

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**С.А.Афанасьев, И.Н.Свиридов, В.П.Шахов,
Л.П.Фалалеева, Д.С.Кондратьева, С.В.Попов**

**ВЛИЯНИЕ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
НА ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС
ПОСЛЕ КРИОДЕСТРУКЦИИ МИОКАРДА**

ГУ НИИ кардиологии, Томского научного центра СО РАМН, Россия

С целью исследования влияния интрамиокардиальной трансплантации моноклеарных клеток костного мозга на extrasystolic и post-extrasystolic сокращение миокарда крыс перенесших деструктивное воздействие на сердечную мышцу выполнены опыты на 34 крысах линии Wistar.

Ключевые слова: клеточная трансплантация, костный мозг, моноклеары, кардиомиоциты, электромеханическое сопряжение, криодеструкция

To study the effect of intramyocardial transplantation of mononuclear cells of bone marrow on extrasystolic (premature) and post-extrasystolic contractions of myocardium of rats after destruction, the experiments were carried out on 34 Wistar rats.

Key words: cell transplantation, bone marrow, mononuclear cells, cardiomyocytes, electro-mechanical coupling, cryodestruction.

В последние годы ведутся активные исследования по изучению возможности использования клеточных технологий в лечении сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2, 14]. Особенно перспективным представляется трансплантация клеток костного мозга при лечении ишемической болезни сердца (ИБС) и её острой формы - инфаркта миокарда (ИМ) [1, 7, 8]. Однако наряду с позитивными данными, опубликован целый ряд работ, авторы которых отмечают негативное влияние клеточной трансплантации. В частности показано, что трансплантация моноклеаров при лечении ИМ оказывает проаритмогенный эффект, провоцируя желудочковые аритмии [9, 10].

Хорошо известно, что большинство заболеваний сердечной мышцы сопровождается нарушением процесса электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах. При этом нарушение внутриклеточного гомеостаза ионов Са, в том числе на уровне саркоплазматического ретикула рассматривается как один из важных механизмов аритмогенеза [13, 15]. С учетом этого, целью данной работы было исследовать влияние интрамиокардиальной трансплантации моноклеарных клеток костного мозга на extrasystolic и post-extrasystolic сокращение миокарда крыс перенесших деструктивное воздействие на сердечную мышцу.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на папиллярных мышцах, выделенных из левого желудочка восьми интактных крыс-самцов линии Wistar массой 200-250 г. Перед началом эксперимента животных, находящихся под легким эфирным наркозом, обездвигивали смещением шейного отдела позвоночника. После вскрытия грудной клетки, сердце иссекали и помещали в охлажденный физиологический раствор Кребса-Хейзелента следующего состава (в mM): NaCl - 120; KCl - 4,8; CaCl₂ - 2,0; MgSO₄ - 1,2; KH₂PO₄ - 1,2; NaHCO₃ - 20,0; глюкоза -

10,0. После отсечения предсердий, вскрывали полость левого желудочка и выделяли папиллярную мышцу. К концам мышцы привязывали капроновые петли, с помощью которых ее закрепляли в термостабилизируемой проточной камере. Один конец мышцы фиксировали неподвижно на крючке в стенке камеры, а второй - закрепляли на штоке изометрического датчика, в качестве которого использовали механотрон 6MX1С [3]. Перфузию осуществляли физиологическим раствором, оксигенированным карбогеном (O₂ - 95%, CO₂ - 5%) при 36±0,5 °С. Стимуляцию мышцы проводили электрическими импульсами прямоугольной формы длительностью 5 мс, подаваемыми на два массивных серебряных электрода. Базовая частота стимулирующих импульсов составляла 0,5 Гц.

Состояние электромеханического сопряжения в клетках миокарда оценивали по реакции мышц на тестирующее воздействие осуществляемое внеочередным электрическим импульсом (extrasystolic воздействие), имеющим те же характеристики, что и импульсы базовой стимуляции. Эти воздействия производили в интервале 0,2-0,5 секунды от начала регулярного стимулирующего импульса. Возбудимость сарколеммы оценивали по изменению цикла сокращение-расслабление в ответ на extrasystolic воздействие, а способность саркоплазматического ретикула аккумулировать ионы Са⁺², дополнительно поступающие при этом в миоплазму, оценивалась по изменению параметров post-extrasystolic сокращения [14].

