурі захворюваності та смертності населення провідне місце посідають хвороби системи кровообігу [1]. Незважаючи на існуючі досягнення, сучасні методи лікування в деяких випадках недостатньо ефективні. Саме тому пошук нових методів лікування, які сприяють покращенню стану здоров'я пацієнтів із захворюваннями серцево-судинної системи, мають велике практичне та соціальне значення.

Дослідження стовбурових клітин (СК) довели, що СК в ушкодженому міокарді викликають активну регенерацію та покращення функцій міокарда [2–7]. На сьогодні ще не достатньо вивчені механізми їх впливу на ушкоджений міокард. Потребують подальших досліджень питання ефективності терапії з застосуванням СК залежно від шляхів введення та типу СК [4, 8]. У зв'язку із цим нами були проведені експериментальні дослідження застосування СК пуповинної крові (ПК) на моделі ушкодження міокарда.

Метою роботи є оцінка ефектів трансплантації СК ПК у мишей при експериментальному моделюванні ушкодження міокарда.

Завдання: 1) вивчити локалізацію та динаміку кількості стовбурових клітин після їх трансплантації тварині з ураженим міокардом; 2) дослідити динаміку толерантності до фізичного навантаження та динаміку морфо-функціональних змін у моделі ураження міокарда; 3) вивчити вплив трансплантації СК ПК на темпи регенерації та відновлення уражених функцій.

Матеріали та методи. Дослідження застосування СК ПК проводилися на лабораторних мишах віком 6 місяців, з масою тіла 25–30 г. Експериментальне дослідження проводилось із дотриманням принципів біоетики та норм біологічної безпеки. Моделювання ураження міокарда здійснювали шляхом підшкірного введення розчину ізопротеренолу в дозі 100 мг/кг 5 днів поспіль. Групу спостереження (“Модель + СК ПК”) становили тварини, яким через 3 тижні після моделювання внутрішньовенно вводили суспензію, яка містила СК ПК

людини. Порівняння проводили з групою тварин (“Модель”), яким на 3 тижні після моделювання вводили розчин-носії СК ПК. Морфо-функціональні дослідження проводили на певних етапах: до моделювання ураження міокарда (контрольна група), на 4, 7 та 11 тижнях від моделювання (1, 4 та 8 тижнях після трансплантації СК ПК).

Морфологічні дослідження препаратів міокарда проводили під світлооптичним мікроскопом після забарвлення їх гематоксилін-еозином за стандартною методикою. ЕКГ реєстрували за допомогою електрокардіографа у стандартних відведеннях I, II, III, aVR, aVL, aVF. Для визначення динаміки змін толерантності до фізичного навантаження проводили модифікований тест примусового плавання (Порсолт, 1977). Для кількісної оцінки донорських СК у міокарді використовували методику проточної цитометрії на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США). Фенотипування клітин з міокарда миші для виявлення донорських клітин проводили імуногістохімічним методом з використанням первинних моноклональних антитіл до мембранних антигенів HLA людини та вторинних антитіл, мічених флуорохромом PerCP, згідно з рекомендаціями фірм-виробників. Для визначення локалізації СК у міокарді проводили флуоресцентну мікроскопію та дослідження у фазовому контрасті на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі Olympus FV 1000-BX61 Wi (Японія) за допомогою прикладного програмного забезпечення.

Результати та обговорення. Через 2 доби після трансплантації клітин ПК в міокарді тварин методом проточної цитометрії виявлено наявність донорських клітин у відносній кількості 0,0032 %. Через 4 тижні після трансплантації (7 тижнів після моделювання ураження) відносна кількість трансплантованих клітин людини в міокарді миші становила 0,0048%. Таким чином, достовірної різниці у динаміці змін кількості клітин в ураженому міокарді не встановлено. Натомість, зареєстровані зміни локалізації трансплантованих СК ПК. Через 2 доби після трансплантації переважна локалізація СК була у просвіті кровоносних капілярів міокарда. Крім того, вони локалізувалися у периваскулярному просторі і в зоні набряку інтерстицію міокарда. Така локалізація даних клітин може свідчити про початок міграції СК ПК з мікроциркуляторного русла у периваскулярний простір і інтерстицій ушкодженого міокарда. На 7 тижень спостереження (4 тижні після трансплантації) СК ПК спостерігалися в інтерстиційному просторі. При цьому вони щільно прилягали до плазматичної мембрани кардіоміоцитів (КМЦ). Ймовірна міграція, можливо, є проявом феномену самонаведення трансплантованих СК до зони ураження. Цей феномен було неодноразово описаний багатьма дослідниками. Таким чином, внутрішньовенне введення СК, з одного боку, є малоінвазивним втручанням, що не потребує травматичної операції, з іншого – забезпечує потрапляння трансплантованих СК ПК у зону ураження міокарда.

