

А. В. Габрієлян, Т. М. Доманський

Державна установа «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова» Національної академії медичних наук України
Київ, Україна

A. V. Gabrielyan, T. M. Domansky

State institution «A. A. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology», National Academy of Medical Science of Ukraine
Kyiv, Ukraine

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ПРИ ХРОНІЧНОМУ УРАЖЕННІ МІОКАРДУ

Experimental justification of the effectiveness of cord blood stem cell transplantation in chronic myocardial injury

Реферат

Мета роботи. Визначення ефективності трансплантації стовбурових клітин пуповинної крові (СК ПК) на uszkodження міокарду та оцінки відновлення його порушених функцій в експерименті.

Матеріали та методи. Експеримент проведено на самках мишей лінії FVB віком 5 місяців, з масою тіла 25–30 г. Тварин було розподілено на експериментальні групи по 5 тварини в кожній. Тварин груп дослідження впливу СК на природній перебіг моделі виводили з експерименту до введення препарату, через 2 доби, 4 та 8 тижнів після трансплантації клітин.

Результати. Аналіз морфофункціональних змін після введення клітин пуповинної крові через 4 та 8 тижнів в порівнянні з похідним станом (3 тижня, після моделювання ізопроterenол-індукованої моделі ураження міокарду) встановив чітку тенденцію до покращення досліджених параметрів. Підтверджений феномен самонаведення СК в зону ураження доводить доцільність трансплантації внутрішньовенним введенням суспензії СК ПК. Встановлено, що трансплантація СК ПК викликає тимчасове погіршення морфофункціональних ознак, що імовірно, може бути проявом реакції організму на ксенотрансплантацію. В цілому, трансплантація СК ПК має позитивний вплив на ізопроterenол-індуковану модель ураження міокарду.

Висновки: 1. Накопичення СК ПК в зоні ураження після трансплантації, доведено експериментальним дослідженням. 2. Трансплантація СК ПК прискорює процеси регенерації

Abstract

Purpose of the study. Determination of transplantation efficiency of cord blood stem cells (CB SC) for damage to the myocardium and assessment of the repair of its disturbed functions in the experiment.

Materials and methods. The experiment was conducted on mice of the FVB line at the age of 5 months, with a body weight of 25–30 g. Animals were divided into experimental groups of 5 animals in each. The animals of the study group were derived from the experiment before the SC suspension injection, after 2 days, 4 and 8 weeks after cell transplantation.

Results. Analysis of morphofunctional changes after the introduction of cord blood cells in 4 and 8 weeks compared to the original state (3 weeks after modeling of the isoproterenol induced myocardial injury model) has established a clear tendency to improve the investigated parameters. The confirmed phenomenon of self-referral of cord blood into the lesion zone proves the expediency of transplantation by intravenous injection of a suspension of CB SC. It has been established that transplantation of CB SC causes a temporary deterioration of morphofunctional features, which may be a manifestation of the body's response to xenotransplantation. The CB SC transplantation has a positive effect on the isoproterenol-induced myocardial injury model.

Conclusions: 1. Accumulation of CBSC in the zone of injury after transplantation, proved by experimental research. 2. CB SC transplantation accelerates the processes of myocardial regeneration

міокарду на моделі ураження у лабораторних тварин. 3. Внутрішньовенне введення суспензії СК ПК моделям ушкодження міокарду довело свою ефективність. 4. Отримані експериментальні результати можуть слугувати підґрунтям для подальших клінічних досліджень у пацієнтів з хронічним ураженням міокарду.

Ключові слова: стовбурові клітини, трансплантація, модель ураження, пуповинна кров.

on the model of injury in laboratory animals. 3. Intravenous injection of the CB SC suspension to the models of myocardial injury proved to be effective. 4. The experimental results obtained can serve as the basis for further clinical studies in patients with heart failure.

Keywords: stem cells, transplantation, model injury, umbilical cord blood.

ВСТУП

Найефективніша стратегія у лікуванні термінальної стадії серцевої недостатності (СН) – трансплантація серця. Вона є доступною не в усіх країнах світу. Незважаючи на збільшення захворюваності СН, кількість трансплантацій серця, за останнє десятиріччя залишається сталою [1]. Однак, і вона не в повній мірі задовольняє прагнення практикуючих лікарів та науковців із-за високої вартості процедури та обмеженої кількості донорських органів. Таким чином, проблеми лікування СН зумовлюють пошук альтернативних методик.

