

На правах рукописи

МАТЮКОВ
Андрей Александрович

ВЛИЯНИЕ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОК
КОСТНОГО МОЗГА НА ТЕЧЕНИЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА
(экспериментальное исследование)

14 00 16 – патологическая физиология
14 00 44 – сердечно-сосудистая хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2007



Работа выполнена в ГОУ ВПО «Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им акад И П Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ

доктор медицинских наук, профессор **Власов Тимур Дмитриевич**
доктор медицинских наук, профессор **Гриценко Владимир Викторович**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ

доктор медицинских наук, профессор **Николаев Валентин Иванович**
(ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная медицинская академия имени И И Мечникова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»)

доктор медицинских наук, профессор **Хубулава Геннадий Григорьевич**
(Военно-медицинская академия им С М Кирова)


ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

ГОУ ДПО «Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита диссертации состоится «21» сентября 2007 г в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 208 090 03 Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им акад И П Павлова (197089, г Санкт-Петербург, ул Л Толстого, 6/8)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ВПО «Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им акад И П Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Автореферат разослан «17» августа 2007 г

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор  В Ф Митрейкин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Несмотря на значительные успехи современной медицины, сердечно-сосудистые заболевания по-прежнему остаются главной причиной смертности и инвалидизации населения (Беленков Ю Н с соавт, 2003, Шахов В П, Попов С В, 2004) Высокий уровень летальности во многом определяется особенностями регенерации миокарда У человека на поздних стадиях онтогенеза кардиомиоциты утрачивают способность к регенерации В результате этого погибшие в ходе ишемии кардиомиоциты замещаются соединительной тканью (Репин В С, Сухих Г Т, 1998) Необратимое повреждение кардиомиоцитов и сосудистых структур вследствие ишемии миокарда приводит к нарушению функции сердца и, в конечном итоге, сердечной недостаточности (Gaudron P et al, 1993) Используемые в настоящее время консервативные и оперативные методы лечения ишемии миокарда не всегда эффективны или не могут быть применены по ряду причин Так, например, у больных с дистальным поражением и диффузными изменениями в коронарных артериях достичь реваскуляризации миокарда с помощью методов хирургической коррекции становится невозможным (Бокерия Л А с соавт, 2004) В связи с этим разрабатываются новые способы регенерации пораженного миокарда на основе современных достижений молекулярной и клеточной биологии (Репин В С, 1998, Потапов И В с соавт, 2001, Шевченко Ю Л, 2006) Таким новым направлением в кардиологии и кардиохирургии является использование клеток костного мозга Данный подход основан на способности клеток костного мозга участвовать в регенерации поврежденного миокарда (Шахов В П, Попов С В, 2004, Chachques J S et al, 2005) В терапии инфаркта миокарда используют различные клетки костного мозга гемопоэтические стволовые клетки (Limboung F P et al, 2005), эндотелиальные прогениторные клетки (Katritsis D G, 2005), мезенхимальные стромальные клетки (Tang Y L, 2005), нефракционированные ядродержащие клетки костного мозга (Zhang S, 2004) Применяется как аллогенная, так и аутологичная трансплантация клеток, причем наиболее перспективным считается трансплантация аутологичных клеток в связи с отсутствием необходимости иммуносупрессивной терапии и отсутствием этических и юридических проблем Наибольшую популярность получила аутотрансплантация мезенхимальных стромальных и нефракционированных ядродержащих клеток костного мозга Растущее число экспериментальных работ демонстрирует

21

положительный эффект трансплантации этих клеток на регенерацию поврежденного миокарда (Aceves J L et al, 2005, Piao H et al, 2005, Gao L R et al, 2006, Krausgrill B et al, 2006, Meluzin J et al, 2006) Однако многие вопросы в этой области медицины остаются нерешенными и требуют дальнейшего исследования. Такими являются вопрос о наиболее эффективном типе клеток и вопрос об оптимальном способе введения клеток для восстановления миокарда.

Цель исследования.

Изучить влияние аутотрансплантации культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и нефракционированных ядродержащих клеток костного мозга на течение острого инфаркта миокарда в эксперименте

Задачи исследования

- 1 Отработать оптимальный способ получения клеток костного мозга кролика для последующей аутотрансплантации
- 2 Определить местонахождение трансплантированных клеток в миокарде при различных путях введения
- 3 Сравнить эффективность трансплантации культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и нефракционированных ядродержащих клеток костного мозга на течение инфаркта миокарда у кролика
- 4 Оценить влияние трансплантации различных клеток костного мозга на течение экспериментального инфаркта миокарда на различных сроках
- 5 Изучить эффективность различных путей введения клеток костного мозга на течение экспериментального инфаркта миокарда

Научная новизна.

Впервые выполнено сравнение различных способов получения клеток костного мозга. Впервые на одной модели произведено сравнение влияния трансплантации культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных и нефракционированных ядродержащих клеток костного мозга при разных путях введения на течение инфаркта миокарда у кролика

Впервые проведена комплексная оценка морфофункционального состояния миокарда после трансплантации различных клеток костного мозга на основе использования современных инструментальных методов обследования (эхокардиографии, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии)

Впервые охарактеризовано состояние миокарда в отдаленные сроки (1 год) после трансплантации клеток костного мозга

Получены новые данные о возможности использования витального флуоресцентного красителя для идентификации трансплантированных клеток в миокарде кролика. Разработаны параметры оценки перфузии миокарда кролика методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии

Теоретическая и практическая значимость.