Для аналізу динаміки при морфологічному та електрофізіологічному дослідженнях прояв кожної ознаки, що реєстрували, умовно позначили балами (0 балів – ознака не виражена, 0,5 балів – поодинокі та слабо виражені ознаки, 1 бал – ознака виражена, 2 бали – значний прояв ознаки). При гістологічному дослідженні реєстрували: набряк ядер КМЦ; гетерохроматизацію ядер КМЦ; гіпертрофію ядер КМЦ; набряк цитоплазми КМЦ; розриви ланцюжків КМЦ; звивистість ланцюжків КМЦ; контрактири КМЦ; набряк периваскулярного простору; міграцію клітин (лімфоцити, фібробласти) до периваскулярного простору; повнокров'я капілярів; кровонаповнення артерій та венул; фіброз. На ЕКГ враховували: тахікардію; екстрасистолію; електричну альтернацію комплексу QRS; розширення комплексу QRS; розщеплення комплексу QRS; елевацію сегмента ST; депресію сегмента ST; негативний зубець T; зниження вольтажу зубців. Динаміку толерантності до фізичного навантаження визначали зміною тривалості загального часу плавання при навантажувальному тесті. Результати дослідження узагальнені в табл. 1.

Динаміка ознак ураження

	Група порівняння (Модель)				Група спостереження (Модель + СК ПК)			
	0	3,3	7	11	0	3,3	7	11
Етап спостереження після моделювання ураження (тижнів)	0	3,3	7	11	0	3,3	7	11
Термін після трансплантації СК ПК або введення середовища СК ПК (тижнів)	–	0,3	4	8	–	0,3	4	8
Сума балів морфологічних ознак ураження	0	13,0	12,0	6,5	0	13,5	10,0	2,5
Сума балів електрофізіологічних ознак ураження	0	11,0	6,5	4,5	0	7,5	2,5	2,5
Відсоток зниження загального часу плавання від вихідного стану	0	33,0	25,7	15,6	0	24,9	21,4	18,7

Як видно з таблиці, при природному перебігу моделі (в групі порівняння) після розвитку максимального ураження спостерігається природна регенерація. В піддослідній групі (Модель + СК ПК) трансплантація через 2 доби після операції призводить до більшого – порівняно з природним перебігом ураження – погіршення морфологічних ознак ураження та більшого зниження толерантності до фізичного навантаження. В подальшому, на 7 та 11 тижнях спостереження (4 та 8 тижнях після трансплантації), в групі “Модель+ СК ПК” спостерігається суттєве прискорення процесів регенерації морфо-функціональних порушень і прискорення відновлення зниженої толерантності до фізичного навантаження.

Таким чином, СК ПК, що були трансплантовані внутрішньовенним введенням, з часом змінюють локалізацію: в період 2 доби – 4 тижня після трансплантації спостерігається переміщення СК. Це переміщення, можливо, свідчить про хемотаксичний механізм руху СК ПК у зону ураження, та ймовірно може бути основою для трансплантації СК ПК згідно з методикою внутрішньовенного введення їх суспензії. Встановлено, що трансплантація СК ПК викликає тимчасове погіршення морфо-функціональних ознак, що, ймовірно, може бути проявом реакції організму на ксенотрансплантацію. Але, в подальшому, трансплантовані СК ПК, вірогідно, активують процеси природної регенерації, що приводить до більш швидкого відновлення у групі «Модель+СК ПК», ніж у групі порівняння (“Модель”). З огляду на несуттєву відносну кількість донорських СК у міокарді піддослідних тварин, найбільш вірогідним шляхом активації процесів регенерації є реалізація паракринного механізму.