Одним з перспективних, проте недостатньо досліджених, підходів є клітинна терапія. Ряд дослідників вважають доцільним застосування стовбурових клітин (СК), як один з нових методів лікування ХСН [2]. В ході багатьох досліджень було показано, що ТСК призводить до значного покращення скоротливої здатності міокарду лівого шлуночка (ЛШ) у тварин та у людей при ішемічному ураженні [3, 4, 5].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Визначити ефективність трансплантації стовбурових клітин пуповинної крові (СК ПК) на ушкодження міокарду та оцінки відновлення його порушених функцій в експерименті.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент проведено на самках мишей лінії FVB віком 5 місяців, з масою тіла 25–30 г. Всі роботи з піддослідними тваринами проводили з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006), «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986), а також з дотриманням усіх принципів біоетики та норм біологічної безпеки [1, 2].

Тварин було розподілено на експериментальні групи по 5 тварини в кожній. В групі ізопротеренол-індукованої моделі ураження підшкірно вводили розчин ізопротеренола в дозі 100 мг/кг 5 днів поспіль.

В групі порівняння тварин вводили 0,4 мл

0,9% розчину NaCl підшкірно. У частини тварин після моделювання кардіоміопатії, через 21 добу проводили трансплантацію кріоконсервованих клітин пуповинної крові людини. Трансплантацію 1×10^6 ядромісних клітин кордової крові в середовищі, проводили в хвостову вену в об'ємі 100 мкл. Тваринам контрольної групи вводили 100 мкл середовища.

Тварин груп дослідження впливу СК на природній перебіг моделі виводили з експерименту до введення препарату, через 2 доби, 4 та 8 тижнів після трансплантації клітин. В експерименті використовували модифікований тест примусового плавання (Порсолт, 1977), реєстрацію ЕКГ, гістологічне дослідження міокарду.

Статистична обробка отриманих даних виконана з використанням комп'ютерних програм пакету STATISTICA (StatSoft Statistica v.6.0.). Статистичну значимість порівнюваних показників з розподілом відмінним від нормального, що визначалося, за критерієм згоди Колмогорова-Смирнова, встановлювали з використанням критерію серій Вальда-Вольфовица, при рівні значущості 0,05. Аналізовані дані представлені, як «середнє \pm стандартне відхилення» ($M \pm s$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Через 48 год. після трансплантації СК ПК спостерігалась значно виражена тахікардія (430–500 за хв.), що очевидно було обумовлено реакцією організму на трансплантацію. Існуюча депресія сегменту ST імовірно зумовлена різкою тахікардією та може бути її вторинним проявом. Розширення комплексу QRS спостерігалось у більшості піддослідних тварин та становило $0,034 \pm 0,5$ с. Зниження вольтажу зубців ЕКГ може бути обумовлене, з одного боку існуючими порушеннями функціонування кардіоміоцитів після моделювання ураження, а з іншого неможливістю виключити реакцію перикарду у вигляді гіперпродукції серозної рідини, як реакції на введення біологічно активного агента (СК ПК).

Через 48 год після трансплантації клітин пуповинної крові (3,3 тижня після моделювання кардіоміопатії) на гістологічних препаратах в міокарді представлені кардіоміоцити з еозинофільною, набряклою та вакуолізованою цитоплазмою. Виявлено гіпертрофію ядер кар-

діоміоцитів, що містять добре помітне ядрце та велику кількість еухроматину. Відмічено виражений набряк інтерстиційного простору та периваскулярний набряк. Спостерігалась вазоконстрикція артеріол. У периваскулярному просторі виявлено одиничні лімфоцити та фіброblastи.

При навантажувальних тестах через 4 тижні після трансплантації СК ПК (7 тижнів після моделювання) було зареєстровано поліпшення, в порівнянні з попереднім етапом (1 тиждень від трансплантації, 4 тижня після моделювання). Час першого періоду активного плавання становив 167 ± 34 сек, а загальний час плавання – 358 ± 100 сек. Встановлено, що вірогідність розбіжностей з похідним станом (0 тиждень від моделювання) зберігається: $p = 0,001$ для першого періоду активного плавання та $p = 0,003$ для загального часу плавання. В порівнянні з попереднім етапом (4 тижні від моделювання) не встановлено вірогідних розбіжностей по загальному часу плавання ($p = 0,215$). Підвищення першого періоду активного плавання, в порівнянні з попереднім етапом вірогідні ($p = 0,023$).

Через 4 тижня після трансплантації СК ПК (7 тижнів, після моделювання ізопротеренол-індукованого ураження міокарда) у піддослідних тварин спостерігався правильний синусовий ритм (ЧСС = 402 ± 38 уд/хв). У деяких тварин,

в окремих відведеннях, відмічено розширення та деформація комплексу QRS, що свідчить про часткове збереження порушень внутрішньшлуночкового проведення. В деяких відведеннях, в межах одного відведення реєструється електрична альтернація комплексу QRS. Екстрасистоли не відзначаються. Лише у однієї тварини відмічався негативний зубець Т. В порівнянні з попереднім періодом спостереження на ЕКГ спостерігається позитивна динаміка.