Данные, полученные в исследовании, являются теоретической основой для внедрения клеточных технологий в клиническую практику, так как обосновывают оптимальный вид клеток костного мозга и их способ введения при лечении больных с инфарктом миокарда

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1 Клетки костного мозга, трансплантированные интрамиокардиально, сохраняются в зоне введения в течение нескольких недель
- 2 Введение культуры мезенхимальных стромальных клеток костного мозга оказывает выраженное положительное влияние на морфофункциональное состояние миокарда в разные сроки наблюдения после коронароокклюзии
- 3 Применение нефракционированных ядродержащих клеток костного мозга приводит к увеличению размера зоны повреждения и ухудшению функционального состояния миокарда при экспериментальном инфаркте у кроликов
- 4 Внутривенное введение клеток костного мозга не изменяет течение экспериментального инфаркта миокарда у кроликов

Реализация работы.

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедре патофизиологии и госпитальной хирургии №2 Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова. Подана заявка №20006124343 (06.07.2006) на изобретение «Способ лечения больных пороками клапанов сердца» (соавт. Давыденко В. В., Гриценко В. В.), на которую получено положительное решение (20.06.2007)

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ

Апробация работы.

Материалы диссертации докладывались на Международном симпозиуме по биологии клетки в культуре «Стволовые клетки,

регенерация, клеточная терапия», Санкт-Петербург, 2004, одиннадцатой межвузовской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», Санкт-Петербург, 2005, юбилейной студенческой научной конференции, посвященной 100-летию клинической больницы Санкт-Петербургской Педиатрической Медицинской Академии и 80-летию Санкт-Петербургской Педиатрической Медицинской Академии, «Студенческая наука – 2005», Санкт-Петербург, 2005, конкурсе бизнес-идей и научно-исследовательских разработок «Молодые Дерзкие Перспективные», Санкт-Петербург, 2005, научной конференции «Новые технологии в ядерной медицине», Санкт-Петербург, 2006, Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре», Санкт-Петербург, 2006, двенадцатом Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов, Москва, 2006, Невском радиологическом форуме «Новые горизонты», Санкт-Петербург, 2007

Структура и объем работы.

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 37 отечественных и 126 иностранных источников. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 39 рисунками

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводились на кроликах-самцах линии Шиншилла массой 2,7-3,0 кг. Общее количество животных составило 98

Получение, характеристика и окрашивание клеток костного мозга. В работе использовали нефракционированные ядросодержащие клетки костного мозга (ЯСК) и культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК)

Получение ядросодержащих клеток костного мозга ЯСК получали двумя способами резекционным и пункционным. При резекционном способе ЯСК выделяли путем ферментативной диссоциации костномозговой взвеси, полученной в ходе механической обработки резецированных фрагментов подвздошных костей. При пункционном способе выполняли пункцию крыла подвздошной кости, получали 10 мл эксфузата костного мозга, который фракционировали с помощью центрифугирования (1600 g, 20 мин) в градиенте плотности

Перколла (63%) Образовавшееся интерфазное кольцо с ядродержащими клетками промывали в растворе Хенкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Gibco, США) и осаждали центрифугированием

Получение культур мезенхимальных стромальных клеток костного мозга Культуру МСК получали путем культивирования ЯСК, выделенных резекционным и пункционным путем Культивирование ЯСК проводили в среде α -MEM (ICN, США) с 10% сыворотки эмбрионов коров (Nucloxe, Новая Зеландия) и гентамицина сульфата (50 мкг/мл, Invitrogen, Великобритания) в CO_2 -инкубаторе при 5 % концентрации углекислого газа в течение 3 недель Смену среды производили через каждые трое суток После первой смены среды в нее добавляли аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл, ICN, США) Клетки, достигшие субконфлюэнтного состояния, пересевали при помощи 0,25% раствора трипсина (Gibco, США) и ЭДТА (0,02% этилендиаминтетрауксусная кислота, Gibco, США)

Характеристика культур МСК Характеристику клеточных культур проводили путем окрашивания стандартной смесью реактивов BCIP-NBT (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат с нитросиним тетразолам, Sigma, США) на щелочную фосфатазу (ЩФ) для идентификации клеток остеогенной дифференцировки и смесью суданов III и IV (BDH, Великобритания) для идентификации клеток адипоцитарной дифференцировки

Окрашивание клеток Перед трансплантацией клетки костного мозга окрашивали ядерным флуоресцентным красителем Hoechst (Sigma, США) Для этого перед трансплантацией в клеточную суспензию добавляли флуорохром в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 60 минут в CO_2 -инкубаторе на шейкере Из суспензии клеток готовили препараты и изучали на флуоресцентном микроскопе При этом ядра клеток светились ярко-голубым цветом

Подсчет клеток в суспензии и определение их жизнеспособности. Подсчет клеток костного мозга проводили в камере Горяева, а жизнеспособность определяли с помощью окраски трипановым синим (Лабтех, Россия)

Моделирование инфаркта миокарда Всем животным инфаркт миокарда воспроизводился лигированием левой коронарной артерии (Horner et al, 1980, Ytrehus et al, 1994, Zhu et al, 2000) В условиях искусственной вентиляции легких под управляемым наркозом выполняли левостороннюю торакотомию в четвертом межреберье и перевязывали переднюю нисходящую ветвь левой коронарной артерии на расстоянии 1,0 см от верхушки сердца Интраоперационная летальность составляла 10%, послеоперационная - менее 2%

