

## ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК, ОБРАБОТАННЫХ IL-3, НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕРДЦА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОСТИНФАРКТНОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ

Е.А. Северова<sup>1</sup>, С.Ф. Беркинбаев<sup>1</sup>, М.Н. Нугманова<sup>1</sup>, Н.М. Поминова<sup>1</sup>, Ю.В. Перфильева<sup>2</sup>, Т.А. Супнязова<sup>2</sup>, Ю.Д. Денисов<sup>1</sup>, Н.Н. Беляев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ кардиологии и внутренних болезней МЗ РК, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина КН МОН РК, Алматы, Казахстан

### Influence of allogeneic hematopoietic stem/progenitor cells treated with IL-3 on structural-functional heart changes under experimental postinfarction heart failure in long-term period of observation

Е.А. Severova<sup>1</sup>, S.F. Berkinbayev<sup>1</sup>, M.N. Nugmanova<sup>1</sup>, N.M. Pominova<sup>1</sup>, Yu.V. Perfilyeva<sup>2</sup>, T.A. Supniyazova<sup>2</sup>, Yu.D. Denisov<sup>1</sup>, N.N. Belyaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Cardiology and Internal Medicine, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup> M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan

Цель исследования — изучение влияния аллогенных гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток, введенных внутривенно крысам в острый период изопроterenол-индуцированного инфаркта миокарда, на структурно-функциональные изменения сердца в отдаленный период наблюдения (через 1 год).

Постинфарктную сердечную недостаточность создавали путем внутрибрюшинного введения раствора изопроterenола. Аллогенные CD117<sup>+</sup> гемопоэтические стволовые/прогениторные клетки выделяли из костного мозга с помощью иммуномагнитной сепарации и индуцировали в них экспрессию рецептора CXCR4 и продукцию TGFβ в условиях трехсуточного культивирования в присутствии интерлейкина-3. Полученные клетки вводили внутривенно крысам на 9 сут. после первой инъекции изопроterenола. Через год было проведено исследование структуры и функции миокарда методом эхокардиальной эхокардиографии в М-модальном режиме на аппарате «VIVID-3» с использованием датчика 3,5 МГц. Диастолическую функцию исследовали методом доплерэхокардиографии в импульсном режиме.

Через год в группе инфарктных животных с введением гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток было отмечено клинически и статистически значимое уменьшение массы левого желудочка и относительной толщины его стенки; кроме того, уменьшение толщины задней стенки левого желудочка, межжелудочковой перегородки и диаметра аорты, по сравнению с группой без лечения. Допплерэхокардиографическое исследование показало улучшение диастолической функции в группе инфарктных животных с введением гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток: статистически значимое снижение доли животных с гипертрофическим и рестриктивным спектром трансмитрального кровотока.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что однократное внутривенное введение крысам гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток, обработанных IL-3, снижает степень риска развития тяжелых сердечно-сосудистых осложнений в отдаленные сроки после инфаркта миокарда.

Использованный нами подход может оказаться полезным для повышения эффективности клеточной терапии сердечной недостаточности.

**Ключевые слова:** гемопоэтические стволовые/прогениторные клетки, интерлейкин-3, экспериментальный инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, эхокардиография.

The aim of this research was to study the influence of allogeneic hematopoietic stem/progenitor cells infused intravenously to rats in acute period of isoproterenol-induced myocardial infarction on structural and functional changes of the heart in long-term period of observation (over 1 year).

The postinfarction heart failure was created by intra-abdominal injection of isoproterenol solution. Allogenic CD117<sup>+</sup> hematopoietic stem/progenitor cells were extracted from bone marrow by immunomagnetic separation and were induced for CXCR4 expression and TGFβ production by cultivation for three days in presence of interleukine-3. Obtained cells were injected intravenously to rats on 9 day after isoproterenol administration. One year later structure and function of the myocardium were investigated by epicardial echocardiography in M-modal mode with the apparatus «VIVID-3» supplied by 3.5 MHz transducer. The diastolic function was examined by Doppler echocardiography method in the impulse mode.

One year later, in the group of infarcted animals with hematopoietic stem/progenitor stem cell injection the clinically and statistically significant reduction of the left ventricle weight and relative thickness of the left ventricle wall were revealed; furthermore — the reduction of the left ventricle back wall thickness, interventricular septum thickness and aorta diameter were observed in comparison with the group without treatment. Doppler echocardiographic test has demonstrated an improvement of cardiac diastolic function in the group of infarcted animals with hematopoietic stem/progenitor cell injection: statistically significant reduction of proportion of the animals with hypertrophic and restrictive mode of transmittal blood flow.

Obtained data have shown that single intravenous injection of hematopoietic stem/progenitor cells treated with IL-3 ex vivo reduces a risk of serious cardiovascular complications after myocardial infarction at long-term period of observation in rats. Proposed approach may be useful in improving of cell therapy effectiveness for heart failure treatment.

**Keywords:** hematopoietic stem/progenitor cells, interleukine-3, experimental myocardial infarction, heart failure, echocardiography.

## Введение

Сердечная недостаточность (СН), чаще постинфарктная, является значимой медицинской и экономической проблемой в развитых и развивающихся странах. Современные методы терапии СН в основном направлены на предотвращение прогрессии заболевания, постинфарктного ремоделирования левого желудочка и увеличение жизнеспособного миокарда [1, 2]. В настоящее время перспективным методом восстановления сердечной функции после инфаркта миокарда считают трансплантацию стволовых клеток различного происхождения [3–6], среди которых предпочтение отдают гемопоэтическим стволовым и прогениторным клеткам (ГСПК) [7, 8]. Благодаря простоте и доступности их получения из костного мозга и отсутствию этических проблем данный тип клеток изучен наиболее подробно [9, 10]. Несмотря на многочисленные экспериментальные данные и активные клинические исследования в кардиологии [11–13], механизмы репаративного эффекта ГСПК остаются гипотетическими [14, 15]. Наиболее активно обсуждаются две гипотезы: 1) кардиомиогенез и ангиогенез путем дифференцировки трансплантированных клеток и (или) их слияния с клетками органов-мишеней [4, 9, 10]; 2) стимуляция ангиогенеза и репарации за счет паракринной индукции [16, 17]. Наибольшее число сторонников находит теория индукционной (паракринной) стимуляции регенерации трансплантированными клетками, которые продуцируют большое количество цитокинов и факторов роста, регулирующих репаративные процессы [18].