На препаратах міокарду тварин (рис. 1.), яким проводилась трансплантація, через 4 тижня після трансплантації СК ПК (7 тижнів після трансплантації) частина кардіоміоцитів гіпертрофована з ознаками помірного набряку цитоплазми. Їх ядра містять помірну кількість гетерохроматину та добре виражене ядрце, що може свідчити про збільшення синтезу РНК. Окремі кардіоміоцити з еозинофілією цитоплазми. У іншій частині кардіоміоцитів спостерігаються оптично щільні ядра з великою кількістю гетерохроматину. Периваскулярний набряк слабо виражений, також відсутні геморагії, надмірне кровонаповнення мікроциркуляторного русла та лімфоцитарна інфільтрація. У периваскулярному просторі виявлено поодинокі лімфоцити та невелика кількість фіброblastів. Відмічається набряк інтерстиційного простору.

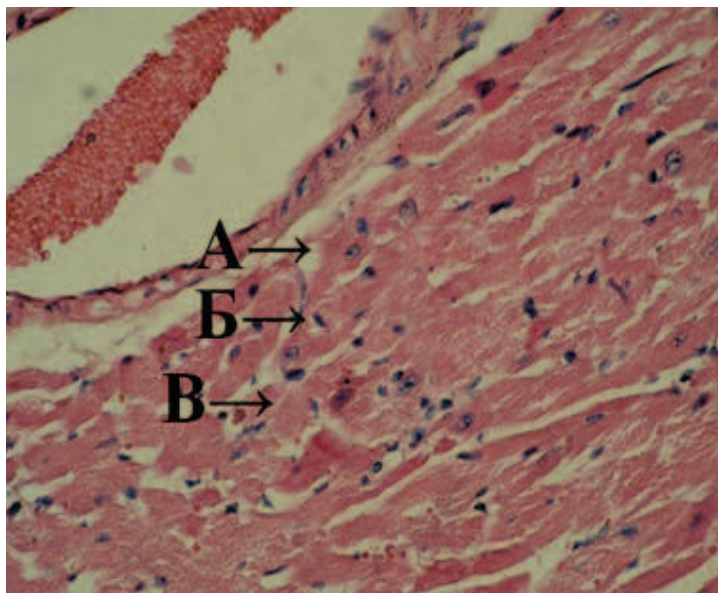


Рис. 1. Міокард самки миші лінії FVB віком 7,5 місяців з ізопротеренол-індукованою моделлю ураження (7 тижнів спостереження, 4 тижня після трансплантації СК КК). Ядра окремих кардіоміоцитів з великою кількістю гетерохроматину, в інших чітко виражені еухроматин та ядрця (А). Гіпертрофія кардіоміоцитів. Набряк цитоплазми окремих кардіоміоцитів та інтерстиційного простору (Б). Поодинокі контрактири кардіоміоцитів (В). Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення $\times 400$

Через 8 тижнів після трансплантації СК ПК (11 тижнів після моделювання) тривалість першого періоду активного плавання становила 213 ± 95 сек, а загальний час плавання – 407 ± 79 сек. Встановлене підвищення ні-

велювало вірогідні розбіжності з похідним станом (0 тиждень від моделювання): $p = 0,061$ для першого періоду активного плавання та $p = 0,064$ для загальної тривалості плавання. Для першого періоду активного плавання вірогідність роз-

біжностей в порівнянні з попередніми спостереженнями становила: для етапу 4 тижня від моделювання $p = 0,071$, а етапу 7 тижні після моделювання – $p = 0,112$. Для загального часу плавання вірогідність розбіжностей на етапі 11 тижнів в порівнянні з попередніми етапами не встановлено: для етапу 4 тижня після моделювання $p = 0,151$, а для етапу 7 тижнів $p = 0,137$.

Через 8 тижнів після трансплантації СК КК (11 тижнів після моделювання ізопротеренол-індукованого ураження міокарда) реєструється синусовий ритм без синусової тахікардії (ЧСС до 375), екстрасистолії, елевації сегмента ST. Не було зафіксовано також змін з боку вольтажу зубців ЕКГ та зубця Т. У деяких тварин зберігалось розширення та розщеплення QRS ($0,028 \pm 0,004$ с).