Введение клеток животным. Все животные были разделены на 7 групп

1-ая группа – интрамиокардиальное введение ростовой среды α -MEM (модифицированная среда Игла, контроль, n = 13),

2-ая группа – интрамиокардиальная аутотрансплантация культуры МСК (n = 18),

3-я группа – интрамиокардиальная аутотрансплантация ЯСК (n = 18),

4-ая группа – внутривенное введение ростовой среды α -MEM (контроль, n = 11),

5-ая группа – внутривенная аутотрансплантация культуры МСК (n = 15),

6-ая группа - внутривенная аутотрансплантация ЯСК (n = 18),

7-ая группа – неоперированные животные (n = 5)

Введение клеток осуществляли 2 путями интрамиокардиально и внутривенно. Среднее число клеток составляло 2×10^6 . Интрамиокардиально клетки вводили в 0,4 мл ростовой среды α -MEM через 10 минут после коронароокклюзии в зону предполагаемого инфаркта с помощью инсулинового шприца из 6 гочек. Внутривенно клетки также вводили в 0,4 мл ростовой среды α -MEM через 10 минут после коронароокклюзии в краевую вену уха через периферический катетер. Животным контрольной группы либо интрамиокардиально, либо внутривенно вводили только 0,4 мл ростовой среды α -MEM.

Идентификация меченых трансплантированных клеток в миокарде. Через 20 суток после трансплантации клеток трех кроликов из каждой группы выводили из эксперимента (такой срок определялся длительностью жизни флуорохрома). Сердце разрезали на 2 части (базальную и апикальную) таким образом, что плоскость разреза проходила на уровне лигатуры перпендикулярно длинной оси сердца. Апикальную часть сердца измельчали и подвергали ферментативной диссоциации смесью трипсин-коллагеназы (Sigma, США). Диссоциированные клетки осаждали центрифугированием, наносили на предметное стекло и производили подсчет меченых клеток. Меченые клетки выявляли с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioscop» (Zeiss, Германия).

Электрокардиография. Электрокардиография (ЭКГ) во всех группах животных выполнялась до операции (норма), через 3 суток, 7 суток, 30 суток после операции и перед выведением животного из эксперимента (1 год после операции). Использовали портативный одноканальный электрокардиограф ЭКГ-001 («Красногвардеец», Россия). Амплитуда устанавливалась на 20 мм, а скорость лентопротяжного механизма – на 50 мм/с. Оценку ЭКГ проводили по второму стандартному отведению.

Ультразвуковое исследование сердца. Ультразвуковое эхокардиографическое исследование выполнено на эхокамере Sequoia 512 (Acuson, США) с использованием линейного датчика 13 МГц В каждой группе животных эхокардиографическое исследование выполнялось до операции, через 14 суток и 1 год после операции по стандартной методике Эхокардиография проводилась с обязательной параллельной регистрацией ЭКГ-сигнала Из парастернального доступа по длинной оси левого желудочка (с контролем из этого же доступа по короткой оси левого желудочка) в режиме М-модального сканирования регистрировался конечно - диастолический размер левого желудочка Систолическую функцию левого желудочка регистрировали с помощью 2D – сканирования из верхушечного доступа в четырехкамерной и двухкамерной позициях Расчеты фракции выброса по модифицированному дисковому методу Simpson проводили, используя встроенные программы эхокамер Кровоток в аорте оценивали в режиме импульсно-волновой доплерографии

Методика оценки перфузии миокарда. Оценка перфузии выполнялась методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) Использовался радиофармацевтический препарат (РФП) Myoview (Nucomed, Великобритания), меченый технецием-99m РФП в дозе 30-50 МБк вводился в краевую вену уха через периферический катетер Спустя 10-15 минут после инъекции выполнялась ОФЭКТ на двухдетекторной гамма-камере E Cam var (Siemens, Германия) Для количественной оценки уровня перфузии миокарда использовали показатель соотношения среднего значения накопления РФП в патологической зоне к таковому в референтной зоне Оценку равномерности перфузии определяли по соотношению максимального и минимального значений пикселя в патологической и референтной зонах

Методика определения размера экспериментального инфаркта миокарда. Размер экспериментального инфаркта миокарда определяли с помощью окрашивания срезов сердца 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ) Методика окрашивания ТТХ позволяет на макроскопическом уровне отграничить необратимо поврежденную ткань миокарда от ткани, сохранившей жизнеспособность У животных сразу после эвтаназии (через 12 месяцев после трансплантации клеток) извлекали сердце, промывали физиологическим раствором и разрезали в поперечном направлении с помощью специального устройства на 3 сегмента одинаковой толщины Затем срезы помещали в 1% раствор ТТХ (ICN, США), окрашивающий жизнеспособный миокард с сохраненной активностью НАД-зависимых

ферментов в ярко-красный (кирпичный) цвет, и инкубировали в течение 15 минут при температуре 37°C и pH 7,4. Окрашенные срезы сердца фотографировали с базальной поверхности цифровой камерой Olympus 2020. Компьютерную обработку изображений осуществляли с помощью программы Adobe Photoshop. Общую площадь рубца вычисляли по трем срезам и представляли в процентном отношении от площади среза.

Методика измерения дилатации левого желудочка. Дилатацию левого желудочка оценивали по срезам сердца, окрашенным ТТХ. Сфотографированные срезы подвергали компьютерной обработке с помощью программы Adobe Photoshop. Дилатацию левого желудочка рассчитывали как отношение площади просвета левого желудочка к площади миокарда обоих желудочков. Полученный индекс дилатации левого желудочка (в отн. ед.) вычисляли по трем срезам и представляли среднее значение.