В эксперименты были включены папиллярные мышцы 24 животных. Восемь животных были интактными, а остальным была выполнена криодеструкция стенки левого желудочка. Животным под лёгким эфирным наркозом вскрывали грудную полость и перикард, металлическим стержнем диаметром 6 мм охлажденным до температуры жидкого азота промораживали стенку левого желудочка [4]. Рану, обработав антибио-

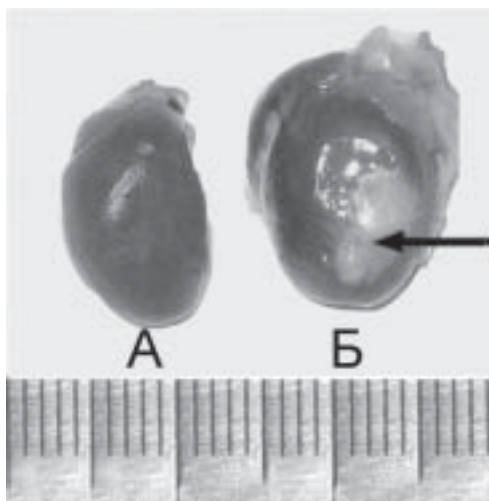


Рис. 1. Типичный вид сердец исследуемых групп животных, где А - сердце интактной крысы; Б - сердце животного через 39 дней после криодеструкции (стрелкой указан рубец сформировавшийся на месте криодеструкции стенки левого желудочка).

тиком и удалив воздух из грудной полости, послойно ушивали [3]. Через 9 суток им повторно вскрывали грудную полость и интрамиокардиально вводили 100 мкл культуральной среды. При этом, 8-ми животным вводили среду содержащую $1-2 \times 10^6$ кл/мл мионуклеаров костного мозга [4]. Введение проводили в 5-6 точек при некротической зоне по периметру поражения. После повторной операции, животные, в течение 30 дней, содержались в условиях вивария. К этому сроку (рис.1) у оперированных животных формировался рубец в зоне криоповреждения и развивалась гипертрофия левого желудочка.

Мононуклеарные клетки используемые для трансплантации выделяли из костного мозга бедренных костей 3-х дополнительных животных. Костный мозг гомогенизировали, продавливая через капроновую сеточку с диаметром ячеек 100 мкм. Полученную массу центрифугировали 20 минут при 2000 об/мин. Суспензию клеток разделяли на градиенте плотности $1,077 \text{ г/см}^3$. Сформировавшийся слой клеток, снимали и отмывали от градиента средой RPMI-1640 содержащей бычий сывороточный альбумин. Оценивали жизнеспособность мононуклеаров и общую клеточность полученного материала [5, 11].

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью компьютерной программы «Statistica 6.0», достоверность полученных результатов оценивали по критерию Вилкоксона.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Типичный вид кривых изометрического сокращения, регистрируемых в ходе эксперимента представлен на рис. 2. Из рисунка видно, что экстрасистолическое воздействие сопровождалось расширением цикла сокращение-расслабление за счет появлением на его заднем фронте дополнительной волны (экстрасистолическое сокращение). При экстрасистолах отстоящих от начала регулярного стимула, на 0,25 с, у интактных животных

эта волна имела выраженный максимум. Результаты статистической обработки параметров изометрических сокращений, полученных при экстрасистолическом воздействии, представлены в табл. 1.

По нашим данным, максимум амплитуды экстрасистолического сокращения на воздействие оказанное через 0,25 с, составлял $31,0 \pm 0,8\%$ от амплитуды регулярного цикла. У животных с контрольным криоповреждением выраженные экстрасистолические сокращения появлялись уже при 0,225 с интервале между импульсами. При этом, амплитуда экстрасистолического сокращения даже превышает значения полученные для интактных животных при воздействии с интервалом в 0,25 с. В группе животных которым были трансплантированы мононуклеарные клетки наблюдался практически тот же эффект. Выраженный максимум экстрасистолического сокращения регистрировался при 0,225 с интервале между импульсами.