Одним из наиболее актуальных вопросов является изучение отдаленных результатов и последствий клеточной терапии инфаркта миокарда [2, 19]. Таких данных в настоящий момент не много и они достаточно противоречивы [7–13, 20, 21].

Модель изопротеренол-индуцированного инфаркта миокарда активно используют для изучения мелкоочагового инфаркта миокарда и сердечной недостаточности, но чаще всего исследователи ограничиваются изучением патологии в течение трех-четырёх месяцев после ее моделирования [22–27]. Данных о повреждениях миокарда через год после введения изопротеренола нами не найдено.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния ГСПК, обработанных IL-3 в условиях *ex vivo* и введенных внутривенно экспериментальным животным в острый период изопротеренол-индуцированного инфаркта миокарда (ИЗО-ИМ), на структурно-функциональные изменения сердечной мышцы в отдаленный период наблюдения (1 год).

## Материал и методы

Исследование проводили на неинбредных крысах-самцах с исходной массой  $210 \pm 5$  г, разделенных случайным образом на три группы: 1 группа — интактные животные; 2 группа — животные после ИЗО-ИМ, но без лечения; 3 группа — животные с внутривенным введением аллогенных ГСПК через 9 сут. после первой инъекции изопротеренола. Через год после ИЗО-ИМ было проведено эхокардиографическое (ЭХОКГ) исследование. На момент обследования в контрольных и экспериментальной группах было по 8 особей. Содержание животных и проведение эксперимента проводилось в соответ-

ствии с международными правилами [28] в одинаковых стандартных условиях вивария.

## Получение клеток

Для получения ГСПК костного мозга крыс декапитировали под эфирным наркозом. Костный мозг выделяли из бедренной и большеберцовой костей путем промывания их средой DMEM (Sigma-Aldrich, США). Полученную суспензию клеток костного мозга пропускали через фильтр (Pre-Separation Filter) с диаметром пор 30 мкм (Miltenyi Biotech, Германия) и подвергали изопикническому центрифугированию на градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. при 1400 g и температуре 4°C. Мононуклеарные клетки интерфазного кольца отмывали 20-кратным объемом среды RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с последующим центрифугированием при 200 g в течение 15 мин. при 4°C и далее подвергали иммуномагнитной сепарации. Для этого мононуклеарную фракцию клеток инкубировали с кроличьими антителами к крысиному CD117 (c-kit) (NeuroMics, США) — маркеру ГСПК — в разведении 1:100 в течение 15 мин. на льду. Затем клетки отмывали и центрифугировали, как указано выше, и метили парамагнитными микробусами с сорбированными на них антителами козы к кроличьему IgG (Miltenyi Biotech, Германия), инкубируя на льду в течение 15 мин., согласно рекомендации фирмы-производителя. Меченые клетки отмывали 20-кратным объемом среды RPMI-1640, центрифугировали (300 g, 10 мин., 4°C), супернатант удаляли, суспензию клеток в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина, пропускали через MS+ колонку, установленную в магнитный сепаратор VarioMACS (Miltenyi Biotech, Германия).

Магнито-меченые ГСПК выдавливали плунжером из колонки после удаления ее из магнитного поля. Выделенные клетки подсчитывали в камере Горяева и использовали для дальнейших этапов исследования. По данным проточной цитофлуориметрии, проведенной с помощью антител кролика к IgG козы, меченых FITC (Sigma-Aldrich, США), чистота полученных CD117<sup>+</sup>-клеток составила не менее 95%.

Полученные ГСПК в концентрации  $2 \times 10^6$  кл/мл культивировали в среде Stemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium (Sigma-Aldrich, США) при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности в течение 72 ч. в присутствии крысиного интерлейкина-3b (IL-3) (PeproTechAsia/CytoLab, Израиль) в дозе 50 МЕ/мл, согласно ранее описанной методике [29, 30].

## Модель инфаркта миокарда

Мелкоочаговый инфаркт миокарда индуцировали путем внутрибрюшинного введения раствора изопротеренола (Sigma, США) из расчета 80 мг/кг веса животного в 0,2 мл физиологического раствора дважды с интервалом 24 ч. (суммарная доза 160 мг/кг) [25]. ИЗО-ИМ вызывает постепенное развитие СН, что позволяет изучать отдаленные последствия данной патологии [31].

## Введение клеток

$1 \times 10^6$  обработанных IL-3 аллогенных костномозговых CD117<sup>+</sup>-ГСПК, ресуспендированных в 0,5 мл фосфатно-солевого буферного раствора, вводили крысам третьей группы внутривенно на 9 сут. после первой инъекции изопротеренола [17].

### Эхокардиография (ЭХОКГ)

Структуру и функцию сердца оценивали методом эхокардиальной эхокардиографии на ультразвуковом аппарате «VIVID-3» (GE Medical Systems, Норвегия) с использованием датчика 3,5 МГц (Superfical 10L и Cardiac 3s) в М-модальном режиме [32]. За день до исследования у животных предварительно выбривали грудную клетку. Сканирование осуществляли у животных, зафиксированных в положении на спине с левой стороны грудной клетки, с правой парастернальной позиции, после анестезии калипсолом (40 мг/кг) [22]. Для стандартизации изображения в исследовании придерживались правил, регламентирующих расположение плоскости сканирования по отношению к телу [32]. В режиме off-line измеряли по длинной оси сердца (четырёхкамерный обзор) конечный систолический (КСР) и диастолический размеры (КДР) левого желудочка (ЛЖ), размеры левого предсердия (ЛП), толщину аорты (Та), межжелудочковой перегородки (Тмжп) и задней стенки (Тзслж) в диастолу. Диастолическую функцию ЛЖ оценивали по результатам исследования характеристик трансмитрального кровотока с помощью доплерэхокардиографии в импульсном режиме (PW). Измеряли скорость раннего диастолического наполнения (Ve), скорость позднего наполнения (Va) и рассчитывали их соотношение Ve/Va [23].