Гистологическое исследование. После эвтаназии сердце кролика ниже лигатуры разрезали в поперечном направлении с помощью специального устройства на 3 сегмента одинаковой толщины – апикальный, средний, базальный. Затем срезы помещали в 10% раствор формалина на 4 суток. После фиксации каждый сегмент сердца заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 7 мкм по общепринятой методике. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и по Маллори, позволяющему выявить различные виды соединительной ткани. При этом коллагеновые волокна приобретали окраску разной интенсивности от голубой до синей. Препараты исследовали на микроскопе «Биолам» (Россия).

Количественная оценка васкуляризации. Оценивалась пограничная с рубцом зона. В каждом препарате в пяти последовательных полях зрения при увеличении $\times 400$ (окраска по Маллори) производился подсчет количества всех сосудов артериол, капилляров, венул, вен и синусов.

Статистическая обработка. Для статистической обработки данных использовалась статистическая программа SPSS. При небольшом числе наблюдений достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Все данные представляли в виде “среднее \pm стандартное отклонение” и значение p менее 0,05 рассматривали в качестве значимого.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сравнение способов получения ЯСК. Результаты сравнения резекционного и пункционного способов получения ЯСК представлены в табл 1

Таблица 1

Сравнение способов получения ядросодержащих клеток костного мозга

Признак	Резекционный способ	Пункционный способ
количество выделенных ЯСК (10^6 /мл)	6,7±1,8	32±4,6
цитохимическая реакция на ЩФ в культуре МСК	+	--
время, затраченное на выделение ЯСК (мин)	150±15	60±15
инвазивность процедуры	++++	+

Из представленных данных видно, что пункционный способ получения ЯСК по всем признакам имеет преимущество перед резекционным способом. В связи с этим ЯСК, полученные резекционным способом, в работе не использовались.

Характеристика клеток костного мозга. В результате фракционирования эксфузата костного мозга на градиенте Перколля были выделены ЯСК. После подсчета и определения жизнеспособности клетки переносили в культуральную чашку диаметром 10 см². В ходе культивирования было показано, что начиная с 3-4 суток появлялись единичные адгезивные клетки, имеющие вытянутую форму. На 7-8 сутки адгезивные клетки формировали колонии, представленные клетками с разными морфологическими свойствами: округлые, полигональные и веретеновидные. К 12-14 суткам адгезивные клетки формировали монослой, покрывая все дно культуральной чашки. Морфологически культура становилась более гомогенной и, в основном, была представлена вытянутыми фибробластоподобными клетками. После пересева клетки вновь культивировали до образования монослоя. На 2 пассаже мезенхимальные стромальные клетки костного мозга представляли собой гетерогенную популяцию, но в основном имели веретеновидную форму. После ферментативной обработки и перевода клеток в суспензионное состояние их размер составлял в среднем 15-20 мкм. Общее количество клеток, полученное в результате

культивирования, составляло 2×10^6 . В ходе культивирования на каждом пассаже делался отсев для проведения цитохимических реакций (на ЩФ для выявления клеток остеогенного ряда и на нейтральные липиды для выявления клеток адипоцитарного ряда). В качестве контроля использовали культуры МСК, дифференцированные в остеогенном и адипоцитарном направлениях. Для индукции дифференцировки в остеогенном направлении использовали среду α -MEM с добавлением β -глицерофосфата натрия (10 мМ, Sigma, США), дексаметазона (100 нМ, Sigma, США) и аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл), для индукции дифференцировки в адипоцитарном направлении использовали среду α -MEM с добавлением дексаметазона (10 нМ), аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл) и ITS + LA-BSA (инсулин, трансферрин, селеновая кислота, линейная алкилбензосульфоновая кислота). Результаты цитохимических реакций показали, что культура МСК характеризовалась отсутствием спонтанной остеогенной и адипоцитарной дифференцировки. В то же время, проведенные исследования по стимуляции дифференцировки культуры МСК в остеогенном и адипоцитарном направлениях под действием индукторов указывали на их мультипотентность.

Течение инфаркта миокарда. После лигирования передней нисходящей ветви левой коронарной артерии развивался инфаркт миокарда, который имел закономерное течение и сопровождался характерными патоморфологическими изменениями. На 4-е сутки после коронароокклюзии наблюдался некроз кардиомиоцитов с полным разрушением ядер, ограничением зоны некроза выраженным лейкоцитарным валом. На 14-е сутки отмечалась постепенная элиминация лейкоцитарной инфильтрации, в умеренном количестве визуализировалась незрелая соединительная ткань с небольшим количеством фибробластов. На 21-е сутки визуализировались единичные некротизированные кардиомиоциты, гистологически определялся сформировавшийся рубец с большим количеством фибробластов и коллагена. На сроке 1 год определялся рубец, образованный зрелой фиброзной тканью с большим количеством фибробластов и коллагеновых волокон.

Идентификация меченых трансплантированных клеток в миокарде. После интрамиокардиальной трансплантации культуры меченых МСК и ЯСК указанные клетки через 20 суток определялись в миокарде. Среднее количество меченых МСК, выявленных в диссоциированном миокарде, составило $9 \pm 3\%$, меченых ЯСК - $13 \pm 2\%$ от общего числа трансплантированных клеток. После внутривенного введения флуоресцентно окрашенные МСК и ЯСК не идентифицировались в миокарде.