При морфологічному дослідженні (рис. 2)

через 11 тижнів після ізопротеренол-індукованої моделі ураження міокарду (8 тижнів після трансплантації), у шлуночках спостерігається помірний набряк інтерстиційного простору міокарда. Кардіоміоцити містять ядра помірної оптичної щільності. Цитоплазма кардіоміоцитів без набряку. Зрідка відзначається звивистість тяжів кардіоміоцитів. В більшості досліджених сердець в периваскулярному просторі зрідка спостерігалось утворення невеликої кількості пухкого сполучнотканинного матриксу. При цьому, між сполучнотканинними волокнами спостерігались поодинокі фібробласти. Однак, у одній миші в міокарді відзначається значне утворення пухкого сполучнотканинного матриксу, що містить кровоносні судини велику кількість фібробластів. Кровонаповнення кровоносних судин: артеріол, венул та капілярів незначне. У венулах зрідка відзначається сладж.

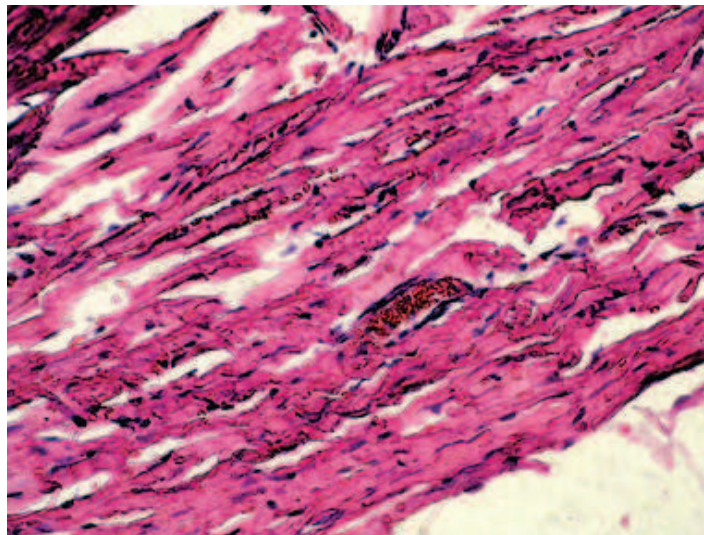


Рис. 2. Міокард самки миші лінії FVB віком 8,5 місяців з ізопротеренол-індукованою моделлю ураження (11 тижнів спостереження, 8 тижнів після трансплантації СК КК). Кардіоміоцити містять ядра помірної оптичної щільності. Цитоплазма кардіоміоцитів без набряку. Забарвлення гематоксилін-еозин, збільшення $\times 400$

Таким чином при аналізі морфофункціональних змін після введення клітин пуповинної крові через 4 та 8 тижнів в порівнянні з похідним станом (3 тижня, після моделювання ізопротеренол-індукованої моделі ураження міокарду) встановлена чітка тенденція до покращення досліджених параметрів. Підтверджений феномен самонаведення СК в зону ураження доводить доцільність трансплантації внутрішньовенним введенням суспензії СК ПК. Встановлено, що трансплантація СК ПК викликає тимчасове погіршення морфофункціональних ознак, що імовірно, може бути проявом реакції організму на ксенотрансплантацію. В цілому, трансплантація СК ПК має позитивний вплив на ізопротеренол-індуковану модель ураження міокарду.

ВИСНОВКИ

1. Експериментальним дослідженням було встановлено, що СК ПК після трансплантації накопичуються в зоні ураження.
2. Проведене експериментальне дослідження продемонструвало, що трансплантація СК ПК прискорює процеси регенерації міокарду на моделі ураження лабораторних тварин.
3. Внутрішньовенне введення суспензії СК ПК моделям ушкодження міокарду довело свою ефективність, що було підтверджено позитивною динамікою при електрофізіологічних, морфологічних дослідженнях та функціональних тестах по визначенню толерантності до фізичного навантаження.
4. Отримані експериментальні результати можуть слугувати підґрунтям для подальших клінічних досліджень у пацієнтів з хронічним ураженням міокарду.

ЛІТЕРАТУРА

1. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT), 2017. <http://www.isHLT.org/registries/heartLungRegistry.asp>.
2. Carvalho E, Verma P, Hourigan K, Banerjee R. Myocardial infarction: stem cell transplantation for cardiac regeneration. *Regenerative Medicine*. 2015; 10 (8): 701–705. DOI: [org/10.2217/rme.15.63](https://doi.org/10.2217/rme.15.63).
3. Acosta SA, Franzese N, Staples M et al. Human Umbilical Cord Blood for Transplantation Therapy in Myocardial Infarction. *Stem Cells*. 2013 Jul 1; (Suppl 4). pii: S4–005.
4. Perin, EC, Dohmann, HF, Borojevic R et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004; 110 (11 Suppl 1): II213–8. DOI: [10.1161/01.CIR.0000138398.77550.62](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000138398.77550.62).
5. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004; 364 (9429): 141–148. DOI: [10.1016/S0140-6736\(04\)16626-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16626-9).

Стаття надійшла до редакції 13.03.2019