По формулам рассчитывали следующие показатели [22, 32]:

– фракцию укорочения

$$\text{ФУлж (\%)} = (\text{КДРлж} - \text{КСРлж}) / \text{КДРлж} \times 100;$$

– массу ЛЖ (г)

$$m(\text{ЛЖ}) = 1,04 \times (\text{КДРлж} + \text{Тмжп} + \text{Тзслж})^3 - \text{КДРлж}^3;$$

– индекс относительной толщины стенки

$$\text{ОТСлж (см)} = (\text{Тмжп} + \text{Тзслж}) / \text{КДРлж}.$$

На основе ОТСлж и массы ЛЖ оценивали геометрическую модель ЛЖ [24]:

– при массе ЛЖ  $\leq 500$  мг и ОТСлж  $< 0,5$  – нормальная модель;

– при массе ЛЖ  $\geq 500$  мг и ОТСлж  $< 0,5$  – эксцентрическая гипертрофия;

– при массе ЛЖ  $\geq 500$  мг и ОТСлж  $\geq 0,5$  – концентрическая гипертрофия;

– при массе ЛЖ  $\leq 500$  мг и ОТСлж  $\geq 0,5$  – концентрическое ремоделирование.

Параметры, характеризующие структуру миокарда, – размеры ЛП, Тмжп, Тзслж, ОТСлж, масса ЛЖ, КСРлж, КДРлж, геометрия ЛЖ; функцию миокарда – ФУлж, Ve, Va, соотношение Ve/Va.

Следует отметить, что вариабельность полученных нами ЭХОКГ показателей сердца у крыс не противоречит данным других исследователей [22–26].

### Статистический анализ

Для описания изучаемых параметров использовали медиану (Me), интерквартильный размах, верхний и нижний квартили. Анализ данных проводили с помощью пакета программ StatPlus 2007 Professional [33]. Для сравнения трех независимых групп использовали ранговый однофакторный анализ Краскела – Уоллиса. При уровне значимости  $< 0,05$  принималась альтернативная гипотеза о различии выборок. В случаях, когда при множественном сопоставлении выборок достоверные различия

между какой-либо конкретной парой оказывались стертыми, мы проводили попарные сопоставления групп с помощью теста Манна – Уитни (U-test) и применением поправки БонФеррони.

### Результаты

Как известно, после первоначального повреждения кардиомиоцитов СН может развиваться за короткий срок (несколько дней или недель), за более длительный срок (несколько месяцев) или не развиваться вообще [1]. Кроме того, при мелкоочаговых повреждениях миокарда функция и геометрия сердца могут вернуться к норме в фазу восстановления [26, 27]. Поэтому, в первую очередь, мы должны были убедиться в сохранении через год после введения изопротеренола структурно-функциональных повреждений миокарда, не связанных с возрастом животных. Анализ, представленный в таблице, показал статистически значимые различия между тремя группами животных по ЭХОКГ показателям. Результаты ЭХОКГ свидетельствуют о развитии ремоделирования сердца во второй группе животных через год после введения изопротеренола, что подтверждается изменениями размеров, толщины стенок, формы и массы ЛЖ инфарктных животных по сравнению с контрольными животными (табл., рис. 1).

Согласно данным, представленным в таблице, в группе инфарктных животных с введением ГСПК наблюдалось блокирование постинфарктного ремоделирования ЛЖ. Так, у животных из 3 группы (ИЗО-ИМ + ГСПК) уменьшалась толщина задней стенки ЛЖ ( $p = 0,0005$ ), межжелудочковой перегородки ( $p = 0,001$ ) и диаметр аорты ( $p = 0,021$ ) по сравнению с животными 2 группы (ИЗО-ИМ). Следует отметить, что Тмжп ЛЖ в 3 группе животных была статистически значимо ниже, даже по сравнению с интактными животными. Размеры левого предсердия у инфарктных животных с введением ГСПК не отличались от инфарктных животных без лечения.

У крыс после ИЗО-ИМ с введением ГСПК наблюдалось увеличение конечного систолического и диастолического размеров ЛЖ и снижение показателя сократимости фракции укорочения, по сравнению с контролем (рис. 1, 2). Статистически значимой разницы по данным показателям с группой ИЗО-ИМ без лечения не обнаружено.

Процесс ремоделирования сердца, в первую очередь, включает увеличение его массы [34]. На поздних сроках у инфарктных животных с введением ГСПК было отмечено клинически и статистически значимое уменьшение массы ЛЖ и относительной толщины стенки ЛЖ, по сравнению с группой ИЗО-ИМ. Как известно, геометрия ЛЖ играет центральную роль в процессе ремоделирования сердца при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы [35]. На рис. 3 представлено распределение геометрических моделей ЛЖ у лабораторных животных. Оценка геометрии ЛЖ показала, что у всех инфарктных животных без лечения формировалась концентрическая гипертрофия ЛЖ, у здоровых животных изменений ЛЖ не обнаружено. После применения ГСПК у инфарктных животных изменения формы ЛЖ были более разнообразными. Нормальная модель ЛЖ наблюдалась у пяти из восьми особей; эксцентрическая гипертрофия ЛЖ отмечалась у двух и концентрическое ремоделирование ЛЖ – у одной из восьми особей. Концентрической гипертрофии в 3 группе не наблюдали.