Электрокардиография. Во всех группах после коронароокклюзии развивались электрокардиографические признаки острого инфаркта миокарда, которые имели отчетливую закономерную динамику. Однако в контрольных группах и в группе животных, которым выполняли интрамиокардиальную трансплантацию ЯСК, регистрировались признаки трансмурального инфаркта миокарда. Тогда как в группе животных, которым интрамиокардиально трансплантировали культуру МСК, ЭКГ-данные указывали на развитие субэндокардиального инфаркта миокарда. Кроме того, в контрольных группах и в группе животных после интрамиокардиальной трансплантации ЯСК предсердные экстрасистолы возникали значительно чаще ($78 \pm 10\%$ и $74 \pm 7\%$ на 3-и сутки, $19 \pm 8\%$ и $24 \pm 6\%$ на 7-е сутки после операции), чем в группе животных, которым выполняли интрамиокардиальную трансплантацию культуры МСК ($9 \pm 3\%$ на 3-и сутки и $8 \pm 4\%$ на 7-е сутки после операции). По данным электрокардиографии после внутривенного введения клеток костного мозга разницы в течении инфаркта миокарда по сравнению с контролем выявлено не было. Нарушения ритма развивались примерно с одинаковой частотой во всех группах.

Ультразвуковое исследование сердца. По данным УЗИ сердца в динамике проанализированы показатели систолической функции сердца: фракция выброса (ФВ), размер левого желудочка в диастолу (конечно-диастолический размер - КДР) и скорость кровотока через аортальный клапан (VAo). Динамика изменений показателей систолической функции сердца представлена в табл. 2 и 3.

Анализ эхокардиографических показателей систолической функции левого желудочка выявил выраженное положительное влияние интрамиокардиальной ауто трансплантации МСК, проявляющееся в нормализации всех показателей через 1 год после операции. В то время как у животных после интрамиокардиальной ауто трансплантации ЯСК, наоборот, выявлялось резкое снижение показателей систолической функции левого желудочка по сравнению с контрольной группой. После внутривенного введения МСК и ЯСК различий между контрольной и опытными группами выявлено не было.

Таблица 2

Показатели систолической функции сердца в контрольной и опытных группах после интрамиокардиальной трансплантации

Показатель	Величина показателя (M±m)								
	Группы								
	1-ая (контроль)			2-ая (трансплантация культуры МСК)			3-я (трансплантация ЯСК)		
	исходная	14 суток после операции	1 год после операции	исходная	14 суток после операции	1 год после операции	исходная	14 суток после операции	1 год после операции
ФВ, %	64,9 ±4,3	46,7 ±3,5	48,7 ±3,9	61,7 ±4,0	53,1 ±4,8*	58,2 ±3,1*	59,7 ±3,2	38,8 ±2,9*#	28,7 ±4,1*#
КДР, мм	14,1 ±0,4	16,8 ±1,2	16,6 ±0,8	14,7 ±0,9	17,3 ±1,0	15,2 ±0,7*	14,9 ±1,2	17,9 ±0,8*	19,8 ±0,9*#
VAo, м/с	94±3	58±6	73±6	96±4	81±6*	89±4*	97±5	55±4*#	45±3*#

Различия достоверны (p<0,05)

* - по сравнению с контролем,

- по сравнению со 2-ой группой

Таблица 3

Показатели систолической функции сердца в контрольной и опытных группах после внутривенной трансплантации

Показатель	Величина показателя (M±m)								
	Группы								
	4-ая (контроль)			5-ая (трансплантация культуры МСК)			6-ая (трансплантация ЯСК)		
	исходная	14 суток после операции	1 год после операции	исходная	14 суток после операции	1 год после операции	исходная	14 суток после операции	1 год после операции
ФВ, %	62,4 ±3,6	41,2 ±3,3	43,1 ±4,2	60,1 ±4,0	42,1 ±3,8	42,9 ±3,7	61,5 ±3,1	45,5 ±4,5	48,0 ±4,1
КДР, мм	14,6 ±0,4	17,6 ±1,0	16,8 ±1,2	14,3 ±0,5	17,7 ±1,2	17,6 ±1,4	14,7 ±0,7	16,9 ±1,0	17,2 ±0,4
VAo, м/с	92±4	62±3	68±6	95±3	66±5	69±2	91±7	62±5	66±5

Перфузия миокарда. Сводные данные уровня перфузии миокарда представлены в табл 4 и 5 До операции у всех животных нарушений перфузии миокарда выявлено не было, а РФП распределялся равномерно

При количественной оценке перфузионных томосцинтиграмм миокарда кроликов через 10 суток после интрамиокардиального введения клеток костного мозга и в контрольной группе отмечалось снижение перфузии в области передней стенки левого желудочка Через 1,5 месяца после операции во 2-ой и 3-й группах наблюдалось существенное улучшение перфузии К 3-ему месяцу после операции полная нормализация перфузии отмечалась во 2-ой и 3-й группах, тогда как в контрольной группе этот показатель не увеличивался В дальнейшем на сроках 6 и 12 месяцев динамика уровня перфузии не изменялась и показатели перфузии в опытных группах сохранялись достоверно на более высоком уровне, чем в контроле

Таблица 4

Значения уровня накопления РФП после интрамиокардиальной трансплантации клеток костного мозга на разных сроках ($M \pm m$, отн ед)