Висновки

1. Проведене експериментальне дослідження на лабораторних тваринах ізопротеренол-індукованої моделі ураження міокарда продемонструвало, що трансплантація СК ПК прискорює процеси регенерації.
2. Внутрішньовенне введення суспензії СК ПК при моделі ушкодження міокарда було ефективним, що підтверджено позитивною динамікою при електрофізіологічних, морфологічних дослідженнях та функціональних тестах.
3. Отримані експериментальні результати можуть слугувати підґрунтям для проведення подальших клінічних випробувань у пацієнтів із хронічними захворюваннями серця.

Література

1. Горбась І.М. Ішемічна хвороба серця: епідеміологія і статистика // Здоров'я України. – 2009. – № 3/1. – С. 34–35.
2. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodelling and improves cardiac function // Nat Med. – 2001. – Vol. 7. – P. 430–436.
3. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Pিকে I.J., Mackay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // Nature. – 2001. – Vol. 410. – P. 701–705.
4. No consensus on stem cells // Nature. – 2004. – Vol. 428. – P. 587.
5. Fujii T., Yau T.M., Weisel R.D., Ohno N., Mickle D.A.G., Shiono N., Ozawa T., Matsubayashi K., Li R.-K. Cell transplantation to prevent heart failure: a comparison of cell types // Ann Thorac Surg. – 2003. – Vol. 76. – P. 2062–2070.
6. Moore K.A., Lemischka I.R. Stem cells and their niches // Science. – 2006. – Vol. 311. – P. 1880–1885.
7. Nygren J.M., Jovinge S., Breitbach M., Sawen P., Roll W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B.K., Jacobsen S.E.W. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation // Nat Med. – 2004. – Vol. 10. – P. 494–501.
8. Chien K.R. Stem cells: lost in translation // Nature. – 2004. – Vol. 428. – P. 607–608.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ МОДЕЛЬ ХРОНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА

Поляченко Ю.В., Габриэлян А.В., Доманский Т.Н., Смержевский В.И., Онищенко В.Ф., Мазур А.П., Романова С.В., Кудлай И.В., Якушев А.В., Клименко П.П., Цупиков О.М., Кучук О.В., Кирик В.М.

В статье изложены результаты экспериментальных исследований, в которых установлено, что трансплантация стволовых клеток пуповинной крови (СК ПК) существенно активизирует процессы естественной регенерации при изопроterenол-индуцированном поражении миокарда. В ходе работы оценены изменения локализации трансплантированных СК в зоне поражения и продемонстрирована способность СК ПК при трансплантации введением мигрировать в область повреждения. Полученные экспериментальные данные требуют комплексного анализа и позволяют надеяться на положительный эффект при клинических испытаниях у пациентов с хроническими заболеваниями сердца.

Ключевые слова: *стволовые клетки пуповинной крови, изопроterenол-индуцированное поражение миокарда, хронические заболевания сердца, трансплантация.*

EFFECT OF STEM CELL TRANSPLANTATION OF UMBILICAL CORD BLOOD IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC MYOCARDIAL INJURY

Polyachenko Y., Gabrielyan A., Domansky T., Smorzhevsky V., Onishchenko V., Mazur A., Romanova S., Kudlay I., Yakushev A., Klimenko P., Tsupikoff A., Kuchuk O., Kirik V.

The paper presents the results of experimental studies that found that transplantation of stem cells of umbilical cord blood (IC PC) significantly activated the process of natural regeneration in isoproterenol-induced myocardial injury. In the course of evaluations changes in the localization of transplanted SC in the affected area were described and ability of SC of UBC with intravenous transplantation to migrate to the area of damage. The experimental data require complex analysis and can expect a positive effect in clinical trials in patients with chronic heart diseases.

Key words: *stem cell of cord blood isoproterenol-induced myocardial injury, chronic heart disease, transplantation.*