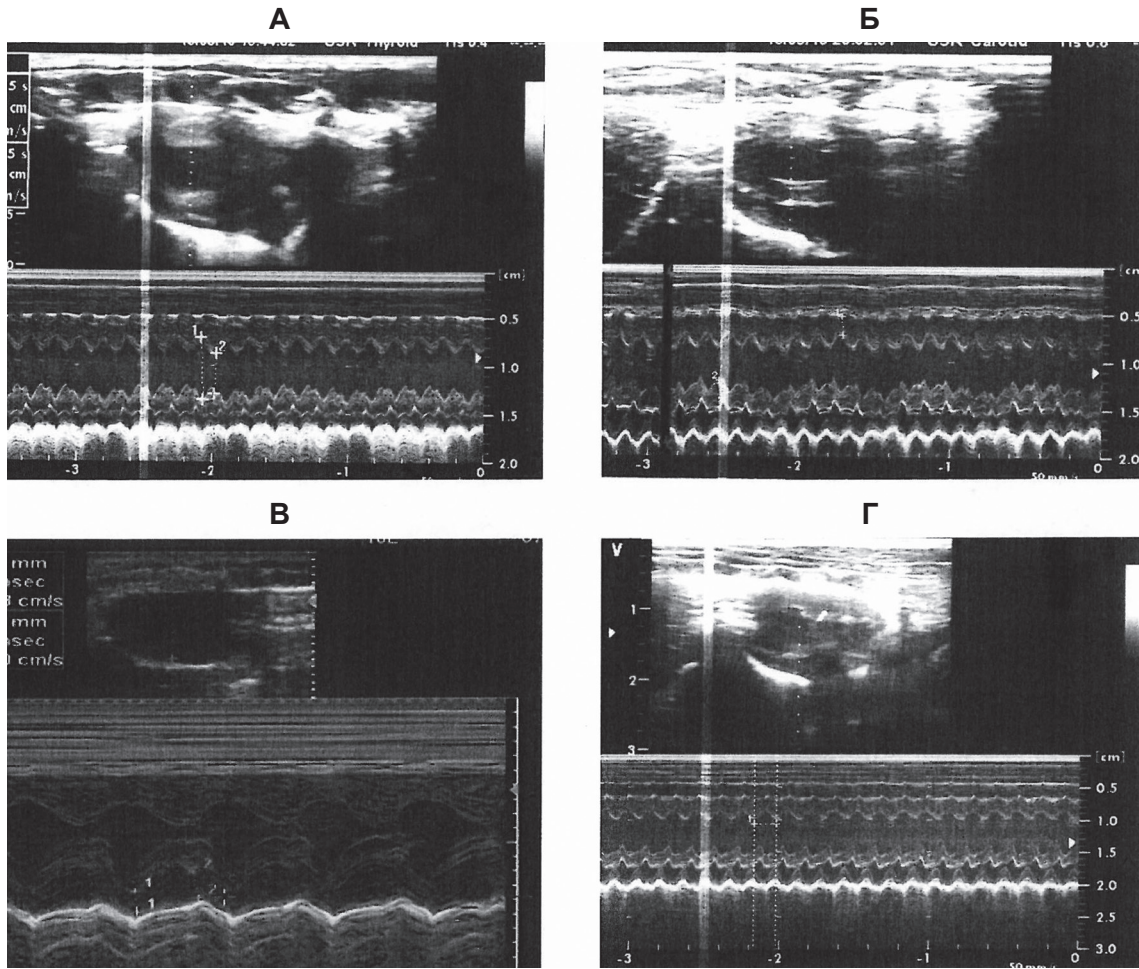


Рис. 1. Эхокардиограмма сердца животных через год после ИЗО-ИМ: А, Б – группа ИЗО-ИМ без лечения; В, Г – группа ИЗО-ИМ+ГСПК

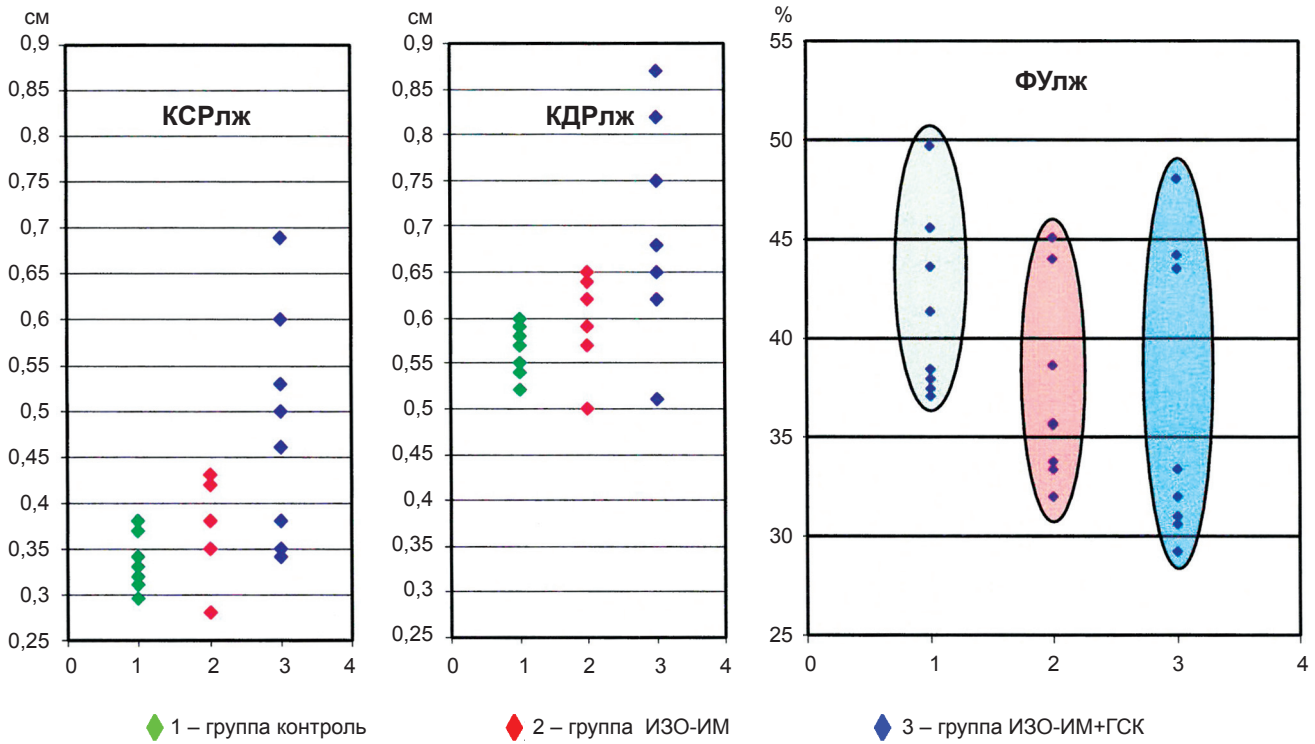


Рис. 2. Эхокардиографические показатели сократительной функции сердца у животных разных групп через год после моделирования ИЗО-ИМ: КСРлж – конечный систолический размер левого желудочка; КДРлж – конечный диастолический размер левого желудочка; ФУлж – фракция укорочения левого желудочка