Сроки исследования	Группы		
	1-ая (контроль)	2-ая (трансплантация культуры МСК)	3-я (трансплантация ЯСК)
до операции (норма)	1,01±0,02	0,98±0,03	1,00±0,01
10 суток после операции	0,59±0,01	0,81±0,01*	0,75±0,03*
1,5 месяца после операции	0,62±0,02	0,92±0,03*	0,89±0,03*
3 месяца после операции	0,61±0,01	1,00±0,02*	0,98±0,01*
6 месяцев после операции	0,64±0,04	0,98±0,02*	0,98±0,03*
1 год после операции	0,61±0,03	1,02±0,04*	0,99±0,01*

Примечание отн ед = среднее значение накопления РФП в патологической зоне/среднее значение накопления РФП в референтной зоне

Различия достоверны ($p < 0,05$) * - по сравнению с контролем

Показатели равномерности перфузии в патологической и референтной зонах изменялись следующим образом через 10 суток после операции во всех группах отмечалась выраженная неравномерность распределения РФП, через 1,5 месяца в контрольной группе неравномерность перфузии нарастала, а в опытных группах РФП одинаково распределялся в патологической и референтной зонах миокарда. На сроках 3, 6 и 12 месяцев во 2-ой и 3-й группах сохранялось равномерное распределение РФП, в то время как в контрольной группе с увеличением срока наблюдения происходило выраженное увеличение неравномерности перфузии в патологической зоне по отношению к референтной.

Таблица 5
Значения уровня накопления РФП после внутривенной трансплантации клеток костного мозга на разных сроках ($M \pm m$, отн. ед.)

Сроки исследования	Группы		
	4-ая (контроль)	5-ая (трансплантация культуры МСК)	6-ая (трансплантация ЯСК)
до операции (норма)	0,99±0,02	1,00±0,01	0,98±0,03
10 суток после операции	0,62±0,02	0,60±0,01	0,58±0,02
1,5 месяца после операции	0,59±0,02	0,57±0,03	0,63±0,03
3 месяца после операции	0,61±0,01	0,60±0,02	0,58±0,01
6 месяцев после операции	0,58±0,04	0,64±0,04	0,60±0,03
1 год после операции	0,63±0,02	0,59±0,03	0,60±0,01

Примечание см табл 4

При количественной оценке перфузионных томосцинтиграмм миокарда кроликов на всех сроках наблюдения после внутривенного введения клеток костного мозга и ростовой среды во всех группах отмечалось снижение перфузии в области передней стенки левого желудочка.

Достоверных различий между значениями равномерности перфузии в патологической и референтной зонах после внутривенного введения ростовой среды и клеток костного мозга во всех группах на

всех сроках наблюдения выявлено не было У всех животных с увеличением срока наблюдения неравномерность распределения РФП в патологической зоне становилась более выраженной

Морфометрическая характеристика сердец кроликов. Макроскопическое исследование нативных сердец кроликов контрольных групп (без лечения) показало увеличение размеров сердца и наличие аневризмы левого желудочка по сравнению со здоровым сердцем (неоперированные животные) В сердцах кроликов, которым выполнялась интрамиокардиальная трансплантация культуры МСК, в передней стенке левого желудочка выявлялись рубцовые изменения, размеры сердца были незначительно увеличены В группе животных, которым осуществляли интрамиокардиальную трансплантацию ЯСК, размеры сердца значительно превышали размеры здорового сердца, а левый желудочек был аневризматически изменен В сердцах кроликов, которым выполнялась внутривенное введение культуры МСК и ЯСК, также отмечалось увеличение размеров сердца и в передней стенке левого желудочка определялась аневризма

Результаты определения площади рубца после окрашивания срезов сердца кролика ТТХ показали, что в 1-ой группе (контроль) площадь рубца составляла $20,2 \pm 1,9\%$ В опытных группах максимальные изменения были выявлены в группе животных, которым выполнялась интрамиокардиальная трансплантация ЯСК общая площадь рубца составляла $35,8 \pm 1,6\%$ Положительные изменения были отмечены после интрамиокардиальной трансплантации культуры МСК – площадь рубцовой ткани в этих сердцах соответствовала $6,0 \pm 2,6\%$ (рис 1)

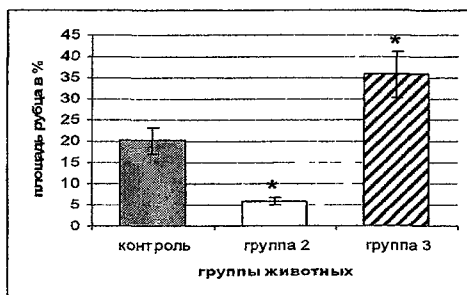


Рис 1 Площадь рубца в контрольной группе, после интрамиокардиальной трансплантации культуры МСК (группа 2) и ЯСК (группа 3) Примечание * $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

Результаты определения индекса дилатации левого желудочка показали, что в группе животных, которым интрамиокардиально трансплантировали ЯСК, этот показатель в 2 раза превышал значения контрольной группы ($0,34 \pm 0,03$ и $0,19 \pm 0,02$) Индекс дилатации левого желудочка сердец кроликов, перенесших интрамиокардиальную трансплантацию культуры МСК, был в 2 раза меньше по сравнению с контрольной группой и составлял $0,11 \pm 0,02$ (рис 2)

Результаты определения площади рубца после внутривенного введения показали, что в контрольной группе площадь рубца составляла $22,4 \pm 2,5$ % В опытных группах средние значения площади рубца достоверно не отличались от значений в контрольной группе и составляли $24,3 \pm 2,0$ % и $19,9 \pm 3,1$ %, соответственно (рис 3).