В соответствии с современными представлениями об электромеханическом сопряжении [14], наблюдаемые при экстрасистолических воздействиях изменения заднего фронта кривой изометрического сокращения, связаны с поступлением в миоплазму дополнительного Ca^{+2} из экстрацеллюлярного пространства. Считается, что сократительный ответ сердечной мышцы будет отсутствовать, если стимулирующий импульс попадает в 3-ю фазу потенциала действия [6]. Однако такой электрический импульс инициирует поступление из экстрацеллюлярного пространства в миоплазму кардиомиоцитов дополнительных ионов Ca^{+2} . Эти ионы депонируются в саркоплазматическом ретикулуме и участвуют в следу-

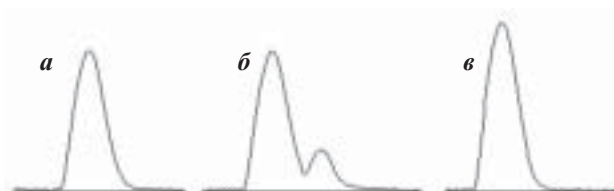


Рис. 2. Реакция папиллярных мышц на экстрасистолическое воздействие: а - регулярное сокращение; б - изменения формы кривой под действием экстрасистолического импульса через 0,25 с от начала регулярного стимула; в - постэкстрасистолическое сокращение.

Таблица 1. Влияние экстрасистолического воздействия на выраженность экстрасистолического сокращения папиллярных мышц крыс ($M \pm m$)

ЭС	Группы животных		
	Интактные	Криодеструкция	Мононуклеары
0,2 с			
0,225 с		$38 \pm 1,7\%*$	$39 \pm 7,6\%*$
0,25 с	$31 \pm 0,8\%$	$45 \pm 2,7\%*$	$46 \pm 6,3\%*$
0,5 с	$50 \pm 0,9\%$	$62 \pm 2,7\%*$	$59 \pm 4,5\%*$

где ЭС - задержка экстрасимула, данные приведены в процентном отношении к величине амплитуды регулярного сокращения; * - значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой интактных животных

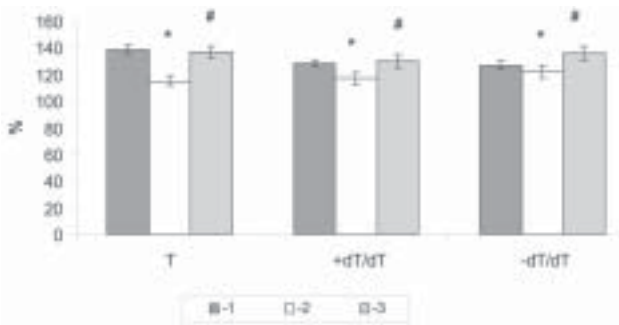


Рис. 3. Характеристики постэкстрасистолического сокращения при задержке экстрасимула 0,2 с, где T - амплитуда сокращения, (+dT/dt) и (-dT/dt) - скорости сокращения и расслабления, соответственно; 1 - интактные животные; 2 - животные с контрольным криоповреждением; 3 - криоповреждение с последующей трансплантацией мононуклеаров. Данные приведены в процентном отношении к величине соответствующих показателей регулярного сокращения принятых за 100%; * - отличие относительно контроля ($p < 0,05$); # - отличие относительно криоповреждения ($p < 0,05$).

ющем цикле сокращение-расслабление. Функциональным проявлением этого явления служит эффект постэкстрасистолической (ПЭС) потенциации инотропного ответа сердечной мышцы (рис. 2). В нашем исследовании, максимальные увеличения амплитуды ПЭС циклов наблюдались при использовании 0,2 с интервала между импульсами. У интактных животных (рис. 3) увеличение составляло в среднем $39 \pm 2,2\%$ по сравнению с амплитудой регулярного цикла сокращение-расслабление.