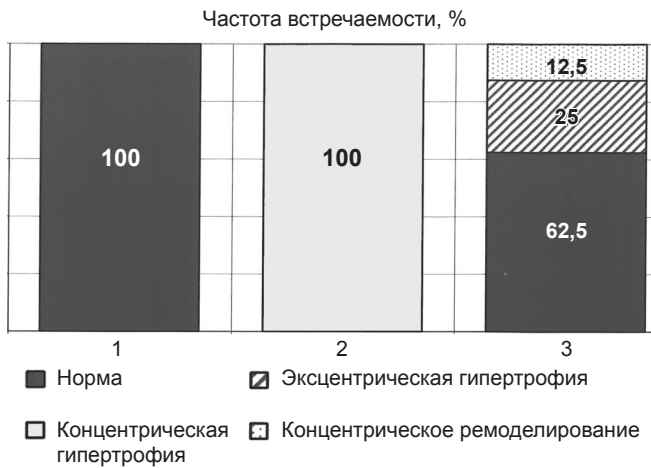


Рис. 3. Распределение геометрических моделей ЛЖ по частоте встречаемости в группах животных через год после ИЗО-ИМ: 1 – здоровые животные; 2 – животные с ИЗО-ИМ без лечения; 3 – животные с ИЗО-ИМ и введением ГСПК

Систолическая дисфункция, изменения геометрии ЛЖ и увеличение левого предсердия, по данным ЭХОКГ, позволили нам предположить развитие нарушений диастолической функции у всех животных через год после введения изопротеренола. Достоверным признаком диастолической дисфункции является изменение соотношения фаз трансмитрального потока [1, 36]. Действительно, исследование характеристик трансмитрального кровотока в импульсном доплеровском режиме выявило диастолическую релаксацию ЛЖ с удлинением диастолической релаксации во всех группах (рис. 4, 5). Гипертрофический тип трансмитрального кровотока, в основном, выявлялся у здоровых и инфарктных животных с введением ГСПК (0,375%) и единично – у инфарктных животных без лечения (0,125%). У этих животных отмечали замедление скоростных показателей раннего диастолического наполнения (пик E) и ускорение показателей наполнения во время систолы (пик A), снижение отношения  $V_e/V_a$  со значением меньше 1,0.

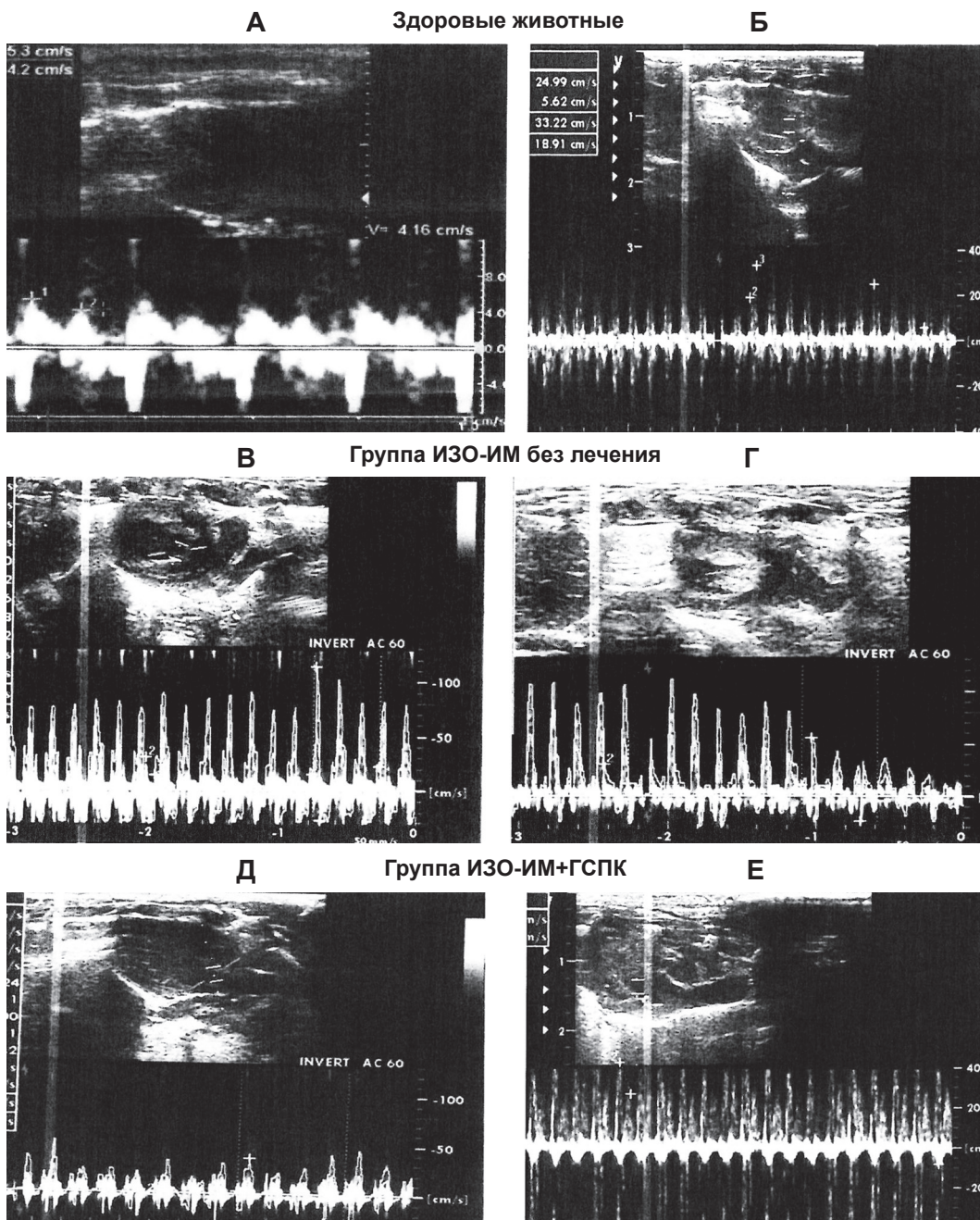


Рис. 4. Типы диастолического наполнения трансмитрального потока крови у животных через 1 год после ИЗО-ИМ по данным доплер-ЭХОКГ: А – диастолическая функция не нарушена; Б – гипертрофический тип ( $V_e/V_a - 0,57$ ); В – рестриктивный тип ( $V_e/V_a - 2,18$ ); Г – рестриктивный тип ( $V_e/V_a - 2,66$ ); Д – псевдонормальный тип ( $V_e/V_a - 1,59$ ); Е – псевдонормальный тип ( $V_e/V_a - 1,48$ )