Рис 2 Индекс дилатации левого желудочка (ЛДЖ) в контрольной группе, после интрамиокардиальной трансплантации культуры МСК (группа 2) и ЯСК (группа 3) Примечание * $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

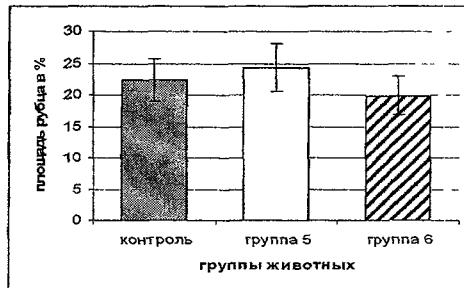


Рис 3 Площадь рубца в контрольной группе, после внутривенного введения культуры МСК (группа 5) и ЯСК (группа 6)

Индекс дилатации левого желудочка в контрольной группе составлял $0,18 \pm 0,03$. В 5-ой и 6-ой группах животных после внутривенного введения клеток средние значения индекса дилатации составляли $0,22 \pm 0,02$ и $0,21 \pm 0,04$, что не имело достоверных отличий от значений индекса в контрольной группе (рис 4)

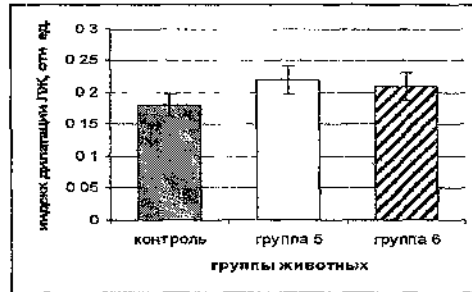


Рис 4 Индекс дилатации левого желудочка в контрольной группе, после внутривенного введения культуры МСК (группа 5) и ЯСК (группа 6)

Количественная оценка васкуляризации. Результаты количественной оценки сосудов в пограничной с рубцом зоне после интрамиокардиальной аутотрансплантации показали, что общее количество сосудов в контрольной группе составляло 9 ± 2 в одном поле зрения. Во 2-ой группе количество сосудов почти в 2 раза было больше, чем в контроле и составляло 16 ± 3 в одном поле зрения. В 3-й группе также отмечалось значительно большее число сосудов по сравнению с контрольной группой, что соответствовало 14 ± 3 в одном поле зрения. Анализ количества сосудов в пограничной зоне после внутривенного введения ростовой среды и клеток костного мозга показал, что общее количество сосудов в 4-ой (контрольной) группе составляло 10 ± 3 в одном поле зрения. В 5-ой и 6-ой группах количество сосудов достоверно не отличалось от контроля и составляло 8 ± 4 и 11 ± 3 , соответственно.

Гистологическая характеристика миокарда. Анализ гистологической структуры миокарда кроликов показал, что интрамиокардиальная трансплантация культуры МСК и ЯСК приводила к формированию принципиально иной морфологической структуры миокарда, чем в контрольной группе. После трансплантации культуры МСК наблюдалась картина мелкоочагового склероза с последующим восстановлением структуры миокарда. Кроме того, в исследуемых препаратах отмечалась повышенная васкуляризация миокарда. Интрамиокардиальная трансплантация ЯСК сопровождалась

формированием фиброзной аневризмы с поражением правого желудочка. Однако в исследуемых препаратах была отмечена хорошая васкуляризация миокарда, значительно превышающая уровень васкуляризации в контроле (таблица 6)

Таблица 6
Гистологическая характеристика миокарда кроликов контрольной и опытных групп после интрамиокардиальной трансплантации

Признак	Группы								
	1-ая (контроль)			2-ая (трансплантация культуры МСК)			3-я (трансплантация ЯСК)		
	апикальный сегмент	средний сегмент	базальный сегмент	апикальный сегмент	средний сегмент	базальный сегмент	апикальный сегмент	средний сегмент	базальный сегмент
аневризма	+	+	+	-	+	-	+	+	+
поражение правого желудочка	-	-	-	-	-	-	-	-	+
поражение межжелудочковой перегородки	-	+	-	-	-	-	-	-	+
прогрессирующий кардиосклероз	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Группы кардиомиоцитов, сохранившихся в рубце	+	+	+	+	+	+	-	-	-

«+» - наличие признака, «-» - отсутствие признака

Внутривенное введение культуры МСК и ЯСК не приводило к достоверному изменению морфологического состояния миокарда по сравнению с контрольной группой

Таким образом, результаты наших исследований позволили показать, что аутотрансплантация клеток костного мозга влияет на течение экспериментального инфаркта миокарда

ВЫВОДЫ

- 1 Пункционный способ получения клеток костного мозга у кролика имеет преимущество перед резекционным в связи с лучшим качеством и большим количеством получаемого материала, меньшей инвазивностью процедуры получения костного мозга и ее технической простотой
- 2 Через 20 суток после интрамиокардиальной аутотрансплантации меченые мезенхимальные стромальные клетки костного мозга и нефракционированные ядродержащие клетки костного мозга сохранялись в миокарде, после внутривенного введения меченые клетки костного мозга в миокарде не определялись
- 3 Интрамиокардиальная аутотрансплантация культуры мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при экспериментальном инфаркте миокарда приводила к уменьшению площади зоны ишемического повреждения, нормализации показателей систолической функции сердца, а также полному восстановлению перфузии миокарда за счет стимуляции ангиогенеза
- 4 Положительное влияние интрамиокардиальной трансплантации культуры мезенхимальных стромальных клеток костного мозга наблюдалось на сроках от 3 дней до 1 года после лигирования коронарной артерии у кроликов, то есть имело стабильный и долгосрочный терапевтический эффект
- 5 Интрамиокардиальная аутотрансплантация нефракционированных ядродержащих клеток костного мозга сопровождалась увеличением размеров зоны ишемического повреждения и ухудшением показателей систолической функции сердца, что сочеталось с активацией ангиогенеза и восстановлением показателей перфузии в условиях экспериментального инфаркта миокарда
- 6 Внутривенная аутотрансплантация культуры мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и нефракционированных ядродержащих клеток костного мозга не влияла на морфофункциональное состояние миокарда и показатели его перфузии