У животных перенесших криодеструкцию миокарда, реакция ПЭС цикла была иной, его амплитуда увеличилась только на $15 \pm 3,8\%$. В группе животных, которым после криодеструкции проводили трансплантацию мононуклеаров, максимум потенциации амплитуды ПЭС практически полностью совпал с таковым в группе интактных животных и составил в среднем $37 \pm 4,2\%$. Скоростные характеристики ПЭС цикла, у этих животных,

так же соответствовали значениям полученным у интактных животных, а величина (-dT/dt), да же несколько превышала их.

Поскольку при трансплантации мононуклеарной фракции костного мозга в ней содержится незначительное число стволовых клеток полученный результат не определяется пролиферативной и дифференцировочной способностью трансплантируемых клеток. Скорее всего, он обусловлен действием биологически активных веществ синтезируемых и выделяемых трансплантируемыми клетками [14]. В связи с этим, видимо, следует согласиться с тем, что трансплантация клеток мононуклеарной фракции костного мозга представляется более предпочтительным, как по их способности продуцировать биологически активные вещества, так и по относительной простоте получения [1].

Случаи возникновения аритмий отмеченные после трансплантации клеток, требуют самого тщательного анализа. Так, в работе Lunde K. с соавт. было использовано интракоронарное введение клеток [10]. Известно, что ишемическое поражение сердца и в том числе ИМ снижает электрическую стабильность клеток сердечной мышцы и провоцирует нарушения сердечного ритма. Вполне вероятно, что причиной аритмий в этом исследовании могло быть несовершенство техники введения клеток и индивидуальная реакция на саму процедуру. Можно предположить, что аритмии являются результатом реакции миокарда на ускоренное развития воспалительного процесса под влиянием цитокинов вырабатываемых трансплантируемыми клетками [16].

Таким образом, можно заключить, что интрамиокардиальная трансплантация мононуклеаров костного мозга после деструктивного поражения миокарда, способна позитивно влиять на процесс электромеханического сопряжения в клетках миокарда. Трансплантация мононуклеаров обеспечивает сохранность внутриклеточных Ca^{+2} -транспортирующих систем связанных с саркоплазматическим ретикуломом. Наблюдаемые эффекты, скорее всего, обусловлены действием биологически активных веществ, вырабатываемых трансплантируемыми клетками.

ЛИТЕРАТУРА

- Бузиашвили Ю.И., Мацкеплишвили С.Т., Алемян Б.Г., и др. Острый коронарный синдром и клеточные технологии. // Вестник Российской АМН. 2005, №4, С.65-69.
- Вермель А.Е. Стволовые клетки: общая характеристика и перспективы применения в клинической практике. // Клиническая медицина. 2004, №1, С.5-11.
- Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Фалалеева Л.П., Шахов В.П. Инотропная реакция миокарда крыс с постинфарктным кардиосклерозом на экстрасистолическое воздействие. // Бюлл. эксперим. биол. и мед., 2005, Т.139, №6, С.613-616.
- Онищенко Н.А., Потапов И.В., Башкина Л.В., и др. Восстановление сократительной функции криповрежденного миокарда крысы после трансплантации фетальных кардиомиоцитов и преддифференцированных стромальных клеток костного мозга. // Бюлл. эксперим. биол. и мед., 2004, Т.138, №10, С.403-407.
- Руководство к практическим занятиям по гематологии: учебное пособие / Новицкий В.В., Уразова О.И., Хлусова М.Ю // Томск: изд-во Том. Ун-та, 2005.-150с.
- Соловьева О.Э., Мархасин В.С., Цывьян П.Б., Келлер Б.Б. Экспериментально-теоретическое исследование связи интервал-сила в развивающемся миокарде цыпленка. // Биофизика. 1999, Т.44, В.2, С.337-349.
- Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онищенко Н.А. и др. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда. // Российский кардиологический журнал. 2003, Т.43, №5, С.42-50.
- Hamano K., Nishida M., Hirata K., et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. // Jpn. Circ. J. 2001, V.65,

P.845-847.

9. Kolettis T.M. Arrhythmogenesis after cell transplantation post-myocardial infarction. Four burning questions-and some answers. // *Cardiovasc Res.* 2006, V.69, №2, P.299-301.

10. Lunde K., Solheim S., Aakhus S., et al. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. // *Scand Cardiovasc J.* 2005, V.39, №3, P.150-158.

11. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. // *J. Clin Invest.* 1999, V.103, P.697-705.

12. Marengo F.D., Marquez M.T., Bonazzola P., Ponce-Hornos J.E. The heart extrasystole: an energetic approach. // *Amer. J. Physiol.* 1999, V.276, H.309-316.

13. Nuss H.B., Kaab S., Kass D.A. et al. Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure.// *Amer.J.Physiol.* 1999, V.277, H.80-91.

14. Pountos I, Giannoudis P.V. Biology of mesenchymal stem cells. // *Injury.* 2005, V.36, Suppl 3, P.8-12.

15. Priori S.G., Barhanin J., Hauer R.N.W. et al. Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias (Impact on clinical management).// *European Heart Journal.* 1999, V.20, C. 174-195.

16. Young H.E., Duplaa C., Romero-Ramos M., et.al. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. // *Cell Biochem Biophys.* 2004, V.40, №1, P.1-80.

ВЛИЯНИЕ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС ПОСЛЕ КРИОДЕСТРУКЦИИ МИОКАРДА

С.А.Афанасьев, И.Н.Свиридов, В.П.Шахов, Л.П.Фалалева, Д.С.Кондратьева, С.В.Попов

Исследовано влияние интрамиокардиальной трансплантации мононуклеаров костного мозга на экстрасистолическое и постэкстрасистолическое сокращение изолированных папиллярных мышц крыс после криодеструкции миокарда. Мышцы сокращались в изометрическом режиме при частоте электрической стимуляции 0,5 Гц и $36 \pm 0,5$ °C. Экстрасистолическое сокращений папиллярных мышц вызывали дополнительным электрическим импульсом, через 0,2 - 0,5 с после начала регулярного стимула. Установлено, что через 30 суток после криодеструкции, кардиомиоциты функционально активного миокарда характеризуются повышенной возбудимостью сарколеммальной мембраны и нарушенной Ca^{2+} -аккумулирующей способностью саркоплазматического ретикула (СПР). Интрамиокардиальное введение мононуклеаров ($1-2 \times 10^6$ кл/мл) через 9 суток после повреждения миокарда не влияло на изменение возбудимости сарколеммальной мембраны, но предупреждала дисфункцию СПР как основного депо Ca^{2+} в клетке. Сделан вывод, что интрамиокардиальное введение мононуклеаров не ухудшает электрической стабильности миокарда после деструктивного поражения, и может обеспечить более быструю нормализацию электро-механического сопряжения в за счет полноценного функционирования Ca^{2+} -транспортирующих систем СПР.

EFFECT OF INTRAMYOCARDIAL TRANSPLANTATION OF BONE-MARROW MONONUCLEAR CELLS ON ELECTRO-MECHANICAL COUPLING OF RAT CARDIOMYOCYTES AFTER MYOCARDIAL CRYODESTRUCTION

S.A. Afanas'ev, I.N. Sviridov, V.P. Shakhov, L.P. Falaleeva, D.S. Kondrat'eva, S.V. Popov

The effect was studied of intramyocardial transplantation of mononuclear cells of bone marrow on extrasystolic (premature) and post-extrasystolic contractions of isolated papillary muscles of rats after myocardial cryodestruction. Muscles contracted isometrically under electric stimulation (0.5 Hz, 36 ± 0.5 °C). Premature contractions of papillary muscles were produced by an additional electric stimulus (0.2-0.5 s after the onset of regular stimulus). It was shown that, 30 days after cryodestruction, cardiomyocytes of functionally active myocardium are characterized by an increased excitability of sarcolemma membrane and an altered Ca^{2+} -accumulating ability of the sarcoplasmic reticulum (SPR). The intra-myocardial administration of mononuclear cells ($1-2 \times 10^6$ cells/mL) 9 days later the myocardial injury did not affect the sarcolemma membrane excitability but prevented the dysfunction of SPR as a main depot of Ca^{2+} in cell. It was concluded that intramyocardial administration of mononuclear cells does not alter the electric stability of myocardium after its damage and could provide a faster recovery of electro-mechanical coupling at the expense of full-value functioning of Ca^{2+} -transporting systems of SPR.