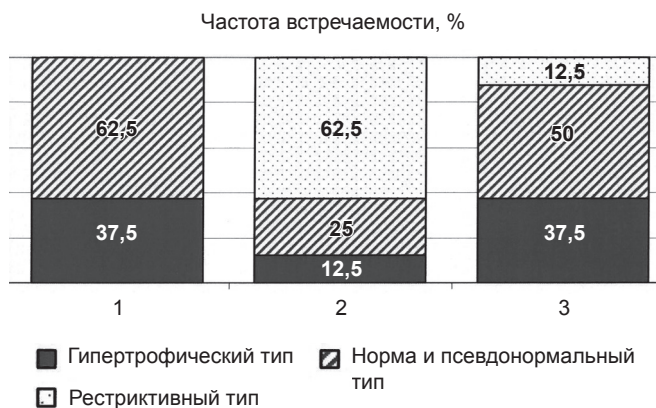


Рис. 5. Распределение частот встречаемости различных типов трансмитрального кровотока в группах животных через 1 год после ИЗО-ИМ: 1 – здоровые животные; 2 – животные с ИЗО-ИМ без лечения; 3 – животные с ИЗО-ИМ и введением ГСПК

Диастолическое наполнение с отношением  $V_e/V_a$  от 1 до 1,8 (нормальный тип трансмитрального кровотока) определялось у большинства животных из 1 группы и у половины инфарктных животных с введением ГСПК (см. рис. 4, 5). Сходный характер показателей  $V_e/V_a$  при нормальном и псевдонормальном типе диастолического спектра не дает возможности их дифференциации без дополнительных исследований. Вместе с тем, «нормальная» форма трансмитрального кровотока может указывать как на отсутствие каких-либо диастолических нарушений (в случае «истинно нормального» спектра), так и на миокардиальную патологию (в случае «псевдонормализации») [36, 37]. Следует отметить, что параметры трансмитрального кровотока существенно зависят от возраста [1, 25], а мы обследовали «пожилых» животных. В этой связи, мы склонны рассматривать спектр трансмитрального кровотока групп 1 и 3 как «истинно нормальный».

У большей части инфарктных животных без лечения наблюдали значительное ухудшение диастолической функции ЛЖ: ускорение раннего диастолического наполнения, резкое патологическое уменьшение наполнения во время систолы и увеличение  $V_e/V_a$  выше 2,0. Подобные параметры трансмитрального кровотока соответствуют рестриктивному типу наполнения ЛЖ [32, 36].

Оценка динамики заполнения ЛЖ с помощью доплер-ЭХОКГ у инфарктных животных с введением ГСПК показала наличие всех трех спектров трансмитрального кровотока: «гипертрофического», «нормального»/ «псевдонормального» и «рестриктивного». В группе животных с введением ГСПК частота встречаемости нормального и гипертрофического спектра кровотока была выше, а рестриктивного – ниже, чем в группе инфарктных животных без лечения (см. рис. 5).

Таким образом, процесс постинфарктного ремоделирования у животных после ИЗО-ИМ включает комплекс структурных (собственно ремоделирование) и функциональных нарушений (диастолическая дисфункция) сердца, а применение ГСПК предотвращает развитие патологических структурно-геометрических и функциональных изменений миокарда при экспериментальной СН.

## Обсуждение

Для клеточной терапии постинфарктной СН мы использовали популяцию костномозговых ГСПК, экспрессирующих CD117. Ранее было показано, что трансплантация таких клеток в инфарктный миокард или их мобилизация из костного мозга с помощью лиганда для *c-kit* – фактора стволовых клеток (SCF) – приводит к регенерации кардиомиоцитов и восстановлению сердечной функции у мышей [38, 39]. Как известно, в эмбриогенезе в костном мозге *c-kit* экспрессируют гемангиобласты, являющиеся предшественниками ГСК и эндотелиальных прогениторных клеток [40], которые сохраняют эту экспрессию в постнатальном периоде онтогенеза [41]. Sh. Fazel и соавт. (2006) с использованием нокаутных по гену *c-kit* мышей показали, что CD117<sup>+</sup>-клетки необходимы для естественной регенерации сердечной мышцы после инфаркта миокарда путем стимуляции васкуляризации некротизированной ткани [42]. Основываясь на этих данных, в предыдущей нашей работе мы выявили [30], что внутривенное введение очищенных ГСПК костного мозга с фенотипом CD117<sup>+</sup> крысам с ИЗО-ИМ приводило к более быстрому процессу рубцевания. Более того, трехсуточное культивирование ГСПК в присутствии IL-3, в отличие от IL-2, IFNg и G-CSF, обеспечивало усиление этими клетками продукции TGF- $\beta$ , обладающего ангиогенной активностью, и экспрессии клеточного рецептора CXCR4 к фактору хоуминга SDF-1, повышенная продукция которого отмечалась в сердечной ткани в первые 7 дней после инфаркта. Мы не оценивали фенотип клеток и не проводили тест на колониеобразование после трехсуточной обработки IL-3, исходя из предположения, что такой срок культивирования в бессывороточной среде в отсутствие полной панели индукторов дифференцировки не приводит к исчезновению маркеров ГСПК. Однако мы не исключаем, что конечный клеточный продукт мог содержать какое-то количество зрелых клеток миелоидного ряда. Для уточнения этого вопроса необходимы дополнительные исследования. Полученные данные мы использовали как обоснование для продолжения исследований терапевтического потенциала костномозговых CD117<sup>+</sup>-ГСПК, обработанных IL-3, при СН.