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1 Интрамиокардиальная аутотрансплантация культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга может быть использована в лечении больных с острым инфарктом миокарда, а также для стимуляции ангиогенеза при ишемической болезни сердца
- 2 Аутологичные нефракционированные ядродержащие клетки костного мозга при интрамиокардиальном введении не могут применяться в острейшую фазу инфаркта миокарда
- 3 Внутривенное введение различных клеток костного мозга в острейшую фазу инфаркта миокарда является нецелесообразным

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Матюков А.А Влияние интрамиокардиальной аутотрансплантации клеток костного мозга на перфузию ишемизированного миокарда в эксперименте // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия – 2006. - №3(5) – С 42-47
- 2 Матюков А А, Цупкина Н В, Гриценко В В, Власов Т Д, Давыденко В В, Ялфимов А Н, Пинаев Г П Сравнительное влияние интрамиокардиальной аутотрансплантации клеток костного мозга на репарацию миокарда кроликов после инфаркта // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия - 2007 – Т II, №1 - С 48-52
- 3 Давыденко В В., Матюков А А, Цупкина Н В, Власов Т Д, Гриценко В В, Кузнецов А А, Аминова Х К, Деев Р В, Ялфимов А Н, Пинаев Г П Влияние аутотрансплантации различных клеток костного мозга на морфофункциональное состояние миокарда кролика после инфаркта // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия - 2007 – Т II, №2 - С 53-61
- 4 Давыденко В В, Гриценко В В, Орловский П И, Азовцев Р А, Дегтерева О А, Астафьева О В, Лапекин С В, Матюков А А, Урусова М А Особенности ишемии миокарда у больных пороками клапанов сердца // Регионарное кровообращение и микроциркуляция – 2006 - №4 – С 64-68
- 5 Давыденко В В, Гриценко В В, Афанасьев Б В, Пизин В М, Мочалов О Ю, Дегтерева О А, Матюков А А Интракардиальная трансплантация мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга в комплексном лечении больных пороками клапанов сердца //

Вестник хирургии им И И Грекова – 2007 - №3 – С 16-21

6 Матюков А А , Гриценко В В , Власов Т Д , Давыденко В В , Тютин Л А , Ялфимов А Н , Иванова А А , Цупкина Н В , Пинаев Г П Оценка степени перфузии ишемизированного миокарда с использованием ОФЭКТ в эксперименте // Бюл НЦССХ им А Н Бакулева - 2006 - Т 7, №5 (Приложение) - С 267

7 Цупкина Н В , Матюков А А , Ялфимов А Н , Савченко О Н , Тютин Л А , Власов Т Д , Гриценко В В , Давыденко В В , Пинаев Г П Влияние интрамиокардиальной аутотрансплантации клеток костного мозга на кровоснабжение ишемизированного миокарда в эксперименте // Тезисы Всероссийского симпозиума «Биология клетки в культуре» Цитология – 2006 -Т 48, №9 - С 809

8 Гриценко В В , Власов Т Д , Давыденко В В , Матюков А А , Цупкина Н В , Пинаев Г П Влияние интрамиокардиальной трансплантации аутологичных клеток костного мозга на течение экспериментального инфаркта миокарда // Бюл НЦССХ им А Н Бакулева - 2005 - Т 6, №5 (Приложение) - С 298

9 Ялфимов А Н , Тютин Л А , Савченко О Н , Матюков А А , Давыденко В В , Гриценко В В , Власов Т Д , Цупкина Н В , Пинаев Г П Использование ОФЭКТ с ^{99m}Tc-тетрофосмином в оценке влияния трансплантации различных типов клеток на перфузию ишемизированного миокарда в эксперименте // Новые технологии в ядерной медицине материалы науч конф с международным участием – СПб , 2006 - С 59-60

10 Ялфимов А Н , Тютин Л А , Савченко О Н , Матюков А А , Давыденко В В , Гриценко В В , Власов Т Д , Цупкина Н В , Пинаев Г П Перфузионная томосцинтиграфия в динамической оценке влияния трансплантации различных типов клеток на перфузию ишемизированного миокарда в эксперименте // Невский радиологический форум "Новые горизонты" сборник научных трудов – СПб , 2007 – С 591

11 Матюков А А , Власов Т Д , Давыденко В В , Цупкина Н В , Пинаев Г П , Ялфимов А Н Влияние аутотрансплантации различных клеток костного мозга на состояние поврежденного миокарда в разные сроки после инфаркта // Стволовые клетки законодательство, исследования и инновации Международные перспективы сотрудничества Материалы Британско-российского совещания в сотрудничестве с Европейской комиссией – М , 2007 – С 10

Подписано в печать 16 08 2007 г. Формат 60x84/16
Бумага офсетная Печать офсетная
Усл. печ. л. 1,4 Тираж 150 экз. Заказ № 45

Типография Издательства СПбГУ
199061, г. Санкт-Петербург, Средний пр., 41