После трансплантации различных типов стволовых клеток при сердечно-сосудистых заболеваниях исследователи отмечали следующие изменения сократительной функции миокарда: повышение (восстановление) [3, 4, 6, 21], клинически не значимое увеличение [7–9] и отсутствие изменений [10]. Разброс результатов объясняют типом применяемых клеток [9–12, 17, 19] и тяжестью заболевания [7, 8]. В наших экспериментах введение ГСПК не улучшало сократительную способность миокарда через год после инфаркта. Так, в группе с введением ГСПК снижалась ФУлж – основной показатель сократительной функции миокарда. Кроме того, КСРлж и КДРлж повышались у инфарктных животных с введением ГСПК, что указывало на развитие дилатации желудочка. Однако, согласно современным представлениям, процесс ремоделирования, а не сократительная дисфункция желудочков является «ключом к развитию тяжелых форм хронической СН» [19]. В нашем исследовании у животных из группы ИЗО-ИМ + ГСПК статистически значимо снижались показатели геометрии ЛЖ: толщина межжелудоч-

ковой перегородки, толщина задней стенки и относительная толщина стенок ЛЖ, по сравнению с группой ИЗО-ИМ. У животных с введением ГСПК в большинстве случаев наблюдали нормальную модель ЛЖ и не обнаружили ни одного случая концентрической гипертрофии ЛЖ. Тогда как в группе ИЗО-ИМ без лечения регистрировали только этот тип гипертрофии. Несомненно, клинически важным фактом является снижение массы ЛЖ в группе после введения ГСПК как по сравнению с инфарктной, так и с контрольной группой. Ведь даже небольшое увеличение массы ЛЖ служит прогностическим признаком повышенного риска сердечно-сосудистых осложнений [1, 37].

Особенностью дезадаптивного ремоделирования ЛЖ у животных после ИЗО-ИМ являлось повышение частоты обнаружения рестриктивного типа диастолического наполнения ЛЖ. Считается, что выявление этого типа диастолической дисфункции, независимо от состояния систолической функции, свидетельствует о более тяжелом течении СН и является важнейшим предиктором сердечно-сосудистой смертности [1, 36]. После применения ГСПК мы отмечали статистически значимое снижение доли животных с гипертрофическим и рестриктивным спектром трансмитрального кровотока. Улучшение диастолической функции косвенно подтверждалось уменьшением размера левого предсердия и показателя ОТСлж в группе ИЗО-ИМ + ГСПК.

Полученные нами результаты подтверждают данные литературы о способности гемопоэтических стволовых клеток изменять течение постинфарктного ремоделирования миокарда [3–6, 15]. Механизм наблюдаемого нами улучшения структуры и функции сердца у инфарктных животных после введения ГСПК мы, как и многие другие исследователи [17–19, 43, 44], не склонны интерпретировать как результат замещения кардиомиоцитов. В ряде работ показано, что трансплантированные стволовые клетки после инфаркта миокарда у человека стимулируют процесс

образования новых кардиомиоцитов из резидентных и циркулирующих в кровотоке прогениторных клеток, участвующих в процессе регенерации [45, 46]. Некоторые клинические исследования показали, что в мононуклеарной фракции костного мозга содержатся клетки, способные стимулировать восстановительные процессы в поврежденном миокарде [47, 48]. Ряд исследователей считают индукцию репаративных процессов за счет паракринных факторов, выделяемых трансплантированными клетками, основным механизмом регуляции регенерации [5, 10, 16–19, 41]. После трансплантации стволовые/прогениторные клетки продуцируют цитокины и факторы роста, регулирующие процессы заживления миокарда. Одни паракринные факторы стимулируют ангиогенез (VEGF) и хоуминг (SDF-1), иммобилизацию клеток костного мозга, другие регулируют процессы ремоделирования рубца, гипертрофии миокарда и оказывают противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [17, 18, 42].

В опубликованных нами ранее материалах также было показано, что введение ГСПК, обработанных IL-3 в условиях *ex vivo*, оказывает положительный эффект на восстановление миокарда на ранних сроках после ИЗО-ИМ: индуцирует ангиогенез, ограничивает воспалительно-некротические процессы и гибель кардиомиоцитов [29, 30], снижает уровень hs-СРБ [49]. Однако вопрос о механизме действия ГСПК при инфаркте миокарда остается дискуссионным и требует дальнейших дополнительных исследований.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что однократное внутривенное введение крысам ГСПК, обработанных IL-3, снижает степень риска развития тяжелых сердечно-сосудистых осложнений в отдаленные сроки после изопротеренол-индуцированного инфаркта миокарда. Предложенный нами подход может оказаться полезным для повышения эффективности клеточной терапии сердечной недостаточности.

#### ЛИТЕРАТУРА:

- McMurray J., Petrie M., Swedberg K. et al. Сердечная недостаточность. В: Кэмм А.Дж., Люшер Т.Ф., Серруис П.В., редакторы. Болезни сердца и сосудов. Руководство Европейского общества кардиологов (The ESC Textbook of Cardiovascular). Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2011. с. 1376-521.
- Velagaleti R. S., Pencina M.J., Murabito J.M. et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2008; 118: 2057-62.
- Segers V.F., Lee R.T. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 2008; 451: 937-42.
- Menasche Ph. Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011; 50(2): 258-65.
- Ahmed L.A. Stem cells and cardiac repair: alternative and multifactorial approaches. *J. Reg. Med. Tiss. Engin.* 2013, <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2050-1218-2-8.pdf>.
- Azene N., Fu Y., Maurer J. et al. Tracking of stem cells in vivo for cardiovascular applications. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 2014; 16(1): 7.
- Schachinger V., Erbs S., Elsasser A. et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur. Heart J.* 2006; 10: 2775-83.
- Assmus B., Rolf A., Erbs S. et al. REPAIR-AMI Investigators. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ. Heart Fail.* 2010; 3(1):89-96.
- Белевитин А.Б., Никитин А.Э., Цыган В.Н. и др. Клеточная терапия патологии миокарда (обзор литературы). *Вестник Росс. Воен. Мед. Акад.* 2010; 2(30): 194-200.
- Гольдштейн Д.В., Фатхудинов Т.Х. Актуальные вопросы клеточной терапии миокарда. *Вестник РАМН* 2012; 4: 16-24.
- Марков В.А., Рябов В.В., Сулова Т.Е. и др. Клеточная кардиомиопластика: состояние вопроса и результаты собственного исследования. *Бюллетень сибирской медицины* 2009; 4(2): 174-82.
- Кочегура Т.Н., Ефименко А.Ю., Акопян Ж.А. и др. Клеточная терапия сердечной недостаточности: клинический опыт, проблемы и перспективы. *КТТИ* 2010; V (2): 11-8.
- Fisher S.A., Brunskill S.J., Doree C. et al. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014; 4: CD007888.
- Leri A., Kajstura J., Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol. Rev.* 2005; 85: 1373-416.
- Forte E., Chimenti I., Barile L. et al. Cardiac cell therapy: the next (re)generation. *Stem Cell Rev. Rep.* 2011; 7(4): 1018-30.
- Dai I W., Hale S., Kloner R. Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. *Reg. Med.* 2007; 2(1): 63-8.
- Фатхудинов Т.Х., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В. и др. Механизмы терапевтической активности мультипотентных клеток при заболеваниях сердца. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2013; 4: 183-92.
- Burchfield J., Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogen. Tiss. Repair* 2008; 1(4): 1-11.
- Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Чекнева И.С. Клеточная терапия в лечении хронической сердечной недостаточности: виды применяемых стволовых клеток, результаты последних клинических исследований. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия* 2008; 5: 4-18.
- Yamada S., Nelson T.J., Behfar A. et al. Stem cell transplant into preimplantation embryo yields myocardial infarction-resistant adult phenotype. *Stem Cells* 2009; 27(7): 1697-705.

21. Dill T., Schächinger V, Rolf A. et al. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am. Heart J.* 2009; 157(3):541-7.
22. Matsuyoshi Y.N., Nishiyama A., Takaki M. et al. Left ventricular function of isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts perfused with blood: mechanical work and energetics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 297: H1736-43.
23. Prunier F., Gaertner R., Louedec L. et al. Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 283: H346-52.
24. Devereux R.B., Wallerson D.C., de Simone G. et al. Evaluation of left ventricular hypertrophy by M-mode echocardiography in patients and experimental animals. *Am. J. Card. Imag.* 1994; 8: 291-304.
25. Капелько В.И., Лакомкин В.Л., Лукошкова Е.В. и др. Комплексное исследование сердца крыс при поражении изопроterenолом. *Кардиология* 2014; 3: 46-56.
26. Казаченко А.А., Оковитый С.В. Куликов А.Н. и др. Экспериментальное моделирование хронической сердечной недостаточности. *Биомедицина* 2013; 3: 41-8.
27. Krenek P., Kmecova J., Kucerova D. et al. Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function. *Eur. J. Heart Fail.* 2009; 11: 140-6.
28. Европейская конвенция об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS №123). Страсбург, 18 марта 1986 года, <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/PDF/123-Arev.pdf>.
29. Беляев Н.Н., Рысулы М.Р., Ахметов Е.А. и др. Способ регенерации сердечной мышцы гемопоэтическими стволовыми клетками при экспериментальном инфаркте миокарда. Инновационный патент РК №22596. 2010 26 апреля.
30. Беляев Н.Н., Рысулы М.Р., Исабекова А.С. и др. Влияние IL-3 на регенеративно-индукционную активность гемопоэтических стволовых клеток костного мозга при экспериментальном инфаркте миокарда. *КТТИ* 2009; IV(4): 50-4.
31. Feng W., Li W. The study of ISO induced heart failure rat model. *Exp. Mol. Pathol.* 2010; 88: 299-304.
32. Райдинг Э. Эхокардиография. Практическое руководство. Москва: МЕДпресс-информ; 2010.
33. StatPlus 2007 Professional, <http://www.analystsoft.com/ru/>.
34. Pawlusch D.G., Moore R.L., Musch T.L. et al. Echocardiographic evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophied rat ventricles. *J. Appl. Physiol.* 1993; 74: 2598-605.
35. Litwin S.E., Katz S.E., Morgan J.P. et al. Long-term captopril treatment improves diastolic filling more than systolic performance in rats with large myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 28: 773-81.
36. Овчинников А.Г., Агеев Ф.Т., Мареев В.Ю. Методические аспекты применения доплерэхокардиографии в диагностике диастолической дисфункции левого желудочка. *Сердечная недостаточность* 2000; 2: 66-70.
37. Poulsen S.H., Jensen S.E., Guitzsche O. et al. Evaluation and prognostic significance of left ventricular diastolic function assessed by Doppler echocardiography in the early phase of a first acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 1997; 18: 1882-9.
38. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS USA* 2001; 98: 10344-9.
39. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
40. Nishikawa S.I., Nishikawa S., Hirashima M. et al. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1 + VE-cadherin + cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 1998; 125: 1747-57.
41. Rafii S., Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.* 2003; 9: 702-12.
42. Fazel Sh., Cimini M., Chen L. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1865-77.
43. Shabbir A.L., Zisa D., Suzuki G. et al. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 296(6): H1888-97.
44. Nadal-Ginard B., Fuster V. Myocardial cell therapy at the crossroads. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2007; 4: 1.
45. Adler E.D., Maddox T.M. Cell therapy for cardiac disease: where do we go from here? *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2007; 4: 2-3.
46. Kubo H., Jaleel N., Kumarapeli A. et al. Increased cardiac myocyte progenitors in failing human hearts. *Circulation* 2008; 118: 649-57.
47. Rupp S., Koyanagi M., Iwasaki M. et al. Characterization of long-term endogenous cardiac repair in children after heart transplantation. *Eur. Heart J.* 2008; 29: 1867-72.
48. Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L. et al. Hematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium. *Nature* 2004; 428(6983):668-73.
49. Северова Е.А., Поминова Н.М., Денисов Ю.Д. и др. Изменения концентрации С-реактивного белка у инфарктных животных после введения гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга. *Терапевтический вестник*, 2009; Ч.1, 3(23): 333-4.

*Поступила: 26.09.2014*